

Comparaison du pouvoir pathogène de deux souches de *E. coli* (sérotype 0103 Rh+ et sérotype non 0103) porteurs du gène « *eae* » après inoculation expérimentale chez le lapin EOPS.

S. BOUCHER¹, A. MOREL SAIVES², E. GUITTON³

¹LABOVET Conseil (Réseau Cristal) - ZAC de la Buzenière - BP 539 - 85505 Les Herbiers cedex, France

²LILLY France, Elanco Santé Animale, 13, rue Pagès, 92158 Suresnes, France

³INRA, PFIE, 37380 Nouzilly, France

Résumé. On considère habituellement que les *E. coli* O₁₀₃ pathogènes chez le lapin n'utilisent pas le rhamnose (Rh). Constatant en élevage de lapin de chair que l'isolement de *E. coli* O₁₀₃ Rh+ se faisait sur des lapins diarrhéiques présentant une entérotyphlite, les auteurs ont souhaité savoir si une telle bactérie, produisant de l'intimine, pouvait être pathogène. Pour cela ils ont réalisé 3 lots de lapins Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS). Un lot témoin non traité a été comparé à un lot inoculé avec la souche *E. coli* O₁₀₃ Rh+ *eae*+ et à un autre lot inoculé avec une souche de *E. coli* non O₁₀₃ mais *eae*+. Les auteurs montrent que la colibacillose « vraie » peut être imputée à une souche *E. coli* O₁₀₃ Rh+ *eae*+ et qu'une dégradation des performances est imputable à la souche coli NT *eae*+. La mortalité est significativement plus élevée dans le lot inoculé avec le *E. coli* O₁₀₃ (28,3% contre 3,3%), et les phénomènes de diarrhée significativement plus élevés dans les 2 lots inoculés (26% et 15% contre 0% pour le lot témoin). Les GMQ (Gains Moyens Quotidiens) de tous les lots inoculés sont significativement dégradés (26,5g/J et 40,2 g/j contre 49,3 g/j pour le lot témoin). L'IC (Indice de Consommation) n'est dégradé que pour le lot *E. coli* O₁₀₃. Les auteurs ont donc démontré que la recherche du gène *eae* pour la discrimination des colibacilles pathogènes est intéressante et proposent d'inclure sa recherche lors d'isolement de souches colibacillaires impliquées dans des cas cliniques de diarrhée en élevage.

Abstract. Comparison of the pathogenic power of two strains of *E. coli* (serotype 0103 Rh + and serotype not 0103) carrying the "eae" gene, after experimental inoculation on SPF rabbits. We usually consider that *E. coli* O103, pathogenic for rabbit, does not use the rhamnose (Rh). Noticing in rabbit farms that the isolation of *E. coli* O103 Rh + can be done on diarrheic rabbits presenting entero-typhlitis, the authors wanted to know if such a bacteria, producing intimin (*eae*+) could be pathogenic. To do so, they produced 3 groups of Specific Pathogen Free (SPF) rabbits. A control group was compared with an inoculated group with the strain *E. coli* O103 Rh + *eae* + and in another inoculated group with a strain of *E. coli* not O103 but *eae* +. The authors showed that colibacillosis can be imputed to a strain of *E. coli* O103 Rh + *eae* +. Mortality is significantly more important than in the inoculated group with *E. coli* O103 (28,3% vs 3,3%), and diarrhea is significantly higher in both inoculated groups (26% and 15% vs 0% for the control group). The ADG in both inoculated groups are significantly reduced (26.5g/d and 40.2 g/d vs 49.3 g/d for the control group). The FCR is degraded only for the *E. coli* O103 group. The authors demonstrated the implication of the *eae* gene in colibacillosis and suggest including it in diagnosis.

Introduction

Le lapin est sujet à la colibacillose qui s'exprime sous forme de diarrhées mortelles sur les lapins en bas âge, depuis la naissance jusqu'à l'âge de 8 à 10 semaines.

On distingue 2 types de colibacilloses :

- Les entérites colibacillaires (souvent dites « de sevrage ») dues à une prolifération anormale de *Escherichia coli*, naturellement présents en faible quantité, dans le tube digestif du lapereau en croissance.

- Les colibacilloses « vraies », dues à des types de colibacilles reconnus pathogènes (ex. *E. coli* O₁₀₃, O₁₅, O₁₀₉ etc.)

Les colibacilloses vraies à *E. coli* entéropathogènes ne touchent que les élevages dont les reproducteurs sont porteurs. Ces bactéries possèdent des facteurs de virulence. Chez le lapin, il s'agit de colibacilles dits « attachant effaçant » ou EPEC. Les colibacilles entéropathogènes possèdent en effet une adhésine localisée (EAF) permettant l'attachement aux cellules intestinales et la colonisation de l'iléon, du caecum et

du colon entraînant une entérotyphlite sévère (congestion intestinale et caecale) parfois hémorragique (Boucher et Nouaille 2002, Licois 1980 et 1992).

Le gène LEE code pour différentes protéines ayant une grande diversité de fonctions. La plupart d'entre elles sont sécrétées via un système de sécrétion de type III (TTSS). Dans la région centrale du LEE, le gène « *eae* » code pour une protéine de membrane externe, l'intimine qui se fixe sur son récepteur Tir (translocated intimin receptor) et établit ainsi un contact étroit entre la bactérie et l'entérocyte. Tir est sécrété par le TTSS et transloqué (injecté dans la cellule hôte) à travers la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'une "seringue moléculaire" qui comprend plusieurs effecteurs, EspA, EspB et EspD, (*E. coli* secreted proteins). Toutes ces protéines sont nécessaires pour activer un signal qui conduira aux lésions d'attachement-effacement et aux perturbations physiopathologiques associées à la diarrhée (Marches 2000).

La présence du gène *eae*, codant pour l'intimine, si elle n'indique pas directement la virulence de la souche de colibacille, est corrélée à la présence de lésions imputables à la colibacillose (Boucher et Morel Saives, 2009). La corrélation entre signes cliniques, lésions et présence du gène « *eae* » semble bien établie pour les *E. coli* de sérotype réputés pathogènes. Toutefois, des reproductions expérimentales de maladie sur lapins EOPS sont nécessaires pour affiner le lien entre pathogénicité et présence du gène « *eae* » pour d'autres colibacilles.

On considère habituellement que les *E. coli* O₁₀₃ pathogènes chez le lapin n'utilisent pas le rhamnose (*E. coli* O₁₀₃ Rh-) (Blanco et al. 1996, Milon 1993). Or, en élevage de lapin de chair l'isolement de *E. coli* O₁₀₃ Rh+ sur des lapins diarrhéiques présentant une entérotyphlite est une réalité. Ces colibacilles sont souvent porteurs du gène *eae*.

Dans ce cadre, l'objectif de l'étude présentée ici était de savoir si une telle souche O₁₀₃ Rh+, *eae*+, produisant de l'intimine, pouvait être pathogène. La pathogénicité d'une souche non sérotypable mais *eae* positive a également été testée.

1. Matériel et méthodes

1.1. Lieux d'élevage, alimentation, abreuvement

Les lapins sont élevés en cage à sol grillagé sur la Plate Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE) de l'INRA de Nouzilly (37380). Les animaleries destinées aux lapins sont agréées en date du 25 août 2009 sous le numéro B37 – 175 – 3.

Un cycle lumineux de 14/10h est appliqué. La ventilation est dynamique, l'air filtré. La température et l'hygrométrie sont mesurées quotidiennement. Les salles sont entièrement nettoyées et désinfectées avant l'entrée des animaux. Un contrôle d'efficacité de désinfection est effectué pour prouver l'absence de *E. coli* O103 dans le bâtiment avant inoculation et avant installation des animaux.

Les animaux sont répartis dans 3 salles différentes par 3 par cage. L'ordre de passage des animaliers dans les salles s'est toujours fait de la salle témoin aux salles contaminées 3 puis 2.

- salle 1 : témoins non traités (30 sujets dans une salle de 36 places)

- salle 2 : lapins inoculés avec O₁₀₃ Rh + *eae* + à tester (60 sujets dans une salle de 108 places)

- salle 3 : lapins inoculés avec un *E. coli* autre que les sérotypes réputés pathogènes ou assimilées à des marqueurs (60 sujets dans une salle de 72 places)

L'eau a été donnée à volonté. Elle n'a pas été traitée par un antiseptique ou un antibiotique. L'aliment fut un aliment habituellement utilisé pour les animaux EOPS de l'INRA, garanti par le fabricant sans antibiotique et sans contaminant bactérien. Les animaux n'ont pas été rationnés.

1.2. Animaux

150 lapins EOPS mâles de souche Hy+ ont été fournis

par la société Hypharm, arrivant à Tours en provenance du site de La Corbière (49 Roussay) à l'âge de 29 jours. Ils sont tous tatoués individuellement et sont livrés par 5 dans des caisses de transport filtrées. Ils ont en outre été bouclés le jour de leur arrivée et ont été acclimatés durant 7 jours avant inoculation.

1.3. Analyses de laboratoire

Les *E. coli* sont identifiés au laboratoire Labovet Analyses par culture de la bactérie sur boîtes de pétri (Columbia et Drigalski) en bactériologie systématique conventionnelle suivie d'une galerie de tests biochimiques. Les *E. coli* sont Urée – Indole + Glucose + Lactose + H₂S- (Boucher, 2009).

Une numération colibacillaire est faite parallèlement. Le sérotypage se fait dans un premier temps par agglutination rapide sur lame à partir de deux sérums de provenance différente pour chaque sérotype et restreints à O₁₀₃ – O₂ – O₁₅ – O₈₅ – O₁₂₈ – O₁₀₉.

Pour les O₁₀₃, un test rhamnose est réalisé. Les sérotypes O₁₀₃ et O₁₅ sont contrôlés une troisième fois par une technique d'agglutination lente par le laboratoire Biovac.

Les tests PCR sont réalisés suite à l'identification par le laboratoire Labofarm par amplification spécifique de la séquence « *eae* ». La séquence des amorces utilisées a été déterminée par alignement de séquences de gènes codant pour « *eae* », disponibles dans les bases de données. Le test a été validé sur des souches d'*E. coli* positives vis-à-vis de « *eae* », la spécificité du test a été vérifiée vis à vis d'autres souches d'*E. coli* ne possédant pas le gène « *eae* ».

1.4 Agents pathogènes testés et inoculation

Tableau 1 : répartition et dose des inoculas

salle No.	traitement	dose	Dose inoculée
1	Sérum		500
	physiologique		µL/lapin
2	O ₁₀₃ Rh+ <i>eae</i> +	10 ⁷ bactéries	500
		par lapin	µL/lapin
3	<i>E. coli</i> non O ₁₀₃	10 ⁷ bactéries	500
	<i>eae</i> +	par lapin	µL/lapin

L'inoculation de 0,5 ml de suspension bactérienne aux lapins s'est faite individuellement par voie orale à l'aide d'une seringue atraumatique non montée de 1 ml placée entre la joue et les dents. L'expérimentateur a attendu la déglutition à chaque inoculation.

1.5. Observations

Les animaux sont observés durant 23 jours. La mortalité est notée quotidiennement et les lapins morts sont congelés pour analyse ultérieure. Les signes cliniques de maladie (diarrhée, déshydratation) sont relevés chaque jour pour chaque animal. Les animaux sont pesés et leur consommation de granulés est mesurée tous les 3 jours.

1.5. Tests statistiques

Les tests sont réalisés avec le logiciel Epi Info (v 3.5.1), par la société Ekipaj.

Variables quantitatives (Masse, GMQ, IC)

L'existence d'une différence significative globale entre les trois lots est tout d'abord étudiée par analyse de variance (ANOVA) dont le p est donné. Cependant, dans de nombreux cas, le test de Bartlett montre que les variances ne sont pas égales entre les lots. S'il y a une différence significative globale, les lots sont comparés deux à deux avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney/Wilcoxon. Les résultats sont exprimés par le p.

Variables qualitatives (Mortalité, occurrence de diarrhée)

Les lots sont comparés deux à deux avec le test exact de Fischer dont le p est donné.

2. Résultats

2.1. Mortalité et lésions

- 17 morts sur le lot *E. coli* O₁₀₃Rh+*eae*+, salle 2
- 9 malades euthanasiés en fin d'essai sur le lot *E. coli* autre, salle 3
- 1 mort sur le lot témoin, salle 1.

La mortalité sur l'ensemble de l'essai du lot *E. coli* O₁₀₃Rh+*eae*+, est différente de celles des lots témoin et *E. coli* « autre » *eae*+, qui ne sont pas différents entre eux. Dans le lot *E. coli* O₁₀₃ *eae*+, la mortalité débute à J16 et est maximale à J22

Tableau 2 : Lésions et mortalités

	morts	diarrhée
Salle 1 témoin	1 (3,3%)	0
Salle 2	17 (28,3%)	26 (43,3%)
<i>E. coli</i> O ₁₀₃ Rh+ <i>eae</i> +		
Salle 3	9 euthanasiés	15 (25%)
<i>E. coli</i> autre <i>eae</i> +	(0 mort)	

Les signes cliniques de maladie ont été relevés chaque jour pour chaque animal (diarrhée). 9 lapins du lot *E. coli* « autre » *eae*+ ont présenté de la diarrhée et des signes de déshydratation nécessitant leur euthanasie, conformément aux souhaits du Comité d'éthique. Ils seraient probablement morts quelques jours plus tard.

On considère comme variable le fait d'avoir eu ou non au moins 1 jour avec de la diarrhée sur la durée de l'essai. Les trois lots sont significativement différents entre eux, le lot *E. coli* autre *eae*+ étant plus atteint que le lot témoin et le lot *E. coli* O₁₀₃Rh+ *eae*+ plus que le lot *E. coli* autre *eae* +.

2.2. Vitesse de croissance

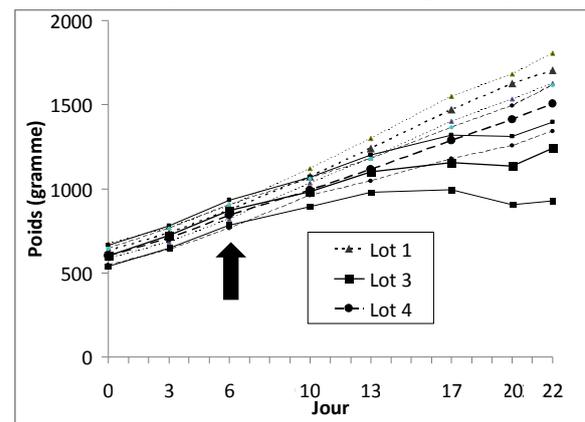
Les masses des lapins ont été mesurées en grammes, conformément au protocole. Les quantités d'aliment ingérées ont été notées par les animaliers salle par salle en vue de calculer des gains moyens quotidiens (GMQ) exprimés en grammes.

Tableau 3 : GMQ moyen et écart type

	GMQ moyen (g) ± Ecart type	Mini – Maxi (g)
Salle 1 témoin	49,3 ± 4.1	37,4 / 55,5
Salle 2	26,5 ± 10.7	3,1 / 45
<i>E. coli</i> O ₁₀₃ Rh+ <i>eae</i> +		
Salle 3	40,2 ± 6.7	22,9 / 54,4
<i>E. coli</i> autre <i>eae</i> +		

Les GMQ des trois lots sont très significativement différents entre eux.

Figure 1 : Courbe de croissance des lapins vivants en fin d'essai (Médiane, 1^{er} et 3^{eme} quartile)



La différence de croissance entre les lots est significative tant sur la moyenne que la médiane des GMQ. En ce qui concerne l'homogénéité (représentée par les écarts-interquartiles) : l'écart de GMQ entre le 1^{er} et le 3^{eme} quartile est important dans le lot inoculé *E. coli* O₁₀₃Rh+ *eae*+, moyen dans le lot inoculé *E. coli* autre *eae*+ et inexistant dans le lot témoin.

Tableau 4 : comparaison des GMQ entre témoin et inoculé et pertes sur 23 jours

	Différence GMQ témoin / inoculé	Perte sur 23 jours
Salle 2	22,8 g/j	524,4 g
<i>E. coli</i> O ₁₀₃ Rh+ <i>eae</i> +		(maxi 1205 g)
Salle 3	9,1 g/j	209,3 g
<i>E. coli</i> autre <i>eae</i> +		(maxi 750 g)

2.3. Indice de consommation

L'indice de Consommation calculé est un IC technique, c'est-à-dire que la masse des animaux morts est prise en compte au dénominateur. Il s'agit de la dernière masse mesurée. La consommation alimentaire étant connue à la cage, l'unité pour le calcul est la cage.

L'IC du lot *E. coli* O₁₀₃Rh+ *eae*+ est plus mauvais que ceux des lots témoin et *E. coli* autre *eae*+ qui ne sont pas différents entre eux.

Tableau 5 : Indice de consommation moyen et écart type

	IC moyen ± Ecart type	Mini – Maxi
Salle 1 témoin	2,37 ± 0.09	2,24 / 2,51
Salle 2 <i>E. coli</i> O ₁₀₃ Rh+ <i>eae</i> ⁺	3,64 ± 1.33	2,22 / 7,42
Salle 3 <i>E. coli</i> autre <i>eae</i> ⁺	2,43 ± 0.1	2,23 / 2,65 (comparable au lot 1)

3. Discussion

On constate une dégradation progressive de l'état sanitaire des lots inoculés avec les deux colibacilles, en comparaison avec le lot témoin non inoculé, la dégradation du lot *E. coli* O₁₀₃Rh+ *eae*⁺ étant plus marquée que celle du lot *E. coli* autre *eae*⁺

Une évaluation économique de l'impact zootechnique de la colibacillose dans les 2 cas peut être menée. On peut évaluer le coût de la mortalité pour chaque lot (Morel Saives et Limet 2007), en prenant en compte les lapins euthanasiés dans le lot *E. coli* autre *eae*⁺ comme une perte par mortalité pour l'éleveur. Considérant que la perte de la vente d'un lapin mort en cours de bande représente 4,02€ et que la perte due à son coût de production est de 0,73 €, le coût total de la perte s'élève à 4,75 €. L'évaluation d'une perte de 100g de poids moyen à la vente représente 0.164 €. La consommation potentielle de cette masse de 100g de lapin coûte 0.06 €. Le manque à gagner est donc de 0,104€ pour 100g de perte de masse.

Tableau 6 : coût estimé de la mortalité

Différence avec le lot témoin	mortalité	Masse abattoir	total
Du lot inoculé <i>E. coli</i> O ₁₀₃ Rh+ <i>eae</i> ⁺	25 %	525 G	1.72 €/lapin
Du lot inoculé <i>E. coli</i> autre <i>eae</i> ⁺	12%	210 G	0.78 €/lapin

Dans notre étude, pour 100 lapereaux arrivant en engraissement le coût d'un épisode colibacillaire serait donc de 78 € à 172 €.

Une question majeure demeure : la différence entre les souches étudiées est-elle strictement due au seul gène *eae* ? Pour le démontrer de façon rigoureuse, il faudrait avoir recours à des *E. coli* mutants, exprimant ou non un gène *eae* fonctionnel, avec le même fond génétique par ailleurs.

Il n'en demeure pas moins que, si une généralisation semble hasardeuse, dans le cas de cette expérimentation, nous pouvons dire que la souche de *E. coli* O₁₀₃ Rh+ *eae*⁺ étudiée et sans doute aussi la souche *E. coli* NT *eae*⁺ sont pathogènes.

Conclusion

Une souche *E. coli* O₁₀₃Rh+ *eae*⁺, jusque là considérée comme non pathogène est bien montrée pathogène, par sa capacité à déclencher, après inoculation, des symptômes et des lésions caractéristiques de la colibacillose « vraie » du lapin. Cette étude nous permet en outre de considérer les *E. coli* « *eae*⁺ » comme potentiellement pathogènes, en raison de l'impact clinique et zootechnique démontré dans cette étude.

Si elle est appuyée sur une analyse clinique des diarrhées et sur une numération et un sérotypage de la souche de colibacille impliquée, la recherche du gène « *eae* » pourrait être un moyen de discriminer les souches d'*E. coli* potentiellement pathogènes des souches apathogènes et se révèle un bon complément pour l'établissement du diagnostic.

Remerciements

Remerciement à Vincent Auvinne de la société Ekipaj, pour l'analyse statistique de l'étude et son aide à la relecture et à Marie Andrée Briffaud de la société Labovet Analyse pour l'expertise technique en bactériologie conventionnelle.

Références

- BLANCO J. E. ; BLANCO M. ; BLANCO J. ; MORA A. ; BALAGUER L. ; MOURINO M. ; JUAREZ A. ; JANSEN W. H., 1996. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J Clin Microbiol.* 34(12):3101-7.
- BOUCHER S., MOREL SAIVES A., 2009. Intérêt de la recherche du gène « *eae* » chez des *E. coli* de lapins d'élevage présentant des lésions attribuables à la colibacillose. 13^e Journées de la Recherche Cunicole 17 et 18 novembre La Mans France
- BOUCHER S. BULLIOT C., DOUMERC G., FERREIRA X., LEMBERGER K., MENTRE., NICOLIER A., PERICARD JM., QUINTON JF., RISI E., TESSIER E., 2009. Les examens complémentaires chez les NAC. Editions du Point vétérinaire, 1^{ère} éd. P 75 à 79.
- BOUCHER S., NOUAILLE L., 2002. Manuel pratique des maladies des lapins. France Agricole 2^e éd. p 46 – 55.
- LICOIS D. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli* from the rabbit. *Annals of veterinary research.* 23(1):27-48
- LICOIS D. MONGIN P. 1980. An hypothesis of the pathogenesis of diarrhoea in the rabbit based on a study of intestinal contents. *Reproduction, nutrition, development.* 20(4B):1209-16.
- MARCHÈS O., NOUGAREYDE JP., BOULLIER S., MANIL J., CHARLIER G., RAYMOND I., POHL P., BOURY M., DE RYCKE J., MILON A., OSWALD E., 2000. Role of tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect Immun.* 68(11):6472-7
- MILON A. 1993. Entérite à *Escherichia coli* O103 du lapin: étude des facteurs de virulence des souches O103 pathogènes et applications à la vaccination. Thèse Discipline : Microbiologie N° 93 LYO1 0051.
- MOREL-SAIVES A, LIMET A, 2007 Evaluation de l'impact technico-économique des maladies digestives chez le lapin d'engraissement. Intérêt de la mise en place d'un traitement. 12^e Journées de la Recherche Cunicole 27 et 28 novembre La Mans France