

Réponse digestive du lapereau à une inoculation expérimentale colibacillaire (O128:C6) en fonction du niveau d'ingestion

M.H. MARTIGNON^{1,2}, D. LICOIS³, L. CAUQUIL², M. AMELOT⁴, S. COMBES²,
E. REPERANT¹, G. POSTOLLEC¹, T. GIDENNE² ET C. VALAT¹

¹ Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Alimentation Animale, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

² INRA, INPT ENSAT, ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ INRA, UR 1282, IASP, bât.213, F-37380 Nouzilly, France

⁴ Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Service d'Élevage et d'Expérimentation en Pathologie Aviaire, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

Résumé - Afin d'étudier l'effet de la restriction alimentaire sur une colibacillose après sevrage (28j), 180 lapins ont été répartis en 4 lots (n = 45/lot), selon deux facteurs (infection, niveau d'ingestion) à deux niveaux, qui sont : T100=lapins non infectés et *ad libitum*, T75 = non infectés et restreints, I100 = infectés et *ad libitum*, I75 = infectés et restreints. L'infection a été réalisée par inoculation orale de $2,2 \times 10^8$ UFC/animal d'*E. coli* O128:C6, à 31j d'âge (J0). Dans les 4 jours suivant l'inoculation, une baisse de croissance significative est observée. Puis, les signes cliniques (diarrhée et/ou ballonnements et/ou prostration) sont observés entre 3 et 6 jours post-inoculation (pi). Aucune mortalité n'a été constatée. Le pic d'excrétion fécale d'*E. coli* O128:C6 a été observé 4 jours pi pour les deux lots infectés. La restriction alimentaire n'a pas amélioré significativement l'état sanitaire des animaux infectés.

Abstract - Digestive response of young rabbit to an experimental inoculation of *E. coli* (O128:C6), depending on feed intake level. In order to study feeding restriction effects on a colibacillosis, weaned rabbits (28 days-old) were divided in 4 groups according to 2 factors (infection, intake level) at 2 levels each (respectively: not infected/infected and *ad libitum*/restricted at -25% of the voluntary feed intake). The 4 groups (n=45/group) were: T100 = not infected and *ad libitum*, T75 = not infected and restricted, I100 = *ad libitum* and infected, I75=infected and restricted. The infection was performed at 31 days of age, by oral inoculation of 2.2×10^8 CFU/animal of *E. coli* O128:C6 (J0). During the 4 first days following the inoculation a significant delay of growth was observed. Then the clinical signs (diarrheic or/and bloated or/and prostrated animals) were observed between 3 and 6 days post inoculation (pi). The highest level of faecal excretion of *E. coli* O128:C6 was noticed 4 days pi for both infected groups. Feeding restriction was not underlined as improving sanitary health status of infected rabbits.

Introduction

Les troubles digestifs sont désignés comme étant la cause de mortalité la plus importante pour les lapins en engraissement. En plus d'une mortalité, ils peuvent induire des pertes économiques importantes par le retard de croissance, la mauvaise efficacité alimentaire et les coûts vétérinaires. Pour les lapins en engraissement, les colibacilloses sont l'une des principales causes de maladie, les troubles digestifs étant dus à des *E. coli* entéropathogènes (EPEC). Une enquête épidémiologique révèle qu'entre 1982 et 1986, ces bactéries ont été détectées dans 31,4% des lapins diarrhéiques (Peeters, 1987). L'importance des signes cliniques et des conséquences de ces maladies est fonction de la souche impliquée (Peeters *et al.*, 1988). La souche *E. coli* O128:C6 responsables d'entérites chez le lapin est référencée peu pathogène, induisant un retard de croissance, peu de troubles digestifs et aucun mortalité (Camguilhem *et al.*, 1989; Milon *et al.*, 1990; Milon *et al.*, 1992), permettant de simuler une dégradation de l'état sanitaire sans atteindre un fort taux de mortalité. D'autre part des études antérieures ont mis en évidence l'impact positif d'une restriction alimentaire

sur l'état sanitaire de jeunes lapins lors d'épisodes spontanés ou d'infection expérimentale d'Entéropathie Epizootique du lapin (Boisot *et al.*, 2003, Gidenne *et al.*, 2003).

L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet protecteur d'une restriction alimentaire sur la résistance du lapin à une infection expérimentale par l'*E. coli* entéropathogène O128:C6.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux et alimentation

A 28 jours d'âge, 180 lapins d'une souche commerciale (Hycol®) ont été sevrés. Ils ont alors été répartis de manière aléatoire en 4 lots : T100 = non infectés et nourris *ad libitum*, T75 = non infectés et restreints à -25% de l'ingéré volontaire, I100 = infectés et nourris *ad libitum*, I75 = infectés et restreints à -25% de l'ingéré volontaire. Les lapins étaient logés par 9 (densité de 22 lapin/m², au sevrage) et répartis de manière aléatoire. A J0, c'est-à-dire à 31 jours d'âge, les lapins appartenant aux lots infectés ont été inoculés oralement par *E. coli* O128:C6 ($2,2 \times 10^8$ UFC/animal). Les animaux ont été hébergés dans deux pièces séparées, une pour les

animaux sains, l'autre pour les animaux inoculés. Et dans chaque salle, la moitié des animaux a été alimentée à volonté et l'autre moitié restreinte. Tous les lapins ont reçu de l'eau à volonté. L'aliment expérimental a été formulé afin de couvrir les besoins nutritionnels des lapins en croissance (Gidenne *et al.*, 2000). Les animaux restreints étaient alimentés une fois par jour au moment du pic d'ingestion des animaux *ad libitum* (Martignon *et al.*, 2009), une heure après le début du jour (éclairage de 9h à 19h) et la quantité d'aliment distribuée a été ajustée 2 fois par semaine, selon la consommation volontaire du lot T100.

1.2. Ingestion, croissance et statut sanitaire

L'ingestion d'aliment des animaux nourris *ad libitum* a été déterminée 2 fois par semaine. Simultanément, les animaux ont été pesés. L'ingestion des animaux restreints a été mesurée quotidiennement, en même temps que la distribution de l'aliment. La morbidité et la mortalité ont été vérifiées quotidiennement. Les lapins sont identifiés morbides lorsqu'ils sont prostrés, ballonnés et/ou présentent une diarrhée (Bennegadi *et al.*, 2001). De plus, des animaux sans signes visibles de troubles digestifs, mais montrant un retard de croissance (<20g/j pour les lapins *ad libitum* et <10g/j pour les lots restreints) ont été enregistrés comme morbides.

1.3. Culture des bacilles Gram-

Les échantillons de fèces frais (15g/cage, 5 cages/lot) et de contenu caecal individuel (1g/animal, 5 animaux/lot) ont été collectés juste avant la distribution de l'aliment des animaux restreints, puis ils ont été dilués (1/10) dans de l'eau peptonée. Après dilution sériée dans une solution de tryptone-sel, trois des dilutions obtenues ont étéensemencées sur une gélose de Mac Conkey n°3 (CM0115B, Oxoid, Angleterre), pour cultiver des bacilles Gram-. Les colonies violettes ont été dénombrées après incubation à 37°C pendant 24h. Les résultats obtenus sont exprimés en log UFC/g. De plus, 15 des colonies de bactéries ayant poussé sur le milieu Mac Conkey ont été sérotypées à l'aide d'un solvant de coagglutination pour *E. coli* O128:C6 (LDA22, Ploufragan, France).

1.4. Analyses statistiques

Les variables quantitatives (poids vif, ingestion, gain de poids et indice de consommation) ont été analysées avec le logiciel R (version 2.7.2), selon un modèle linéaire (ANOVA) incluant deux effets fixes : infection et niveau d'ingestion et considérant leur interaction. La variable qualitative (morbidité) a été analysée par la procédure CATMOD de SAS. Les différences sont significatives pour $P < 0,05$.

Tableau 1. Effets de l'infection et de la restriction alimentaire sur la morbidité¹ de jeunes lapins sevrés à 28 jours d'âge

	Lots				P^2		
	T100	T75	I100	I75	Inf.	Restri.	Inter.
J-3 à J0 ³	1/45	0/45	0/45	0/45	NS	NS	NS
J0 à J4	1/40 ^a	1/40 ^a	5/40 ^a	14/40 ^b	0,002	NS	NS
J4 à J7	1/40 ^a	0/40 ^a	15/40 ^b	19/40 ^b	<0,001	NS	NS
J7 à J11	0/30	0/30	8/30	5/30	0,025	NS	NS
J0 à J11	2/45 ^a	1/45 ^a	21/45 ^b	25/45 ^b	<0,001	NS	NS

¹Morbidité : animaux prostrés, avec ballonnements et présentant une diarrhée et/ou un retard de croissance par comparaison avec des lapins du même groupe.

² P pour un modèle bifactoriel, incluant les effets de la contamination (témoins, T vs. infectés, I) et du niveau d'ingestion (*ad libitum*, AL vs. restreints, R).

³J0 = 31 jours d'âge, inoculation

a, b, c : par ligne, les moyennes avec des lettres différentes diffèrent ($P < 0,05$, modèle monofactoriel, effet du lot)

La réduction des effectifs au cours de l'expérience est due aux sacrifices réalisés pour les prélèvements.

2. Résultats

2.1. Santé digestive

Quelque soit le lot considéré, aucune mortalité n'a été constatée. Alors que le taux de morbidité des animaux témoins reste faible, entre 0 et 5% (tableau 1), au cours des 4 jours suivant l'inoculation, il augmente significativement pour les deux lots infectés ($P = 0,002$), comparés aux animaux non contaminés. Il atteint 1/8 et 1/3 des animaux pour les lots I100 et I75 respectivement ($P < 0,001$, tableau 1). A cette période, la morbidité observée est principalement due à un retard de croissance. Le pic d'infection apparaît entre 4 et 7 jours, jusqu'à 48% pour le lot I75. Le plus grand nombre de signes cliniques (diarrhée, prostration et/ou ballonnement) est révélé entre J4 et

J5 (données non présentées). Le niveau d'ingestion n'a pas influencé significativement le taux de morbidité observé (tableau 1).

2.2. Croissance et ingestion

Avant l'infection, la restriction alimentaire de -31% mène à une réduction significative de la croissance de 43% ($P < 0,001$). Ceci induisant un poids vif inférieur pour les lapins restreints (-6%, $P < 0,001$) au moment de l'inoculation. Par conséquent, à la fin de l'expérience, les lapins restreints sont plus légers de 23% par rapport aux lapins nourris *ad libitum* ($P < 0,001$). De J4 à J7 et dans les 4 derniers jours de l'expérience, l'ingestion volontaire apparaît décroître de 13% ($P = 0,06$) et de 12% ($P = 0,02$) respectivement pour les animaux infectés (T100 vs.

Tableau 2. Croissance et ingestion du jeune lapin en fonction des facteurs infection et niveau d'ingestion

	Lots				SEM ¹	P ²		
	T100 (n=5)	T75 (n=5)	I100 (n=5)	I75 (n=5)		Infection	Ingestion	Inter.
<i>J-3 à J0⁵</i>								
Nombre initial de lapins	45	45	45	45				
Poids vif J-3, g	585	594	582	590	3,6	0,64	0,23	0,99
Ingestion, g/j/lapin	58,4	40,1	61,4	41,1	1,77 ³	ND ⁴	ND ⁴	ND ⁴
Gain de poids, g/j/lapin	44,9 ^b	25,5 ^a	48,8 ^b	24,3 ^a	1,14	0,36	<0,001	0,09
<i>J0 à J4</i>								
Nombre initial de lapins	40	40	40	40				
Poids vif J0, g	716 ^b	671 ^a	724 ^b	661 ^a	5,0	0,92	<0,001	0,32
Ingestion, g/j/lapin	88,0	44,0	79,8	44,0	2,47 ³	ND ⁴	ND ⁴	ND ⁴
Gain de poids, g/j/lapin	49,5 ^c	18,2 ^a	35,2 ^b	12,8 ^a	1,38	<0,001	<0,001	0,006
<i>J4 à J7</i>								
Nombre initial de lapins	40	40	40	40				
Poids vif J4, g	914 ^b	744 ^a	867 ^b	712 ^a	8,8	<0,001	<0,001	0,48
Ingestion, g/j/lapin	113,2	58,7	98,4	58,7	3,99 ³	ND ⁴	ND ⁴	ND ⁴
Gain de poids, g/j/lapin	55,5 ^c	38,8 ^a	48,5 ^{bc}	40,7 ^{ab}	1,40	0,31	<0,001	0,08
<i>J7 à J11</i>								
Nombre initial de lapins	25	25	25	25				
Poids vif J7, g	1102 ^c	858 ^a	1017 ^b	842 ^a	12,7	0,002	<0,001	0,03
Poids vif J11, g	1368 ^c	1060 ^a	1236 ^b	1007 ^a	18,1	<0,001	<0,001	0,08
Ingestion, g/j/lapin	131,8	88,8	115,8	84,5	3,74 ³	ND ⁴	ND ⁴	ND ⁴
Gain de poids, g/j/lapin	64,3 ^c	47,4 ^{ab}	54,4 ^b	41,8 ^a	1,38	<0,001	<0,001	0,33
<i>J0 à J11</i>								
Efficacité alimentaire	1,91	1,86	2,11	1,98	0,033	0,007	0,099	NS

¹SEM = erreur type de la moyenne

²P pour un modèle bifactoriel, incluant les effets de la contamination (témoins, T vs. infectés, I) et du niveau d'ingestion (*ad libitum*, AL vs. restreints, R).

³SEM calculé pour les lots T100 and I100 uniquement

⁴ND: non déterminé, $\sigma^2 = 0$ pour les lapins restreints

⁵J0 = 31 jours d'âge, inoculation

a, b, c : par ligne, les moyennes avec des lettres différentes diffèrent ($P < 0,05$)

La réduction des effectifs au cours de l'expérience est due aux sacrifices réalisés pour les prélèvements.

I100). L'infection semble aussi altérer la croissance des lapins, surtout dans les 4 jours suivant l'inoculation (-28%, $P < 0,001$, T100 vs. I100 ; tab. 2).

2.3. Analyses bactériologiques

Alors qu'avant inoculation, aucune des colonies d'*E. coli* isolées ne présentait le sérotype de la souche inoculée (O128:C6), après inoculation (J2, pour les analyses fécales et J5 pour les analyses caecales), toutes les colonies d'*E. coli* (des lots infectés) étaient O128:C6. Pour les lots témoins, aucune colonie O128:C6 n'a été isolée, quelque soit le moment de prélèvement.

Avant inoculation (29 j d'âge), une forte variabilité des dénombrements d'*E. coli* est observée (écart-type de 2 log UFC/g, n=20) qui reflète le fait que le tractus digestif de certains lapins n'abrite pas d'*E. coli*, alors que pour d'autres, on en dénombre jusqu'à 4,8 log UFC/g de contenu caecal (données non présentées). Entre J-2 et J5, les 4 lots ont montré une augmentation de la concentration caecale en *E. coli*, jusqu'à atteindre une moyenne de $5,8 \pm 1,6$ log UFC/g à J5, sans effet significatif de l'infection. Par la suite, la concentration caecale en *E. coli* est stabilisée autour de $7,0 \pm 1,4$ log UFC/g pour les deux lots infectés,

alors qu'elle décroît jusqu'à $1,7 \pm 2,3$ log UFC/g ($P < 0,001$) pour les témoins (données non présentées). La restriction alimentaire n'influence pas significativement la concentration caecale en *E. coli*.

La concentration moyenne d'*E. coli* dans les échantillons fécaux, de $5,2 \pm 1,2$ log UFC/g à J-2 pour les 4 lots, a augmenté pour les deux groupes inoculés. Le pic d'excrétion fécale d'*E. coli* O128:C6 a été observé à J4, avec $8,4 \pm 0,7$ log UFC/g ($P < 0,001$, n=5) et $9,1 \pm 0,1$ log UFC/g, ($P < 0,001$, n=5) pour I100 et I75 respectivement (données non présentées).

3. Discussion

Comme attendu, la réduction du poids est fonction du temps de restriction ; ainsi, après 3, 7, 10 et 14 jours de restriction, nous avons observé respectivement 7,5%, 18%, 20% et 21% de perte de poids (Martignon *et al.*, 2010). L'efficacité alimentaire n'a pas été améliorée pas le contrôle du niveau d'ingestion, alors que plusieurs études ont montré une réduction significative de l'indice de consommation lors d'un rationnement (Gidenne *et al.*, 2009 ; Martignon *et al.*, 2010).

Aucune mortalité n'a été observée dans nos conditions expérimentales. Ce résultat est cohérent

avec les résultats obtenus précédemment (Campguilhem *et al.*, 1989 ; Milon *et al.*, 1990 ; Milon *et al.*, 1992), référant la souche d'*E. coli* O128:C6 comme une souche faiblement pathogène, induisant des pertes de poids, et parfois des diarrhées, sans aucune mortalité. Alors que la restriction alimentaire permet d'améliorer l'état sanitaire d'animaux suite à une reproduction expérimentale d'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) (Boisot *et al.*, 2003), cette stratégie d'alimentation n'a pas amélioré l'état sanitaire des lapins suite à une reproduction expérimentale de colibacillose. Ceci peut s'expliquer par trois hypothèses. La première est que la restriction alimentaire n'est efficace que vis-à-vis de l'EEL cette différence d'efficacité serait donc directement liée aux différences entre les deux maladies : EEL et colibacilloses. La seconde, la souche utilisée étant peu pathogène, les troubles consécutifs à l'infection étaient trop faibles pour stimuler l'efficacité de la stratégie d'alimentation étudiée. La dernière hypothèse est qu'une restriction alimentaire appliquée préventivement (3 jours avant inoculation dans notre étude) n'est pas efficace dans ce type de maladie, afin d'étudier cette possibilité, il pourrait être intéressant d'appliquer cette stratégie d'alimentation après l'inoculation et pas en amont.

Conclusion

La restriction alimentaire n'a pas permis d'améliorer significativement l'état sanitaire des lapins expérimentalement soumis à un épisode de colibacillose. La souche d'*E. coli* O128:C6 utilisée pour l'infection est peu pathogène, n'induisant aucune mortalité et ayant pour principales conséquences un retard de croissance et des troubles digestifs : diarrhée, prostration et/ou ballonnement.

Remerciements

Les auteurs remercient Alain Milon (ENV Toulouse) qui a fourni la souche d'*E. coli* O128:C6 utilisée ; aussi, l'ensemble des agents du Service d'Elevage et d'Expérimentation en Pathologie Aviaire de l'Anses pour leur contribution est remercié ; ainsi que F. Lalande (HQPAP, Anses) et L. Gordon (UAA, Anses) pour leur aide technique.

Références

BENNEGADI, N., GIDENNE, T., LICOIS, D., 2001. Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit. *Anim. Res.* 50, 401-413.

- BOISOT, P., LICOIS, D., GIDENNE, T., 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. *Proceedings "10èmes Journées de la Recherche Cunicole"*, Paris, France, 267-370
- CAMGUILHEM, R., MILON, A., 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *J. Clin. Microbiol.* 27, 743-747.
- GIDENNE, T. 2000. Recent advances in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Sci.* 8: 23-32.
- GIDENNE, T., FEUGIER, A., JEHL, N., ARVEUX, P., BOISOT, P., BRIENS, C., CORRENT, E., FORTUNE, H., MONTESSUY, S., VERDELHAN, S., 2003. Un rationnement alimentaire quantitatif post-sevrage permet de réduire la fréquence des diarrhées, sans dégradation importante des performances de croissance : résultats d'une étude multi-site. *Proceedings "10èmes Journées de la Recherche Cunicole"*, Paris, France, 29-32.
- GIDENNE, T., COMBES, S., FEUGIER, A., JEHL, N., ARVEUX, P., BOISOT, P., BRIENS, C., CORRENT, E., FORTUNE, H., MONTESSUY, S., VERDELHAN, S., 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Anim.* 3, 509-515.
- MARTIGNON, M.H., COMBES, S., GIDENNE, T., 2009. Rôle du mode de distribution de l'aliment dans une stratégie de rationnement : conséquences sur le profil d'ingestion, la croissance et la santé digestive du lapin. *Proceeding « 13èmes Journées de la Recherche Cunicole »*, Le Mans, France, 39-42.
- 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. *Comp. Biochem. Phys. A* 156, 156-162.
- MILON, A., ESSLINGER, J., CAMGUILHEM, R., 1990. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and hela-cells. *Infect. Immun.* 58, 2690-2695.
- MILON, A., ESSLINGER, J., CAMGUILHEM, R., 1992. Oral vaccination of weaned rabbits against enteropathogenic *Escherichia coli*-like *E. coli* O103 infection: use of heterologous strains harboring lipopolysaccharide or adhesin of pathogenic strains. *Infect. Immun.* 60, 2702-2709.
- PEETERS, J.E., 1987. Etiology and pathology of diarrhoea in weanling rabbits. Auxilia, T. (Ed.) *Rabbit production systems including welfare.*, vol. Report n°EUR10983. Commission of the European Communities, 127-137.
- PEETERS, J.E., GEEROMS, R., ORSKOV, F., 1988. Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect. Immun.* 56, 1442-1448.