

# Etude *in vivo* de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4, inoculum utilisé pour la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin

LICOIS D.

INRA, UR1282, Infectiologie Expérimentale et Santé Publique, 37380, Nouzilly, France.

**Résumé.** La fraction surnageante de l'inoculum brut TEC4, obtenue par centrifugation (8000 ou 40000 g), a été étudiée au cours de 5 essais réalisés "*in vivo*", visant à étayer l'hypothèse de la présence d'une toxine préformée dans l'inoculum. Nous avons plus particulièrement analysé les répercussions d'une administration *per os* ou parentérale, associées à l'action de la chaleur appliquée à cette fraction. Les résultats confirment que l'on a bien un produit toxique responsable d'une perturbation physiologique précoce (J1-J2 après inoculation) marquée par une chute parfois sévère du gain de poids moyen quotidien. Ces essais auront aussi permis d'écarter de manière définitive l'implication directe d'un virus dans la genèse de l'EEL.

**Abstract.** *In vivo* study of the supernatant of the inoculum TEC4, used for experimental reproduction of Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE). The supernatant, obtained by centrifugation (8000 or 40000 g) from the TEC4 inoculum, was studied through 5 trials carried out "*in vivo*", aiming at supporting the hypothesis that a preformed toxin is present in the inoculum. We particularly analyzed the repercussions of an oral or parenteral administration, associated with the effect of heat applied to this fraction. The results confirm that a toxic product was responsible for the early physiological disturbance (D1-D2 after inoculation) marked sometimes by a severe decrease of the daily weight gain. These trials have also made it possible to set aside the direct implication of a virus in the genesis of the ERE.

## Introduction

L'Entéropathie Epizootique du Lapin est une maladie émergente correspondant à un syndrome digestif grave qui est apparu il y a une dizaine d'années et dont l'agent étiologique n'est toujours pas identifié (Licois *et al.*, 2005). Malgré une mortalité et une morbidité de mieux en mieux maîtrisée au niveau du terrain, cette pathologie reste une menace et peut être responsable d'accidents digestifs touchant certaines bandes d'animaux en élevage. Des travaux récents concernant les événements précoces qui se produisent pendant les 24-48 premières heures suivant une contamination expérimentale avec l'inoculum TEC4 brut (Licois et Coudert, 2005) ont montré qu'une dépression importante mais transitoire du gain de poids moyen quotidien (GMQ) était observée dès J1-J2 après inoculation, donc avant que la phase aiguë de la maladie ne se développe (Coudert et Licois, 2004, 2005). Ceci est conforme aux travaux de Marlier *et al.* (2003) qui ont rapporté des résultats semblables avec une fraction obtenue par filtration à 0.45 $\mu$ , de leur inoculum. L'une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est l'existence d'une substance soluble préformée de type toxine, dans l'inoculum. Le but de la présente étude était de valider l'hypothèse "toxine" en étudiant *in vivo* les effets de la fraction surnageante obtenue par centrifugation : répercussions d'une administration *per os* ou parentérale, associées à l'action de la chaleur appliquée à cette fraction.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Inoculum et fractionnement.

L'inoculum utilisé, TEC4 (Licois et Coudert, 2005) a été préparé comme décrit par Licois *et al.* (2005). Le fractionnement a été effectué par une double

centrifugation à 8000 g (2 fois une heure), censée sédimenter toutes les bactéries ou bien à 40000 g, sur coussin de saccharose, pendant 1h30, afin d'éliminer la grande majorité des virus. Chacune des fractions était ensuite vérifiée bactériologiquement stérile après ensemencement de 0,1 mL sur milieu gélosé BHI (Brain Heart Infusion). En cas de besoin une filtration complémentaire sur membrane millipore 0.22  $\mu$ m (Minisart, Sartorius) était effectuée. Selon les essais, un chauffage réalisé au bain-marie à 65° C ou à 80°C ( $\pm$  0,5 °C), pendant 10 à 15 min, a été appliqué soit à l'inoculum TEC4 brut, soit à la fraction surnageante. Pour toutes les inoculations, le volume administré aux lapins était de 500  $\mu$ L par animal.

### 1.2. Animaux et conditions expérimentales.

Tous les lapins utilisés sont des animaux EOPS provenant de l'INRA (Unité Expérimentale PFIE, 37380, Nouzilly, France) et élevés dans des conditions protégées (Licois *et al.*, 2005). Au sevrage (31 jours d'âge), les lapins ont été distribués à raison de 3 par cages, en tenant compte de leur poids au sevrage et de leur portée d'origine. Ils ont reçu *ad libitum*, de l'eau de boisson et un aliment de laboratoire exempt d'antibiotique et d'anticoccidien (UAR 110, 91360 Villemoison/Orge, France). Les lapins ont été inoculés à 37 jours d'âge.

### 1.3. Protocoles expérimentaux

Au total cinq essais sont rapportés ici.

#### *Etude des fractions (surnageants) 8000g et 40000g issues de l'inoculum TEC4.*

Pour ce premier essai, 96 lapereaux âgés de 5 semaines à l'inoculation, ont été répartis en 4 lots identiques de 24 lapins. Trois lots ont été inoculés respectivement avec l'inoculum TEC4 brut non

centrifugé, et les surnageants obtenus après centrifugation à 8000 g ou à 40000 g. Un dernier groupe de lapins non inoculés a servi de témoins.

#### *Action de la chaleur sur l'inoculum brut ou sur la fraction surnageante 8000 g.*

Nous avons montré antérieurement qu'une température de 55° C, pendant 10 min était sans effet sur l'inoculum qui conservait toute ses propriétés de pathogénicité (Coudert et Licois, 2005). Au cours de 2 essais nous avons testé les effets de 2 niveaux de température (65°C et 80 °C), appliqués pendant 10 min, d'une part sur l'inoculum brut (1<sup>er</sup> essai) et d'autre part sur la fraction surnageante 8000 g (2<sup>ème</sup> essai). Là aussi, les lots étaient constitués chacun, de 24 lapereaux âgés des 5 sem. au moment des inoculations qui ont toutes été réalisées par voie orale. Les lots témoins ont été soit non inoculés (essai 1) soit inoculés *per os* avec de l'eau (essai 2).

#### *Effet d'une administration parentérale : injection intraveineuse (IV) et intra péritonéale (IP) de la fraction surnageante 8000 g.*

Cette approche visant à valider aussi l'hypothèse toxine a été abordée au cours de 2 protocoles.

Dans un premier protocole 108 lapereaux ont été répartis en 5 lots et ont reçu par voie IV, 500µl des solutions suivantes : 1-/ lapins témoins sains non injectés (18 lapins) ; 2-/ lapins témoins injectés avec de l'eau physiologique (18 lapins) ; 3-/ lapins témoins injectés avec du contenu caecal issus de lapins sains EOPS (24 lapins) ; 4-/ lapins injectés avec la fraction surnageante 8000g de TEC4 chauffée à 80°C, 15 min (24 animaux) ; 5-/ lapins injectés avec la fraction surnageante de TEC4 non chauffée (24 lapins).

Lors du deuxième protocole nous avons comparé l'injection IV avec une injection IP. Trois lots de 18 lapins chacun ont été constitués : 1-/ lapins témoins injectés par voie IV avec de l'eau physiologique ; 2-/ lapins injectés en IV avec la fraction surnageante de TEC4 non chauffée ; 3-/ lapins injectés en IP avec la fraction surnageante de TEC4 non.

#### *1.4. Critères mesurés et analyses statistiques.*

Les animaux ont été pesés 2 à 3 fois par semaine. Diarrhée et mortalité ont été enregistrées quotidiennement. Les gains de poids ont été comparés par analyse de variance à deux facteurs à une comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide du test de Tukey, en utilisant le logiciel Systat (1994). La mortalité a été analysée par le test de  $\chi^2$ .

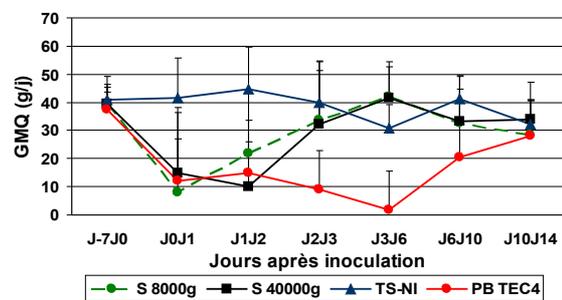
## **2. Résultats**

### *2.1. Étude de la virulence des fractions surnageantes obtenues après centrifugation à 8000 g ou à 40000 g comparée à celle de l'inoculum TEC4.*

On constate que le lot témoin sain non inoculé (TS NI) a eu une croissance moyenne de 38,7 g /j sur les 14 jours d'observation (Figure 1). A l'inverse les 3 lots inoculés ont subi une réduction significative (P<0.001) de la croissance dès J1 post inoculation

(PI). Dès le 3<sup>ème</sup> jour PI, les animaux ayant reçu soit le "surnageant 8000g", (S 8000g) soit le "surnageant 40000g" (S 40000g) présentent un GMQ similaire à celui des témoins et aucun signe de maladie n'a été observé chez ces lapins. Seul le lot inoculé avec l'inoculum TEC4 brut (PB TEC4) a été malade conformément au déroulement habituel de l'EEL (pic à J3J6, avec un GMQ significativement réduit (P< 0.001) par rapport à celui des 3 autres lots ; récupération la 2<sup>ème</sup> semaine). Dans ce lot la mortalité a été de 20.8% (5/24) (P<0.001) et la plupart des animaux présentaient des lésions typiques de l'EEL. Aucune mortalité n'a touché les autres lots.

**Figure 1** Evolution du GMQ chez des lapins sains, non inoculés (TS-NI) et des lapins inoculés avec l'inoculum TEC4 brut (PB TEC4) ou avec du surnageant de cet inoculum, après centrifugation à 8000g (S 8000g) ou à 40000 g (S 40000g).



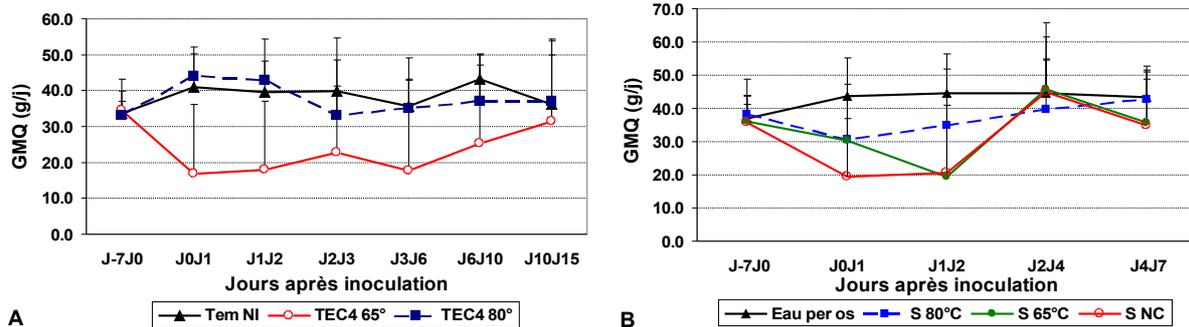
### *2.2. Action de la chaleur sur l'inoculum TEC4 brut (inoculation per os)*

Les lapins témoins (Tem NI) ont eu une croissance moyenne de 38,5 g/j sur les 2 semaines d'observation (Figure 2 A). Le lot inoculé avec l'inoculum brut chauffé à 65°C (TEC 65°) présente un GMQ significativement plus faible (P<0.001) que celui du lot témoin, lors de la 1<sup>ère</sup> semaine d'observation et ce dès J1 PI. Six lapins (sur 24, soit 25%) sont morts dans ce lot, entre J7 et J10 PI (P<0.001), avec un tableau lésionnel caractéristique de l'EEL. Par contre le lot inoculé avec le surnageant chauffé à 80°C (TEC 80°) a eu un comportement comparable à celui du lot contrôle et aucun signe clinique ni mortalité n'ont été notés.

### *2.3 .Action de la chaleur sur la fraction surnageante 8000 g de l'inoculum TEC4 (inoculation per os)*

Les lots ayant reçu la fraction surnageante non chauffée (S NC) ou chauffée seulement à 65°C (S 65°) ont une croissance altérée sur J1-J2 PI, par rapport à celle des témoins inoculés avec de l'eau (Eau *per os*) (P< 0.001 et P< 0.05 respectivement à J1 et à J2), alors que dès J4, leur GMQ est redevenu comparable à celui des témoins (Figure 2 B). En ce qui concerne le lot inoculé avec le surnageant chauffé à 80°C (S 80°), on observe une courbe intermédiaire entre celle des témoins (P=0.053 à J1) et celles des lots inoculés S NC (P = 0.11 à J1 ; P = 0.055 à J2) et S 65° (P< 0.05 à J2).

**Figure 2. A :** Evolution du GMQ chez des lapins témoins (Tem NI) et des lapins inoculés *per os* avec l'inoculum TEC4 chauffé à 65°C, 10 min. (TEC4 65°) ou à 80°C, 10 min. (TEC4 80°). **B :** Evolution du GMQ chez des lapins témoins (Eau *per os*) et des lapins inoculés *per os* avec la fraction surnageante 8000g de TEC4, non chauffée (S NC) et chauffée à 65°C, 10 min. (S 65°) ou à 80°C, 10 min. (S 80°).



**2. 5. Action de la chaleur sur la fraction surnageante 8000 g de l'inoculum TEC4 (inoculation IV)**

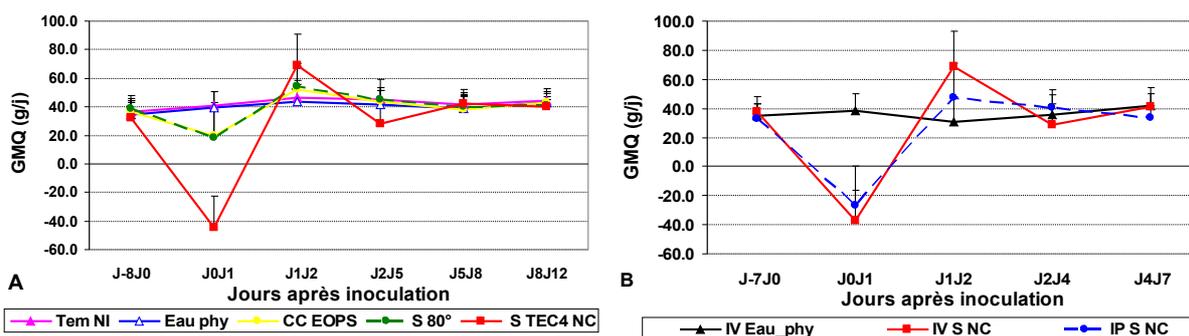
On remarque que les GMQ des lots témoins non inoculés (Tem NI) et témoins injectés en IV avec de l'eau physiologique (Eau phy) ont une évolution en tout point similaire, autour de 40 g/j, sur les 12 jours d'observation PI (Figure 3 A). De même, le GMQ des lots injectés IV avec les fractions surnageantes 8000g de contenu caecal de lapins sains (CC EOPS) ou de l'inoculum TEC4, chauffée à 80°C (S 80°) évoluent de manière parallèle mais avec chute significative du GMQ ( $P < 0.05$ ), à 20 g/j à J1 PI, comparée au GMQ des 2 lots témoins. Enfin pour le dernier lot (lot 5) ayant reçu en IV la fraction surnageante de l'inoculum TEC4 non chauffée (S NC), on assiste à une sévère chute du GMQ à -45 g/j à

J1 PI ( $P < 0.001$ ). A J2 PI, on note une récupération totale des animaux avec une compensation de croissance d'autant plus forte que la chute à J1 était élevée ( $P < 0.05$  pour le lot S TEC4 NC vs Tem NI). Par la suite la croissance se stabilise à des valeurs analogues à celle des témoins.

**2.6. Comparaison entre administration IV et IP de la fraction surnageante 8000 g de l'inoculum TEC4**

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les 2 lots inoculés en IV ou en IP avec le surnageant (respectivement IV S NC et IP S NC) (Figure 3 B). Le GMQ pour ces 2 lots est remarquablement conforme à celui du lot 5 de l'essai précédent (chute sévère à - 40 g/j à J1 PI), mais très significativement différent de celui du lot témoin (IV Eau phy) ( $P < 0.001$ ).

**Figure 3. A :** Evolution du GMQ chez des lapins témoins non injectés (Tem NI) et injectés par voie IV, avec respectivement de l'eau physiologique (Eau phy), du contenu caecal de lapins EOPS (CC EOPS), du surnageant de TEC 4 chauffé à 80°C (S 80°), et du surnageant de TEC4 non chauffé (S TEC4 NC). **B :** Evolution du GMQ chez des lapins témoins injectés en IV avec de l'eau physiologique (IV Eau phy) et chez des lapins injectés avec du surnageant de TEC4 non chauffé, respectivement en IV (IV S NC) ou en IP (IP S NC).



**3. Discussion**

L'ensemble de ces résultats confirme un effet négatif précoce (J1-J2 PI) de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4 sur la croissance, sans qu'aucune maladie ou même de signe clinique ne se développent ultérieurement. Ceci indique tout d'abord, que même si des virus sont présents dans le surnageant 8000 g, ils ne sont pas les agents primaires responsables de la phase aiguë de l'EEL, puisqu'ils n'entraînent pas de maladie. Ce point, capital sur le plan étiologique, est

renforcé aussi par des essais de centrifugation réalisés en gradients discontinus de saccharose. Il a été montré que la fraction surnageante, qui dans ce cas est présumée contenir tous les virus présents dans l'inoculum puisque il s'agissait dans ce cas d'une centrifugation faible vitesse (1780 g, pendant 20 min), n'a entraînée aucune maladie après essai de reproduction expérimentale "in vivo" (Szalo *et al.*, 2007). Quant au surnageant "40000g", qui lui est censé ne contenir aucun virus, il induit bien la chute

de GMQ précoce. Nous avons récemment obtenus des résultats similaires avec des centrifugations encore plus poussées (100000 g, pendant 1h) (données non publiées). Reste donc l'hypothèse d'une substance toxique soluble présente dans l'inoculum brut, que l'on retrouve, après centrifugation, dans la fraction surnageante. Rappelons que MR Popoff (Institut Pasteur) a été l'un des premiers à mettre en évidence un effet cytotoxique sur cellules Véro, de surnageants issus des inoculums INRA (en l'occurrence TEC1 et TEC2) (données personnelles).

Les injections parentérales du surnageant de TEC4 montrent que quelle que soit la voie d'administration (IV ou IP) la réponse est identique. L'effet est spectaculaire avec une chute du GMQ beaucoup plus prononcée que dans le cas d'une administration *per os* et plus synchrone pour tous les animaux. Ces résultats confirment que l'on a bien, dans la fraction correspondant au surnageant de TEC4 une substance qui induit une forte perturbation physiopathologique précoce. On ne la retrouve pas dans le caecum de lapins sain EOPS.

L'action de la chaleur est tout aussi remarquable. Nos résultats démontrent que la chaleur, dès lors qu'elle atteint 80°C et qu'elle est appliquée au moins pendant 10 min, soit à l'inoculum brut soit au surnageant, inactive totalement les effets de cette substance. Cette réponse concerne à la fois la chute précoce du GMQ, que l'on attribue pour notre part à une toxine (Fig. 2A et 2B), et la phase aiguë de la maladie imputable à la présence de l'agent pathogène dans l'inoculum (Fig. 2 A). Par contre à 65°C, la virulence de l'inoculum brut ou la chute précoce du GMQ observée avec la fraction surnageante, restent inchangées. Ces résultats confortent donc l'hypothèse toxine même si les 2 températures testées, qui constituent une fourchette entraînant une réponse de type "tout ou rien", ne permettent pas de conclure sur l'origine de cette toxine. A titre d'exemple la toxine botulinique (*Clostridium botulinum*) est inactivée par chauffage à 80°C pendant 30 min. A l'inverse les spores de cette bactérie, pour certaines souches, sont très résistantes : 80 min à 105°C et 7 min à 120°C (Euzeby, 2003). Certaines souches de *Clostridium perfringens* peuvent avoir un comportement semblable : les spores des souches thermorésistantes survivent plus d'1 h à 100°C alors que celles des souches thermosensibles sont détruites au bout de 10 min à 100°C (Weiss et Strong, 1967). Dans notre cas le chauffage à 80 °C semble inactiver la toxine, les spores, si elles existent et les formes végétatives. D'autres essais de températures et de durées seraient nécessaires si l'on voulait poursuivre dans cette voie.

Le fait qu'il y ait une bonne récupération des animaux après l'administration du surnageant est probablement lié à une détoxification très rapide de la substance

toxique par l'animal (rôle du foie ?). Dans le cas de l'administration de l'inoculum brut, les bactéries pathogènes présentes dans l'inoculum prennent le relais et induisent les effets pathologiques propres à l'EEL.

### Conclusion

Le fractionnement de l'inoculum TEC4 a permis d'étudier la fraction surnageante pour laquelle les éléments figurés sont éliminés (cellules, bactéries...). Les différents essais relatifs notamment aux injections parentérales et à l'effet de la chaleur confirment sans d'ambiguïté le rôle d'un produit toxique dans les phénomènes précoces observés après infection expérimentale (chute du GMQ à J1-J2). Il convient maintenant d'isoler, d'identifier et de caractériser cette "toxine" potentielle. L'idée étant que si l'on arrive à déterminer sa nature, c'est-à-dire l'identité moléculaire responsable de la toxicité, il devrait être possible de déterminer son origine voire d'identifier l'agent la produisant. Par ailleurs, on peut conclure que l'action directe et unique d'un virus dans la pathologie EEL (c'est-à-dire dans le développement de la phase aiguë de la maladie, associée à des signes cliniques) peut être totalement écartée.

### Références

- COUDERT P., LICOIS D., 2004. Study of early phenomena during experimental epizootic rabbit enteropathy: preliminary results. *Proc. 8th World Rabbit Congress*, Puebla, Mexique, 7-10/09/2004, 520-525, <http://www.dcam.upv.es/8wrc/>
- COUDERT P., LICOIS D. 2005. Epizootic rabbit enteropathy. Study of early phenomena with fresh inoculum and attempt at inactivation. *World Rabbit Sci.*, 13 : 229-238.
- EUZEBY J.P. 2003. *Clostridium botulinum, Cl. Argentinense, Cl. Baratii, Cl. Butyricum*. In Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/botulinum.html>
- LICOIS D., COUDERT P. 2005. Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4 : effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps. *11èmes Journ. Rech. Cunicole Fr.*, Paris, 29-30/11/2005, 265-268. ITAVI Ed., Paris.
- LICOIS D., WYERS M., COUDERT P. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36: 601-613.
- MARLIER D., DEWRÉE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H. 2003. L'Entéropathie Epizootique du Lapin: un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. *10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr.*, Paris, 19-20/11/2003, 247-250. ITAVI Ed., Paris
- SZALO I.M., LASSENCE C., LICOIS D., COUDERT P., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H., MARLIER D. 2007. : Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J.*, 173: 652-657.
- SYSTAT pour Windows. 1994. Version 5.04, Evanston, Illinois, Etats-Unis.
- WEISS K.F., STRONG D.H. 1967. Some properties of heat-resistant and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 93 : 21-26.