

Caractérisation physiopathologique et microbiologique d'entéropathie non spécifique chez le lapin en croissance – premiers résultats.

M. KIMSE¹, S. COMBES¹, L. FORTUN-LAMOTHE¹, L. CAUQUIL¹,
V. MONTEILS², C. BAYOURTHE², T. GIDENNE¹

INRA, UMR1289 TANDEM BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan, France

¹ adresse actuelle: Université Abobo-Adjamé, Laboratoire de Biologie et de Cytologie Animale, 02 BP 801
Abidjan 02, Côte d'Ivoire

² adresse actuelle: VetAgro Sup, Campus Agronomique de Clermont, BP35, 63370 Lempdes

Résumé. Cette étude a pour but d'analyser les variations du symbiote (par empreinte moléculaire) et du biotope caecal, en parallèle du niveau inflammatoire général (mesuré *via* la concentration en haptoglobine sérique), chez des lapins en croissance (35 à 58j d'âge) sains (n=80) ou atteints (n=17) d'entéropathie non spécifique. Lors d'un épisode diarrhéique, la concentration sérique en haptoglobine double (1,53 vs 2,92 mg/L, P<0,01), l'acidité du milieu caecal baisse (+ 0,6 unités pH; P<0,01) tandis que le potentiel redox est augmenté (+20 mV, P<0,05). Le poids du cæcum, sa teneur en matière sèche, sa concentration en acides gras volatils, en acétate et en NH₃ baissent de moitié (P<0,01). La teneur en butyrate (C₄) chute de 75% chez le lapin diarrhéique (P<0,01), et conduit à une inversion du rapport C₃/C₄. En revanche, la structure (R-ANOSIM=-0,02 ; P=0,2) et l'index de biodiversité (4,7) de la communauté bactérienne majoritaire ne sont pas significativement modifiés.

Abstract: Physiological and microbiology characterisation of non specific enteropathy in the growing rabbit – first results. This work aimed to analyze the caecal biotope and biocenosis (molecular profiling), and the inflammation level (measured via seric haptoglobin concentration). Measurements were performed in the growing rabbit (35-58d old) either healthy (n=80) or affected (n=17) by a non specific enteropathy. During an acute episode of diarrhoea, the serum haptoglobin doubled (1.53 vs. 2.92 mg / L, P <0.01). The caecal acidity decreased (+ 0.6 pH units, P <0.01) while the redox potential increased slightly (+20 mV, P <0.05). The weight of the caecum, the dry matter content, the concentration of volatile fatty acids acetate and NH₃ half decreased (P <0.01). The butyrate level dropped by 75% for the diarrheic rabbit (P <0.01), and led to a reversed C₃/C₄ ratio. However, the structure (R-ANOSIM=-0.02; P=0.2) and biodiversity index (4.7) of the major bacterial community were not significantly altered.

Introduction

Les troubles digestifs sont les maladies les plus fréquentes du lapin en croissance et conduisent à des taux parfois élevés de mortalité et de morbidité. Certains agents pathogènes spécifiques (*E coli* entéropathogènes, coccidies, ...) sont identifiables (Licois et Marlier, 2008), mais les signes cliniques lors de troubles digestifs sont souvent peu spécifiques (Licois, 2008), et l'analyse bactériologique pratiquée sur les animaux morts conclue souvent à une absence d'agent responsable, et à une dysbiose caecale ou intestinale sous l'influence de facteurs externes (alimentation, environnement d'élevage, Peeters *et al.*, 1995; Gidenne et Licois, 2005; Kimsé, 2009). Le présent travail a pour but d'utiliser les nouvelles méthodologies en physiologie et en microbiologie pour caractériser plus précisément l'écosystème caecal et tenter de définir la notion de dysbiose, en comparant des lapins en croissance sains ou bien atteints d'entéropathie non spécifique, issus d'une étude précédente (Kimsé *et al.*, 2009a).

1. Matériel et méthode

1.1. Animaux et schéma expérimental

Cent soixante huit (168) lapereaux issus d'un croisement entre les femelles INRA 9067 issues du croisement entre les souches INRA1077 et INRA2066) et les mâles Zika® ont été sevrés à 28

jours, logés en cages collectives à raison de 6 par cage, et répartis en 4 groupes, nourris à volonté jusqu'à 58 jours d'âge (Kimsé *et al.*, 2009a), avec un aliment "DF0" déficient en fibres (tableau 1), ou témoin (T0), et contenant ou non 10 g de levures (Biosaf®) par kg d'aliment (DF10, T10, avec 10⁷ UFC/g de matière sèche). Le poids individuel et l'ingestion (par cage) ont été mesurés 2 fois par semaine. Six animaux morts ont été adressés à un laboratoire vétérinaire pour analyses bactériologiques et parasitologiques. Les animaux n'ont reçu aucun traitement médicamenteux pendant l'expérience.

1.2. Prélèvements

Les prélèvements de sang et de contenu caecal ont été réalisés d'une part, sur 20 lapins ne présentant aucun signe clinique de maladie par groupe (DF et T), à 36 et à 58 jours, et d'autre part, sur 17 lapins en phase de diarrhée aiguë et profuse (tableau clinique de type colibacillaire). Après anesthésie (injection intramusculaire de xylazine et kétamine), puis euthanasie (injection intracardiaque létale de T61®), le cæcum entier des animaux a été retiré et pesé, et les échantillons de contenu caecal stockés à -20°C.

1.3. Mesure du taux d'haptoglobine sanguin

Les prélèvements sanguins pour le dosage de l'haptoglobine ont été réalisés avant l'anesthésie, à la veine marginale ou à l'artère principale de l'oreille. Le sang a été collecté dans un tube stérile en verre de

5 ml bouchonné (Venoject® Terumo®), sous vide contenant un anticoagulant (EDTA K3). Les tubes sont conservés à 4°C pour la durée des prélèvements (env. 1 heure), puis centrifugés à 1500G. Le surnageant (plasma) est conservé à -20°C jusqu'à analyse de la concentration en haptoglobine par spectrophotométrie (kit Phase™, Abcys SA).

Tableau 1: Ingrédients et composition chimique des aliments expérimentaux

Ingrédients (g/kg)	T	DF
Son de blé	280	45
Blé tendre	125	546
Luzerne	340	70
Paille de blé	31	20
Tourteau de soja	69	180
Tourteau de tournesol	52	62
Pulpe de betterave	80	20
Huile végétale	10	0
Sucre	0	30
Minéraux et prémix	13	27
Composition chimique (g/kg MS)		
Amidon	162	364
Protéines brutes	185	222
NDF	374	201
ADF	187	87
ADL	47	21
Prot. Digestible*	115	140
*ED (Kcal/kg)	2335	2860

*Valeurs obtenues par calcul

1.4. Caractérisation du biotope et du symbiote.

Les mesures de pH et de potentiel redox (E_h) ont été effectuées, *in vivo* sur animal anesthésié (Kimsé *et al.*, 2009b). Les dosages d'acides gras volatils (AGV) et d'azote ammoniacal (NH_3) ont été réalisés selon Martignon *et al.* (2010). Le symbiote a été caractérisé par empreinte moléculaire (CE-SSCP) après extraction et amplification de l'ADN bactérien codant pour l'ARN16S à partir d'échantillons de contenu caecal (Michelland *et al.*, 2010).

1.5. Analyses statistiques

Les variables continues (pH, AGV, etc.) ont été analysées par analyse de variance (procédure GLM de SAS), tandis que les variables dicrètes (mortalité) ont été analysées selon la procédure CATMOD (SAS). Les profils bactériens ont été analysés à l'aide du package StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009) du logiciel statistique R, avec une comparaison 2 à 2 en utilisant la distance euclidienne. La structure du microbiote caecal a été représentée graphiquement par non-Metric Multidimensional Scaling (nMDS). L'ANOSIM (Analyse of Similarities) a permis de tester le degré de similarité « R-ANOSIM » entre le profil CE-SSCP des animaux sains et des animaux morbides. Lorsque P est significatif ($P < 0,05$) et R-ANOSIM supérieur à 0,25, les structures des communautés bactériennes des groupes étudiés sont considérées comme différentes. La différence augmente avec la valeur de R-ANOSIM (jusqu'à R-

ANOSIM=1). Les paramètres caractérisant le symbiote et le biotope ont d'abord été analysés pour l'effet du groupe (T vs DF) et de l'âge (36 vs 58j) chez les animaux sains. L'absence d'interactions entre ces 2 facteurs (Kimsé *et al.*, 2009) permet de grouper les valeurs des animaux sains et de les comparer à celle des animaux malades.

2. Résultats

Entre 28 et 56 jours d'âge, la mortalité et la morbidité sont modérées (resp. 7,0 et 12,6% en moyenne, Kimsé *et al.*, 2009) et ne diffèrent pas significativement entre les 2 groupes T et DF. Le symptôme principal de ces troubles digestifs est la diarrhée aiguë et profuse, associée à une baisse de l'ingestion et de la croissance. L'autopsie révèle un contenu caecal liquide, et des organes digestifs parfois dilatés (intestin grêle) et/ou enflammés (intestin grêle et/ou cæcum/ côlon). Le faible taux de mortalité et la faible contamination interindividuelle orientent le diagnostic vers des entéropathies peu spécifiques. L'analyse bactériologique et parasitologique des animaux diarrhéiques (n=6) a révélé une recrudescence d'*E. coli* non pathogènes dans 2 cas (*E. coli* O2), et aucune infection coccidienne.

2.1. Impact d'une entéropathie sur le taux d'haptoglobine sérique, et les paramètres du biotope caecal.

La concentration en haptoglobine sérique ne varie pas en fonction du régime (1,53 mg/L) chez le lapin sain, mais elle double chez l'animal atteint d'entéropathie (2,92 mg/L, $P < 0,01$), confirmant ainsi la validité de ce paramètre pour estimer l'état inflammatoire général.

Le poids du cæcum des lapins diarrhéique est environ 20% plus faible que celui des lapins sains ($P < 0,05$; tableau 2), en lien avec l'arrêt de la consommation d'aliment chez les animaux morbides, tandis que le taux de MS du contenu caecal baisse de moitié chez les animaux malades ($P < 0,01$). Comparé à l'animal sain, le pH caecal des animaux morbides est supérieur de 0,6 unité ($P < 0,01$), traduisant donc un milieu moins acide. En parallèle, l' E_h caecal augmente de 20 mV ($P = 0,02$) lors d'entéropathie, traduisant un milieu légèrement moins anaérobie. La teneur caecale en AGV est de 80 mm/L chez l'animal sain (Kimsé, 2009), elle est réduite de 20 % pour le groupe DF (73 vs 92 mm/L, $P < 0,05$) mais sans modification importante du profil fermentaire, ou de la concentration en ammoniac. En revanche, chez l'animal diarrhéique, la concentration caecale en AGV s'effondre (42 mM) accompagnée d'un doublement du ratio C_3/C_4 (tableau 2), et d'un doublement de la teneur en ammoniac.

2.2. Impact d'une entéropathie sur le symbiote caecal.

Chez le lapin sain, la biodiversité (indice de Simpson) et la structure de la communauté bactérienne caecale restent stables entre 28 et 58 jours d'âge; ces deux paramètres ne diffèrent pas non plus selon le régime (DF ou T, Kimsé, 2009).

Chez l'animal diarrhéique, l'indice de biodiversité n'est pas modifié significativement (figure 1), ni la structure de la communauté bactérienne, représentée par le nMDS (Figure 2) (R-ANOSIM=-0,02 ; P=0,2). La similarité des profils SSCP de la communauté bactérienne caecale des lapins morbides et sains, atteint 96%.

Tableau 2: Caractéristiques du biotope caecal en fonction du statut sanitaire du lapin.

	Statut sanitaire		ETR**	P>F
	Morbide	Sain		
Poids du cæcum plein (g frais)	95	121	46,9	<0,05
Matière sèche, %	12,1	23,3	3,1	<0,01
pH	6,49	5,89	0,4	<0,01
Redox, E _h (mV)	-170	-190	32	0,02
AGVt (mM)	42,0	79,7	20,9	<0,01
C ₂ (mM)	33,0	61,7	16,9	<0,01
C ₃ (mM)	5,3	5,0	2,1	0,59
C ₄ (mM)	3,4	12,5	5,8	<0,01
NH ₃ (mM)	26,0	11,5	8,1	<0,01

*: lapins atteints d'entéropathies (diarrhée aiguë et profuse);
 **: ETR: écart type résiduel.

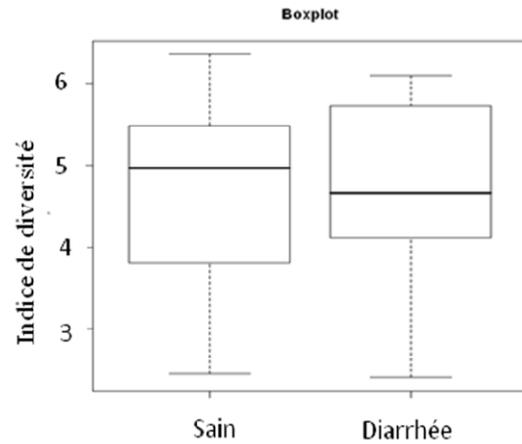
3. Discussion

En accord avec Bennegadi *et al.* (2004), nous confirmons qu'une entéropathie entraîne des perturbations profondes du biotope caecal, dont une alcalinisation du milieu, en lien avec la baisse de la concentration en AGV, et une hausse de l'ammoniac. De plus, le milieu caecal deviendrait moins anaérobie, et donc moins favorable aux bactéries commensales, suggérant une réduction de leur effet barrière. Néanmoins, ces perturbations du biotope caecal causeraient peu de modifications de la composition bactérienne du symbiote, au moins pour les espèces majoritaires, dont le profil de structure est similaire à 96% entre les lapins morbides et sains. En effet, la mesure d'empreinte moléculaire permet l'obtention d'un profil bactérien basé sur les espèces majoritaires, et ne permet pas de détecter plus de 40 phylotypes différents.

Ainsi, lors d'une infection expérimentale d'EEL, il a été montré une réduction des *bacteroides* (qPCR) et une modification des espèces de *bacteroides* présentes (SSCP, Combes *et al.*, 2009). En outre, il est possible que les archées (non mesurées ici), dont la concentration s'accroît après le sevrage (moins de 15%), puisse jouer un rôle dans l'établissement d'une dysbiose caecale (Combes *et al.*, 2011). Il est également possible que certaines bactéries peu représentées, notamment les bactéries fibrolytiques qui ne représenteraient que 5% du microbiote (Gidenne *et al.*, 2008), puisse jouer un rôle. Il conviendrait donc de compléter ces premiers résultats par une approche plus quantitative (qPCR), pour

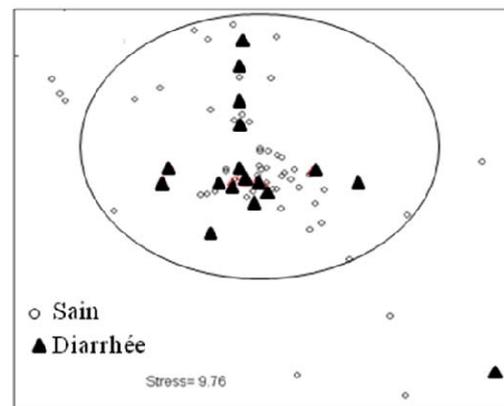
certaines familles bactériennes et d'archées, et portant sur un nombre plus élevé de cas de dysbioses caecales.

Figure 1: Indice de biodiversité* de la communauté bactérienne caecale, en fonction du statut sanitaire.



*indice de Simpson, ETR=0,98 ; P=0,55.

Figure 2 : La structure de la biocénose bactérienne caecale ne diffère pas en fonction du statut sanitaire*.



*diarrhée = diarrhée aiguë et profuse; sain=absence de maladie apparente ; un point correspond à un échantillon prélevé entre le sevrage et 58 jours

En parallèle de paramètres de l'écosystème caecal nous avons associé un indicateur de l'inflammation générale, via la mesure d'une protéine de l'inflammation générale: l'haptoglobine. Les concentrations obtenues dans cet essai sur les lapins sains sont similaires à celles observées par Kimsé (2009) et par Le Floc'h *et al.* (2004) respectivement chez les lapins et chez les porcelets élevés dans des conditions sanitaires optimales (1,5 mg/ml). Nous montrons pour la première fois chez le lapin, que la concentration sanguine en haptoglobine double chez l'animal atteint d'une entéropathie. Ceci suggère que ce paramètre est un bon indicateur du statut sanitaire ou de stress "inflammatoire" chez le lapin en croissance. De même, chez la vache (Genheim *et al.*,

2007; Nikunen *et al.*, 2007) et chez le porc (Melchior *et al.*, 2002; Le Floc'h *et al.*, 2004), infectés respectivement par *Pasteurella multocida* ou *Mycobacterium tuberculosis*, la concentration d'haptoglobine sérique double ou triple dans le sang des animaux infectés. Cependant, la variabilité est importante (coefficient de variation ou CVr= 26%). D'autres auteurs ont obtenu une variabilité de 50% et plus chez le lapin (Kimsé, 2009) et chez le porcelet (Le Floc'h *et al.* 2004).

Conclusion

Le lapin atteint d'une entéropathie non spécifique présente un niveau élevé d'inflammation générale, associé à une profonde modification du biotope caecal. En revanche, la diversité et la structure communauté bactérienne majoritaire semble globalement peu affectée. En perspective, il convient de compléter ces résultats préliminaires par des mesures quantitatives de certaines familles de bactéries, pour affirmer le lien entre dysbiose et entéropathie non spécifique, et ainsi bâtir des stratégies de prévention.

Remerciements

Nous remercions Mrs Aymard, De Dapper et Richard (INRA UMR 1289 Tandem) pour leur aide technique et les soins aux animaux.

Références bibliographiques

- BENNEGADI-LAURENT N., GIDENNE T., LICOIS D., 2004. Nutritional and sanitary statuses alter postweaning development of caecal microbial activity in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139, 293-300.
- COMBES S., NICE F., LICOIS D., FORTUN-LAMOTHE L., GIDENNE T., 2009. Response of digestive bacterial community of rabbits after experimental infection of epizootic enteropathy syndrome (ERE). *In Proc.: 13ème J. Rech. Cunicoles*, G. Bolet (Ed), 17 & 18 nov. 2009, Le Mans, France, pp227-230.
- COMBES S., MICHELLAND R., MONTEILS V., CAUQUIL L., SOULIE V., TRAN U., GIDENNE T., FORTUN-LAMOTHE L., 2011. Post-natal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiology Ecology*, sous presse.
- GENHEIM C., ALENIUS S., PERSSON WALLER K., 2007. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *The Veterinary Journal* 173, 645-651.
- GIDENNE T., LICOIS D., 2005. Effect of a high fibre intake on the resistance of the growing rabbit to an experimental inoculation with an enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Animal Science* 80, 281-288.
- GIDENNE T., COMBES S., CARABAÑO R., BADIOLA I., GARCIA J., LICOIS D., 2008. Ecosystème caecal et nutrition du lapin: interactions avec la santé digestive. *INRA Production Animale* 21, 239-250.
- KIMSE M., 2009. Caractérisation de l'écosystème caecal et santé digestive du lapin: contrôle nutritionnel et interactions avec la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000752/>)
- Kimsé M., Combes S., Cauquil L., Bayourthe C., Monteils V., Gidenne T., 2009a. Impact of a dietary fibre deficiency on the caecal ecosystem of the young rabbit. Modulation by yeast probiotics. *In Proc.: 13ème J. Rech. Cunicoles*, Bolet G. (Ed.) 17 & 18 nov. 2009, Le Mans, France, ITAVI, Paris., pp10-13.
- KIMSE M., MONTEILS V., BAYOURTHE C., GIDENNE T. 2009b. A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit caecum: Relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Science* 17, 63-70.
- LE FLOC'H N., JONDREVILLE C., MELCHIOR D., SEVE B., MATTE J., 2004. Impact du statut sanitaire en post-sevrage sur les performances de croissance et les niveaux plasmatiques d'acides aminés, de minéraux et de vitamines. *In Journées Recherche Porcine*, pp. 159-164.
- LICOIS D., MARLIER D., 2008. Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Prod. Anim.* 21, 257-268.
- MARTIGNON M.H., COMBES S., GIDENNE T. 2010. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156: 156-162.
- MELCHIOR D., SEVE B., LE FLOC'H N., 2002. Conséquences d'une inflammation chronique sur les concentrations plasmatiques d'acides aminés chez le porcelet : Hypothèses sur l'implication du tryptophane dans la réponse immunitaire. *In Journées de la Recherche Porcine*, pp. 341-347.
- MICHELLAND R.J., COMBES S., MONTEILS V., CAUQUIL L., GIDENNE T., FORTUN-LAMOTHE L., 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* 16, 61-65.
- MICHELLAND R.J., DEJEAN S., COMBES S., LAMOTHE L., CAUQUIL L., 2009. Statfingerprint: a friendly graphical interface program for microbial fingerprint profiles processing and analysis. *Molecular Ecology Resources* 9, 1359-1363.
- NIKUNEN S., HÄRTEL H., ORRO T., NEUVONEN E., TANSKANEN R., KIVELÄ S.L., SANKARI S., AHOG P., PYÖRÄLÄ S., SALONIEMI H., SOVERI T., 2007. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 30, 143-151.
- PEETERS J.E., MAERTENS L., ORSENIGO R., COLIN M., 1995. Influence of dietary beet pulp on caecal VFA, experimental colibacillosis and iota-enterotoxaemia in rabbits. *Anim. Feed Science and Technology* 51, 123-139.