



18èmes Journées de la Recherche Cunicole

Nantes 27-28 mai 2019

GUNIA M., LANTIER F., BALMISSE E., GUITTON E., HELLOIN E., LE CREN D., LENOIR G., MAUPIN M., ROBERT R., RIOU M., GARREAU H, 2019. *Projet RELAPA (génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PAs-teurellose) : statut hématologique de lapins résistants et sensibles.* 18^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 27 – 28 mai 2019, Nantes, France, **73-76**

Texte complet

+

Fichier de présentation orale

Projet RELAPA (génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PASTeurellose) : statut hématologique de lapins résistants et sensibles

Gunia M.^{1*}, Lantier F.², Balmisse E.³, Guitton E.⁴, Helloin E.², Le Cren D.⁵,
Lenoir G.⁶, Maupin M.⁷, Robert R.⁸, Riou M.⁴, Garreau H.¹

¹GenPhySE, INRA, ENVT, Université de Toulouse, 31326 Castanet Tolosan, France

²ISP, INRA Centre Val de Loire, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, France

³PECTOUL, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

⁴PFIE, INRA Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

⁵CLIPP, 75009 Paris, France

⁶HYCOLE, Route de Villers-Plouich, 59159 Marcoing, France

⁷HYPHARM SAS, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

⁸Ex-EUROLAP, fusion avec HYPHARM SAS, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

* correspondante : melanie.gunia@inra.fr

Résumé – La pasteurellose est la première cause de mortalité des femelles en élevage cunicole. Lors du projet RELAPA, 953 lapins ont été inoculés à l'âge de 6 semaines avec une souche de *Pasteurella multocida* (*Pm*) pyogène et suivis pendant 14 jours. La réponse des animaux était très variable, avec 7% de lapins résistants et 11% d'animaux très sensibles. Des numérations formules sanguines ont été réalisées 14 jours après l'inoculation sur 574 lapins inoculés et 28 témoins. Des différences significatives de composition du sang en globules blancs, rouges et plaquettes ont été observées selon la note de résistance attribuée à l'animal. On constate chez les animaux sensibles un nombre de globules rouges inférieur, résultant probablement de l'activité hémolytique et hémorragique de *Pm*. Les animaux sensibles ont une proportion plus importante de monocytes, neutrophiles, éosinophiles impliqués dans la réponse immunitaire innée et la réponse inflammatoire, et une proportion inférieure de lymphocytes (impliqués dans la réponse immunitaire adaptative) comparés aux animaux très résistants et aux témoins. Ces animaux sensibles semblent donc ne pas réussir à monter une réponse immunitaire leur permettant de contrôler l'infection. L'effet significatif du père sur le nombre des différents types de leucocytes suggère une variabilité génétique dans la réponse hématologique à l'infection.

Abstract –RELAPA project (Genomics for rabbit genetic resistance to pasteurellosis): hematological status of susceptible and resistant rabbits. Pasteurellosis is the first cause of female mortality in rabbit farms. During the RELAPA project, 953 rabbits were inoculated at 6 weeks of age with a pyogenic strain of *Pasteurella multocida* (*Pm*) and were monitored during 14 days. Disease response was very variable among animals, with 7% of resistant animals and 11% of highly susceptible rabbits. A complete blood count was performed 14 days post-inoculation on 574 inoculated and 28 control rabbits. Significant differences in white blood cell, red blood cell, and platelet counts were observed according to the disease resistance score. Susceptible rabbits have a lower red blood cell count, probably due to the hemolytic and hemorrhagic activity of *Pm*. They also had a higher percentage of monocytes, neutrophils and eosinophils involved in the innate immune and inflammatory responses and, conversely, a lower percentage of lymphocytes (involved in the adaptive immune response) as compared to highly resistant and control rabbits. They seem to be unable to mount an immune response to control the infection. Significant sire effects on several levels of white blood cell populations suggest some genetic variability underlying the hematological response to *Pm* infection.

Introduction

La Pasteurellose est une maladie bactérienne très répandue dans les élevages cunicoles commerciaux. Les pneumonies, causées principalement par *Pasteurella multocida* (*Pm*) sont la première cause de mortalité des femelles dans les élevages, avec 37,8% de la mortalité (Lopez et al., 2013). La sélection génétique pour la résistance à la pasteurellose est donc un enjeu important. A la suite d'un programme de collecte et de caractérisation de souches de *Pm*

(Helloin et al., 2013), le projet RELAPA (Génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PASTeurellose) a pour but de mettre en évidence des régions du génome associées à la réponse à la pasteurellose. Cette étude présente les résultats de l'examen hématologique réalisé au cours de l'infection expérimentale de lapins inoculés par une souche de *Pm*.

1. Matériel et méthodes

Toutes les expérimentations ont été conduites selon les recommandations de la directive européenne et française (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010; Code rural, 2018; Décret n°2013-118, 2013). Toutes les procédures expérimentales ont été validées par le ministère de la Recherche et de l'Éducation (APAFIS#3866-2016020113447262) et par le comité d'éthique du Centre Val de Loire n°19.

1.1. Production des animaux

Un total de 1030 animaux expérimentaux a été produit au Pôle d'expérimentation cunicole toulousain (Pectoul) par croisement entre 111 femelles de la lignée maternelle INRA 1777 et 65 mâles des 6 lignées grand-parentales maternelles des 3 sélectionneurs français de lapins de chair (Eurolap, Hycole, Hypharm). Les lapins ont été produits en 5 bandes. Ils ont été sevrés à 35 jours et transportés le lendemain du sevrage à la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE). Au total, 953 lapins inoculés et 48 témoins ont été conservés pour cette étude ; 27 lapins inoculés ou devant l'être et 2 témoins ont été exclus de l'étude pour cause de mortalité précoce non associée à la pasteurellose. Ces animaux présentaient des diarrhées ou des symptômes d'Entéropathie Epizootique des Lapins (EEL), et aucune *Pm* n'a été détectée.

1.2. Infection expérimentale et suivi zootechnique

Les animaux ont été logés en cage de 5, dans deux salles, avec une répartition équilibrée des sexes et des origines paternelles et maternelles au sein des cages et des salles. Après 1 semaine d'adaptation, les lapins ont été inoculés à l'âge de 42 jours (J0), par injection sous-cutanée entre les omoplates d'une dose de 8000 bactéries / 0,1 mL de la souche LVT62 de *Pm* pyogène (Helloin *et al.*, 2015).

Les animaux des bandes 1 et 2 ont été nourris *ad libitum*. Avec l'apparition de symptômes d'EEL après le sevrage de la bande 3, un rationnement à 90% des besoins moyens quotidiens a été mis en place pour les lapins inoculés et témoins des bandes 3, 4 et 5.

L'état sanitaire des animaux était suivi quotidiennement. Les animaux ont été pesés à J-1, J7 et J14. Leur température a été mesurée de J-1 à J10. La présence et la répartition des abcès sur le corps des animaux ont été enregistrées au moment de l'autopsie, de même que la présence de lésions dues à l'EEL. A l'exception des animaux morts ou euthanasiés au cours de l'étude, tous les animaux ont été abattus et autopsiés 14 jours après l'inoculation (à l'âge de 56 jours). Au final, 7% des animaux inoculés conservés dans l'étude ont présentés des symptômes d'EEL à l'autopsie.

1.3. Echantillons

Des échantillons de rate, poumons, foie et d'abcès ont été prélevés pour les analyses bactériologiques. Au moment de l'abattage des animaux à J14, un tube de sang a été prélevé à la saignée après l'électronarcose

sur un sous-ensemble de 602 lapins (574 lapins inoculés et 28 témoins) des bandes 2, 3, 4 et 5 pour la réalisation de numérations globulaires sanguines à l'aide de l'automate MS9-5 Hematology Counter® (Melet Schloesing Laboratories, France).

1.4. Caractères étudiés et analyses statistiques

Des notes (de 0 à 4) d'abcès et de bactériologie ont été attribuées aux animaux à partir des résultats d'autopsie pour rendre compte de la dissémination et de la sévérité de l'infection (Gunia *et al.*, 2017). Ces deux critères ont été combinés pour créer une note de résistance (Tableau 1). Les paramètres hématologiques présentés dans cette étude sont les nombres de Globules Blancs totaux (GB), Globules Rouges (GR), Plaquettes (PLT), les pourcentages de lymphocytes (LYM), Monocytes (MON), Neutrophiles (NEU), Eosinophiles (EOS), Basophiles (BAS) et d'Hématocrite (HCT) et le taux d'Hémoglobine (HGB).

Les globules blancs ou leucocytes rassemblent l'ensemble des cellules impliqués dans la réponse inflammatoire ou immunitaire (LYM, MON, NEU, EOS, BAS). Les monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles ont un rôle dans l'inflammation ou la réponse immunitaire innée (immédiate). Les lymphocytes ont un rôle dans la réponse immunitaire adaptative, plus tardive mais plus durable, et plus spécifique à l'agent pathogène.

Les globules rouges ou hématies servent au transport de l'oxygène et les plaquettes à la coagulation du sang. L'hématocrite est le pourcentage en volume de globules rouges sur le volume total de sang. L'hémoglobine est une protéine présente dans les hématies servant au transport de l'oxygène.

Les calculs de moyenne portent sur les 602 individus. Les analyses entre caractères hématologiques et note de résistance portent sur 601 individus : 74 lapins avec une note de 1, 425 avec une note de 2, 17 avec une note de 3, 57 avec une note de 4, et 28 témoins. L'unique individu avec une note de résistance de 0 a été écarté de ces analyses. Les relations entre les différents facteurs ou la note de résistance d'une part et les caractères hématologiques d'autre part ont été analysés avec un modèle linéaire (Proc glm du logiciel SAS).

Tableau 1 : description de la note de résistance

Note de résistance

0	Mort ou euthanasié avec abcès ou <i>Pm</i> détectés
1	Abcès et <i>Pm</i> dans les cavités internes, vivant à J14
2	Présence de plusieurs d'abcès sous-cutanés, vivant à J14
3	Abcès au site d'inoculation uniquement, vivant à J14
4	Aucun abcès, aucune <i>Pm</i> , vivant à J14

2. Résultats et discussion

2.1. Description des caractères mesurés

La répartition des animaux par note de résistance est présentée en figure 1. Le tableau 2 présente les

résultats d'examen hématologiques chez les animaux inoculés et les témoins.

Figure 1 : Nombre et proportion de lapins inoculés par note de résistance de 0 (très sensible) à 4 (très résistant)

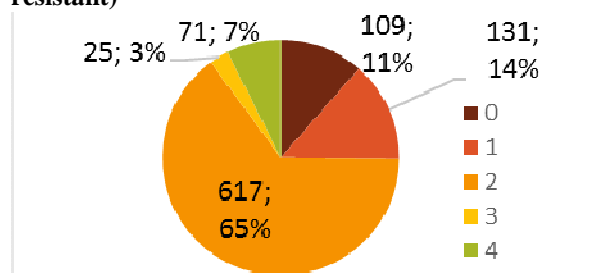


Tableau 2 : Moyenne et écart-type des numérations formules sanguines

	Témoins (n=28)	Lapins inoculés (n=574)
GB (milliers/mm ³)	6,53 ± 2,52	12,66 ± 6,78
GR (millions/mm ³)	5,46 ± 0,76	5,00 ± 0,71
PLT (milliers/mm ³)	201,02 ± 106,33	333,31 ± 199,98
LYM (%)	61,34 ± 7,20	32,46 ± 12,82
MON (%)	7,19 ± 1,60	9,51 ± 2,47
NEU (%)	26,56 ± 6,29	52,00 ± 12,80
EOS (%)	1,48 ± 0,66	3,23 ± 3,10
BAS (%)	0,47 ± 0,14	0,36 ± 0,14
HCT (%)	35,30 ± 5,12	30,61 ± 4,83
HGB (g/dl)	11,89 ± 1,61	10,52 ± 1,41

GB = Globules Blancs, GR = Globules Rouges, PLT = Plaquettes, LYM = lymphocytes, MON = Monocytes, NEU = Neutrophiles, EOS = Eosinophiles, BAS = Basophiles, HCT = hématocrite, HGB = Hémoglobine.

2.2. Effet de la note de résistance

Les figures 2 à 5 présentent les numérations de globules rouges, plaquettes, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine. Les animaux résistants, très résistants et les témoins ont un nombre significativement plus élevé d'hématies, comparativement aux animaux sensibles et intermédiaires. Logiquement, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine suivent la même tendance. La numération plaquettaire suit la tendance contraire, les animaux très résistants et les témoins ayant un niveau plus bas que les animaux sensibles. Ceci peut s'expliquer par l'activité hémolytique et hémorragique de *Pm*, révélée à l'autopsie par la présence de pétéchies (infiltrations de sang) sur les organes internes des animaux sensibles. Par conséquent ces animaux mobilisent un plus grand nombre de plaquettes pour limiter les pertes de sang.

Figure 2 : Nombre de Globules Rouges par note de résistance de 1 (sensible) à 4 (très résistant)

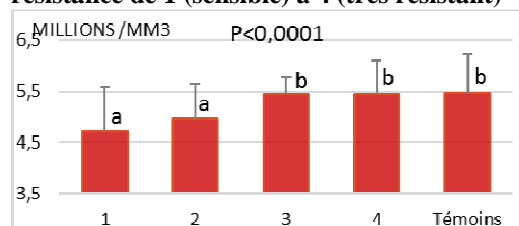


Figure 3 : Hématocrite par note de résistance de 1 (sensible) à 4 (très résistant)

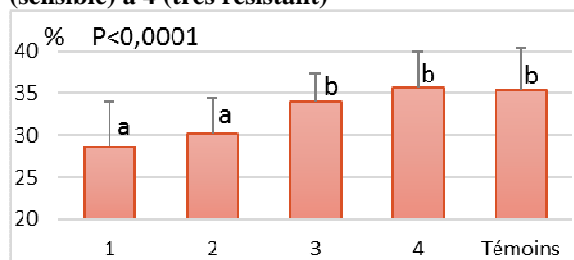


Figure 4 : Taux d'Hémoglobine par note de résistance de 1 (sensible) à 4 (très résistant)

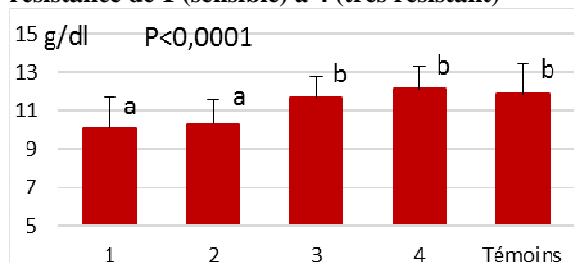
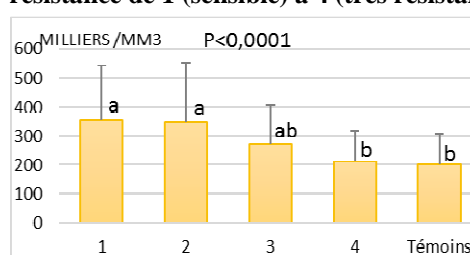
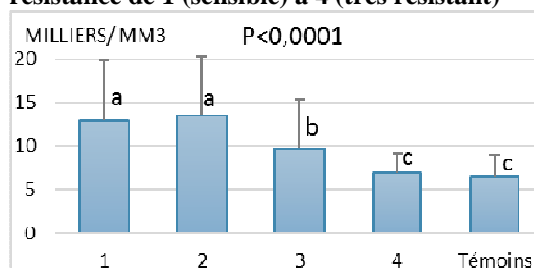


Figure 5 : Nombre de Plaquettes par note de résistance de 1 (sensible) à 4 (très résistant)



La figure 6 présente le nombre de leucocytes. Les animaux très résistants et les témoins ont un nombre de leucocytes inférieur aux animaux sensibles et très sensibles, les animaux résistants (note de 3) étant intermédiaires.

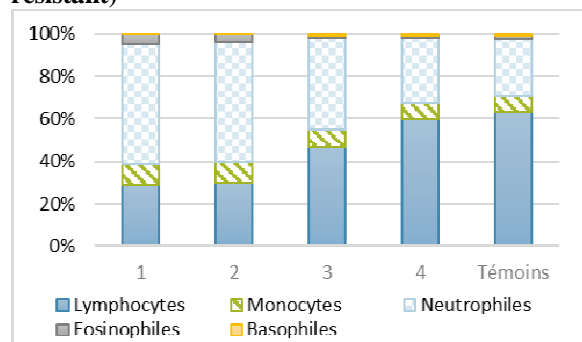
Figure 6 : Nombre de Globules Blancs par note de résistance de 1 (sensible) à 4 (très résistant)



La figure 7 montre la proportion des différents types de leucocytes. Les proportions de chaque type de leucocytes ainsi que leurs nombres (non présentés ici) sont significativement différents entre groupes de lapins en fonction de la note de résistance. Les animaux sensibles ont plus de monocytes, neutrophiles, éosinophiles (impliqués dans la réponse immunitaire innée). Les monocytes et neutrophiles sont impliqués dans la phagocytose, les éosinophiles sont impliqués dans la défense contre les parasites, les allergies et certaines infections bactériennes. Les neutrophiles constituent une partie des abcès. Les animaux sensibles ont moins de lymphocytes

(impliqué dans la réponse immunitaire adaptative) et de basophiles (impliqués dans l'inflammation). On peut en déduire que 14 jours après inoculation, les animaux les plus résistants auraient monté une réponse immunitaire innée et peut-être également adaptative efficace, ce qui ne serait pas le cas des animaux sensibles.

Figure 7 : Proportion de types de globules blancs par note de résistance de 1 (sensible) à 4 (très résistant)



Le Tableau 3 présente la significativité des différents effets sur les caractères mesurés. La note de résistance a un effet significatif pour tous les caractères et la

Tableau 3: Significativité des effets fixes et de l'effet aléatoire du père (en colonnes) pour les caractères mesurés (en ligne)

	Bande	EEL	sexe	Note de résistance	Bande*EEL	Père
GB (milliers/mm ³)	***	n.s.	**	***	n.s.	**
GR (millions/mm ³)	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.
PLT (milliers/mm ³)	*	n.s.	n.s.	***	n.s.	*
LYM (%)	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	*
MON (%)	**	n.s.	**	***	*	***
NEU (%)	**	n.s.	n.s.	***	n.s.	*
EOS (%)	***	***	n.s.	***	***	n.s.
BAS (%)	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.
HCT (%)	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.
HGB (g/dl)	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	*

GB = Globules Blancs, GR = Globules Rouges, PLT = Plaquettes, LYM = lymphocytes, MON= Monocytes, NEU = Neutrophiles, EOS = Eosinophiles, BAS = Basophiles, HCT = hémocrite ; HGB = Hémoglobine, EEL=Entéropathie Epizootique du Lapin. n.s.=non significatif ; P<0,05=*; P<0,01=**; P<0,001=***.

Conclusions

Cette première étape du projet RELAPA montre des profils hématologiques significativement différents entre animaux résistants et sensibles. L'effet significatif du père sur plusieurs types de leucocytes laisse présager l'existence d'une variabilité génétique sous-jacente.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des participants au projet RELAPA, en particulier les équipes de PECTOUL, du CIRM et de la PFIE.

Références

Djukovic A, Garcia-Garcera M, Martínez-Paredes E, Isaac S, Artacho A, Martínez J, Ubeda C. 2018. Gut colonization by a novel

bande pour tous les caractères sauf sur le taux de lymphocytes.

L'effet du père, qui suggère une variabilité génétique sous-jacente, est significatif pour les leucocytes, et leurs populations principales que sont les lymphocytes, monocytes et neutrophiles, ainsi que pour les plaquettes et le taux d'hémoglobines. Il y a un effet sexe significatif pour les leucocytes et monocytes, les femelles ayant des nombres de leucocytes et monocytes inférieurs. Il y a un effet très significatif de l'EEL pour le taux d'éosinophiles, et presque uniquement sur ce caractère. Les animaux sévèrement atteints d'EEL ont une proportion deux fois plus importante d'éosinophiles. Les éosinophiles peuvent être impliqués lors des infections de l'intestin par *Clostridium*, et il semble que *Clostridium cuniculi* ait un rôle au moment de la survenue de l'EEL (Djukovic et al., 2018).

L'évolution de la Pasteurellose semble liée à d'autres cellules et, en particulier, au nombre de monocytes pour lesquels on observe un effet père très significatif.

Clostridium species is associated with the onset of epizootic rabbit enteropathy. *Vet. Res.* 49, 123.

Gunia M, Lantier F, Babilliot J-M, Balmisse E, Bed'horn B, Belmonte E, Bertagnoli S, Boucher S, Breton S, Chambellon E, Chaumeil T, Coisne F, Delaunay R, Fadeau A, Guitton E, Helies V, Hurtaud J, Jaret D, Kempf F, Lantier I, Lavillate S, Le Cren D, Lenoir G, Le Normand B, Marais C, Maupin M, Morin H, Poncet C, Pujol S, Robert R, Rossignol C, Ruesche J, Sarce F, Thiebot C, Helloin E, Garreau H. 2017. Premiers résultats du projet RELAPA : génomique pour la résistance génétique des lapins à la pasteurellose. 17^{èmes} J. Rech. Cunicoles, *Le Mans*, 151-154

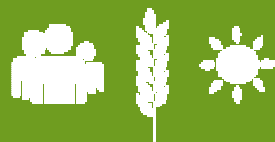
Helloin E., Garreau H., Slugocki C., Hilgenberg M., Le Beux C., Licois D., Boucher S., Le Normand B., Morin H., Baumier L.M., Coisne F., Fournier E., Moreno C., Lantier F. 2015. Vers une amélioration de la résistance du lapin à la pasteurellose. 16^{èmes} J. Rech. Cuni, 43-46.

Lopez S., Chretien L., Salaün J.M., Wacquez P.A. 2013. Etude descriptive des mortalités des femelles reproductrices en élevage cunicole. 15^{èmes} J. Rech. Cunicole, *Le Mans*, 193-196

Mélanie Gunia, Frédéric Lantier, Elodie Balmisse,
Edouard Guitton, Dominique Le Cren, Guillaume
Lenoir, Mickaël Maupin, Raphaël Robert, Mickaël
Riou, Hervé Garreau

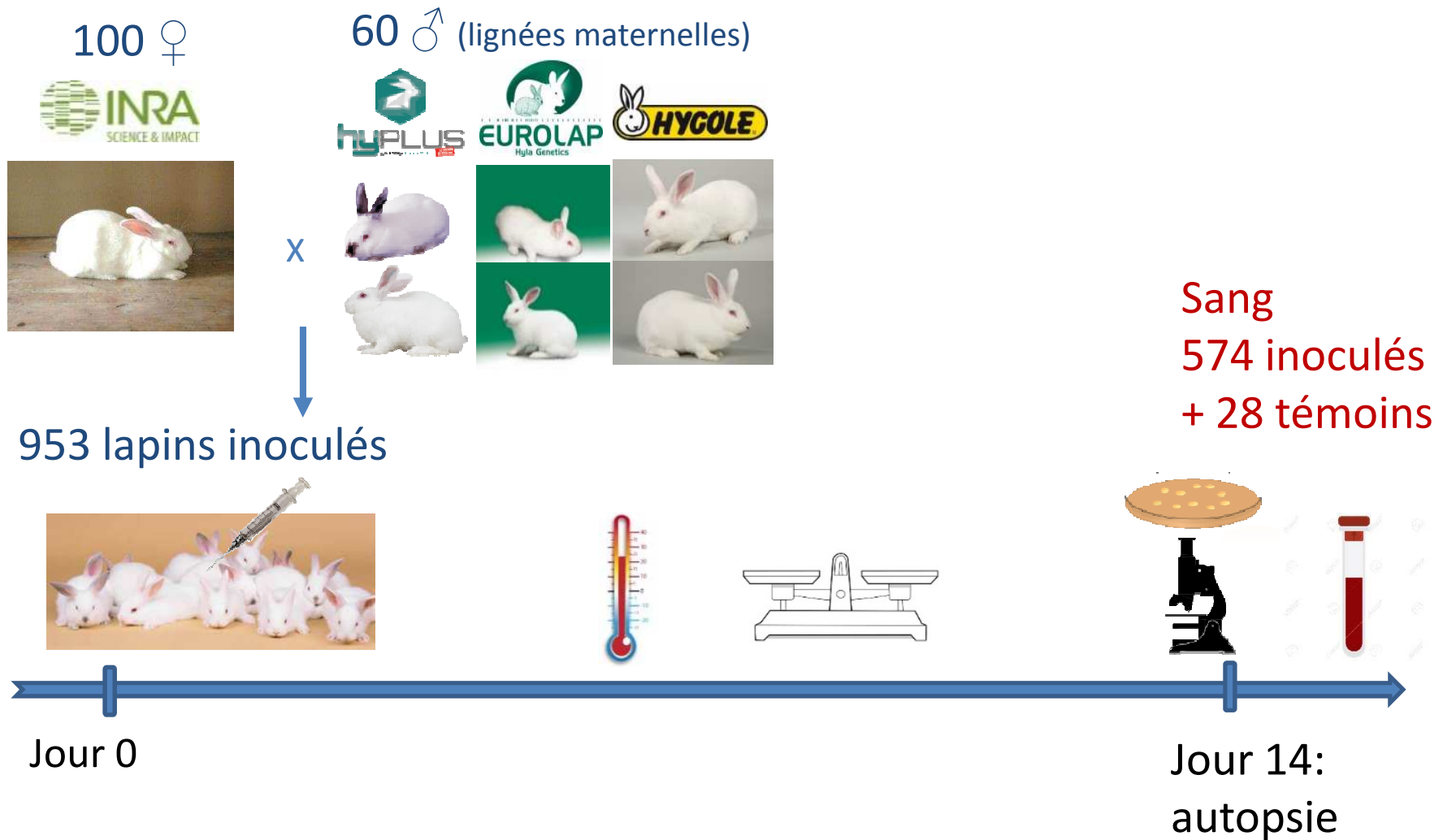


**Projet RELAPA (génomique pour la résistance
génétique des lapins a la pasteurellose)
Statut hématologique de lapins résistants et
sensibles**



JRC 2019

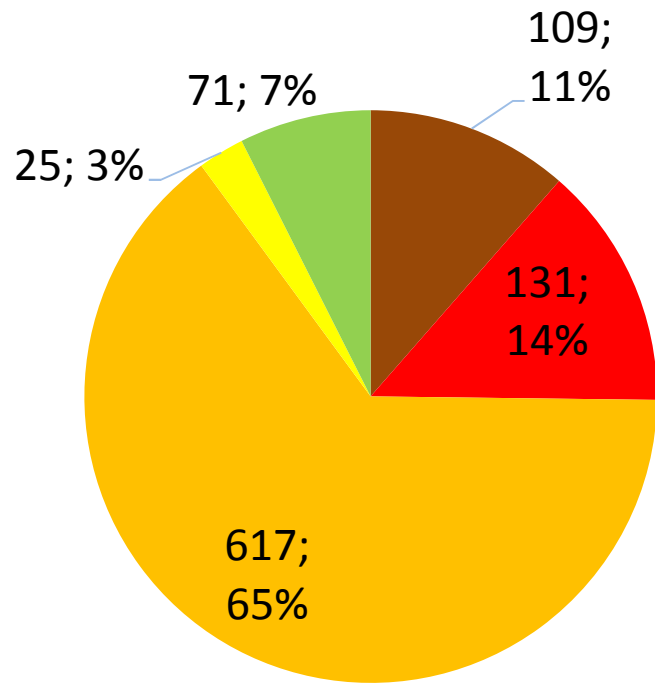
Le projet Relapa



Identifier des caractères et des régions de l'ADN associés à la résistance
Proposer des stratégie de sélection

Note de résistance

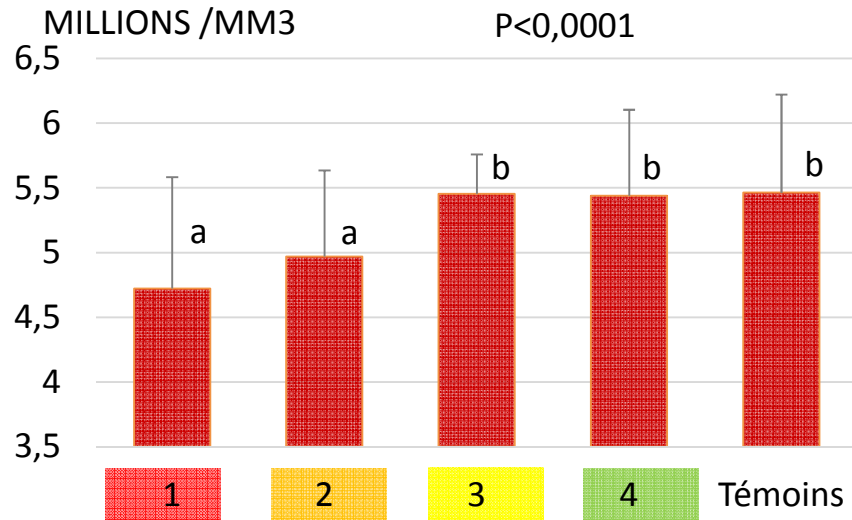
Présence of *Pasteurella multocida* (*Pm*) dans les organes (rate, poumon, foie), dissémination des abcès, mortalité



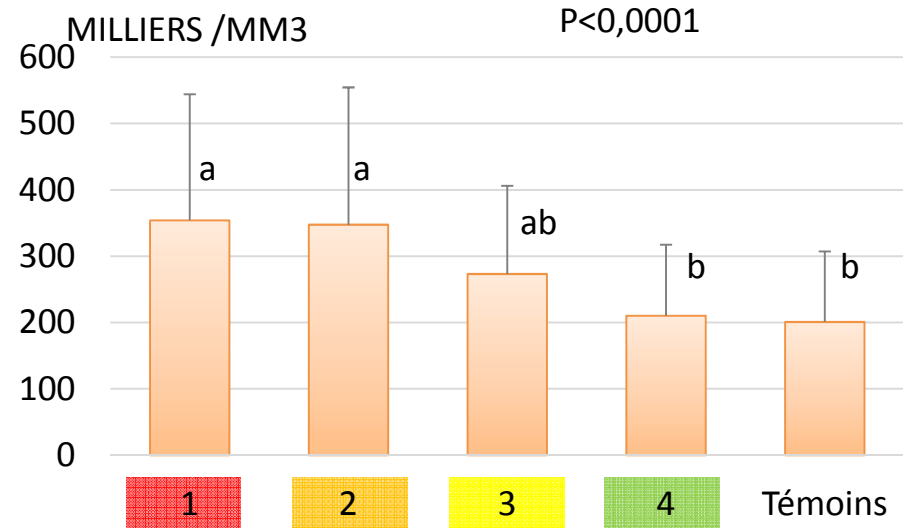
- 0 Morts ou euthanasiés porteurs de *Pm*
- 1 Abcès dans les cavités internes, organes contaminés par *Pm*
- 2 Abcès sous-cutanés, aucun abcès dans les cavités internes, pas de *Pm* dans les organes
- 3 Abcès au site d'inoculation uniquement, pas de *Pm* dans les organes
- 4 Pas d'abcès, pas de *Pm* détectées

Comptages de globules et plaquettes

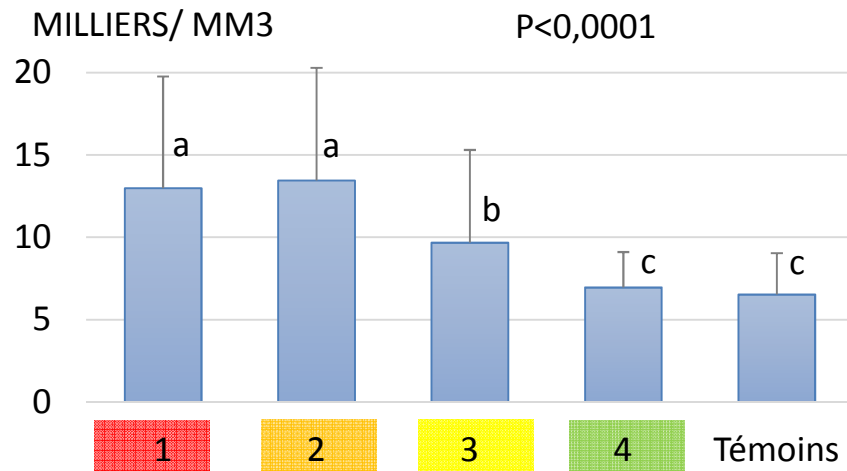
Globules rouges => transport de l'oxygène



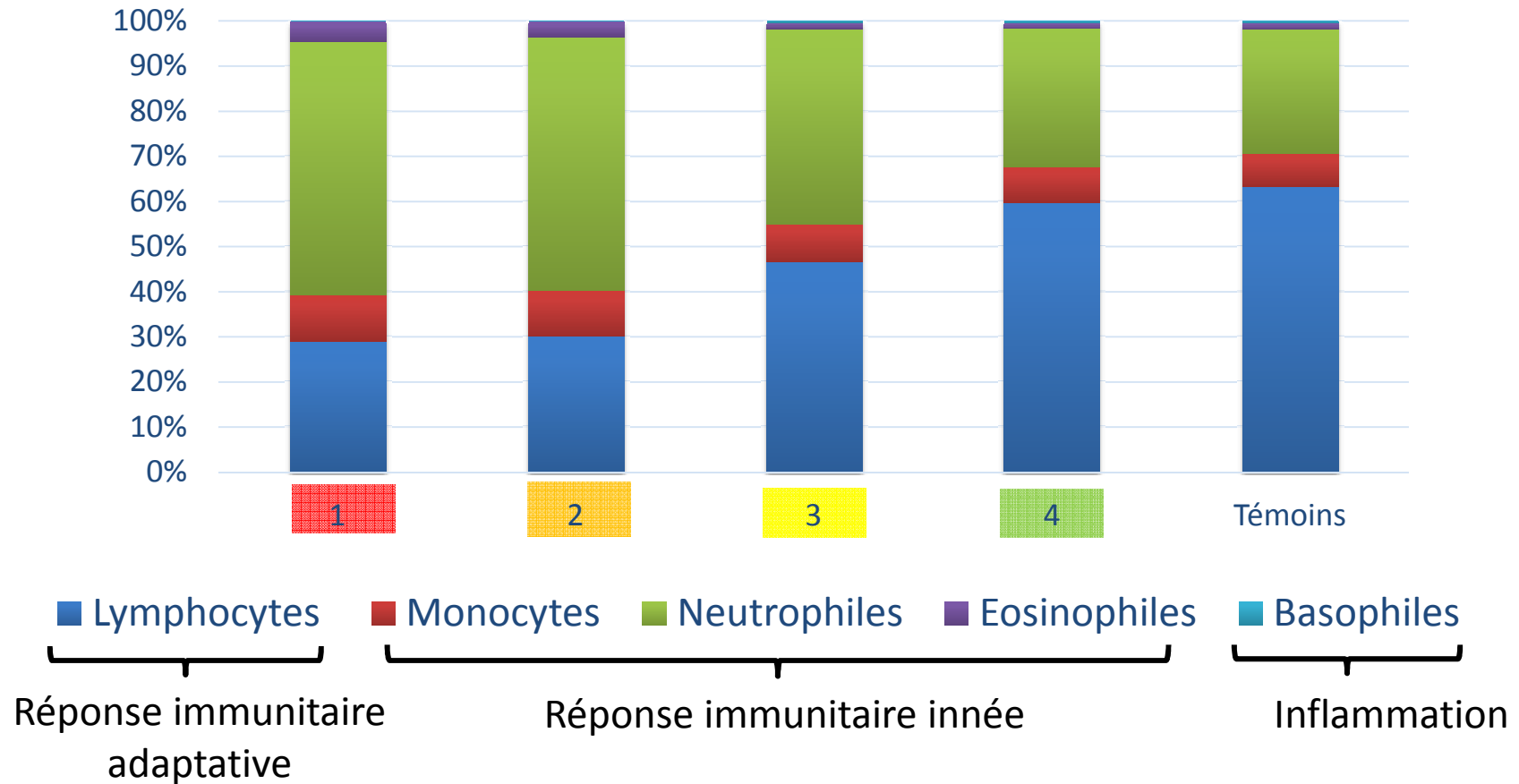
Plaquettes => Coagulation du sang



Globules blancs => réponse immunitaire



Proportion de types de globules blancs



Les animaux sensibles :

- + de monocytes, neutrophiles, éosinophiles (réponse innée)
- de lymphocytes (réponse adaptative)
- de basophiles (inflammation)

Significativité de différents effets pour les caractères mesurés

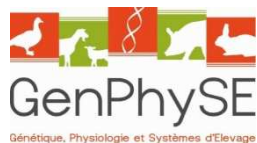
Caractères	Effets fixes		Effet aléatoire
	EEL	Note de résistance	Père
Globules Rouges (millions/mm ³)		***	
Plaquettes (milliers/mm ³)		***	*
Globules Blancs (milliers/mm ³)		***	**
Lymphocytes (%)		***	*
Monocytes (%)		***	***
Neutrophiles (%)		***	*
Eosinophiles (%)	***	***	
Basophiles (%)		***	

« » =non significatif. P<0,05=*. P<0,01=**. P<0,001=***

Autres effets testés (non présentés ici): bande, sexe, bande*EEL

Conclusion

- Profils hématologiques significativement différents entre animaux résistants et sensibles
- L'effet significatif du père sur plusieurs types de leucocytes laisse présager l'existence d'une variabilité génétique sous-jacente



Pectoul GABI



Laboratoire
de Touraine