



## **18èmes Journées de la Recherche Cunicole**

Nantes 27-28 mai 2019

SHRESTHA M., GARREAU H., BALMISSE E., BED'HOM B., DAVID I., GUITTON E., HELLOIN E., LENOIR G., MAUPIN M., ROBERT R., LANTIER F., GUNIA M., 2019. *Projet RELAPA (génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PAsteurellose) : paramètres génétiques.* 18<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, 27 – 28 mai 2019, Nantes, France, **77- 80.**

Texte complet

+

Fichier de présentation orale

## Projet RELAPA (génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PASTeurellose) : paramètres génétiques

Shrestha M.<sup>1</sup>, Garreau H.<sup>1</sup>, Balmisse E.<sup>2</sup>, Bed'hom B.<sup>3</sup>, David I.<sup>1</sup>, Guitton E.<sup>4</sup>, Helloin E.<sup>5</sup>, Lenoir G.<sup>6</sup>, Maupin M.<sup>7</sup>, Robert R.<sup>8</sup>, Lantier F.<sup>9</sup>, Gunia M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>GenPhySE, INRA, INPT, ENVT, Université de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup>PECTOUL, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup>GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup>PFIE, INRA, 37380 Nouzilly, France

<sup>5</sup>ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, France

<sup>6</sup>HYCOLE, Route de Villers-Plouich, 59159 Marcoing, France

<sup>7</sup>HYPHARM SAS, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

<sup>8</sup>Ex-EUROLAP, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

\* correspondante : melanie.gunia@inra.fr

**Résumé** – Cette étude est une première approche d'estimation de paramètres génétiques de résistance à la Pasteurellose par infection expérimentale à *Pasteurella multocida* d'une population de lapins croisés. De nouveaux caractères de résistance ont été étudiés : une note de dissémination des abcès enregistrée à l'autopsie, une note de présence ou absence de *Pasteurella* dans les organes et une note globale de résistance résumant les deux précédentes. Pour ces caractères, l'héritabilité varie de 0,09 ( $\pm 0,05$ ) à 0,16 ( $\pm 0,06$ ). L'héritabilité la plus importante a été estimée pour la note de résistance. Ces estimations suggèrent la contribution d'une composante génétique à la résistance à la pasteurellose. Les corrélations génétiques entre la note de résistance et les différentes mesures de croissance sont élevées et positives, de 0,70 ( $\pm 0,14$ ) à 0,98 ( $\pm 0,06$ ). Il serait donc possible de mettre en place une sélection sur la résistance à la Pasteurellose dans les schémas de sélection de lapins de chair français basée sur un de ces critères. Des études complémentaires doivent encore être conduites sur d'autres caractères de production et de de résistance à la Pasteurellose.

**Abstract – RELAPA project (genomics for rabbit genetic resistance to pasteurellosis): genetic parameters.**

This study is a first approach to estimate genetic parameters of resistance to Pasteurellosis by experimental infection of a crossbred rabbit population with *Pasteurella multocida*. Novel disease-related traits were the abscess dissemination score collected post autopsy, a score related to the presence or absence of *Pasteurella* in the organs from which a composite resistance score was created. For disease-related traits, heritability estimates ranged from 0.09 ( $\pm 0.05$ ) to 0.16 ( $\pm 0.06$ ). Highest heritability was estimated for the resistance trait. Results for heritability estimates suggest a contribution of a genetic component in resistance to Pasteurellosis. The genetic correlations between disease resistance and growth traits were high and positive, varying from 0.70 ( $\pm 0.14$ ) to 0.98 ( $\pm 0.06$ ). These results support the implementation of a selection against Pasteurellosis in the French breeding programs for meat rabbits using such criteria. Further investigations will be performed using additional disease-related and production traits.

### Introduction

La Pasteurellose, maladie causée par *Pasteurella multocida* est une des infections bactériennes les plus communes en élevages commerciaux et chez le lapin de laboratoire. Cette infection provoque une variété de signes cliniques tels que des abcès, pneumonies, rhinites, mammites ou septicémies (Coudert et al., 2006). Dans les élevages commerciaux, la prévention et le contrôle de la dissémination de l'infection sont effectués en maintenant des mesures strictes d'hygiène et de biosécurité, et en utilisant des antibiotiques. Cependant, l'usage des antibiotiques favorise le développement de résistances à ces molécules chez les bactéries et les risques de dysbiose chez les lapins (déséquilibre du microbiote). Des

pratiques alternatives durables sont donc nécessaires pour pallier ces effets négatifs et diminuer la prévalence des infections. Une approche possible est la sélection des lapins pour leur résistance à la Pasteurellose. Des études antérieures ont montré la possibilité d'une telle sélection, sur des caractères de résistance aux maladies ayant des héritabilités faibles à modérées, de 0,034 ( $\pm 0,006$ ) à 0,28 ( $\pm 0,16$ ) (Baselga et al., 1988, Eady et al., 2004, Gunia et al., 2015). Ces études sont basées sur l'observation de signes cliniques d'infections naturelles à partir de données d'élevage ce qui présente deux inconvénients: i) de telles approches ne permettent pas un diagnostic précis du statut sanitaire et peuvent conduire à une sous-estimation de l'héritabilité

(Bishop & Woolliams, 2010), ii) l'exposition inégale à l'infection empêche de détecter le potentiel réel de chaque individu. La présente étude évite ces biais en observant une population exposée à un pathogène de façon systématique et homogène.

L'objectif est d'estimer des paramètres génétiques de résistance à la pasteurellose dans une population de lapins issue de croisements entre une population de référence et des lignées commerciales, puis infectée expérimentalement par *Pasteurella multocida*.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Protocole expérimental

Toutes les expérimentations ont été conduites selon les législations 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.

### 1.2. Animaux

L'étude a débuté au Pôle Expérimental Cunicole de Toulouse (INRA PECTOUL) avec la production de 1030 lapins provenant du croisement de 6 lignées paternelles (deux lignées pour chaque entreprise de sélection : EUROLAP, HYCOLE, et HYPHARM) et une lignée maternelle (1777 INRA). Cette population expérimentale représentative des femelles commerciales utilisées dans les élevages français a été élevée dans un bâtiment neuf et contrôlée pour vérifier l'absence de portage de *Pasteurella multocida*. Les pesées à la naissance et au sevrage ont permis de calculer la croissance en présevrage (GMQ-presev). Le nombre moyen de lapins par lignée était de 172 (minimum : 155 et maximum : 194). La population expérimentale a été obtenue en 5 bandes. La première bande comportait 110 lapins et les quatre bandes suivantes 230 lapins chacune. Le nombre de témoins s'élevait à 50 lapins (10 par bande) et un effectif de 980 lapins devait être inoculé. Le lendemain du sevrage, à l'âge de 36 jours, les lapins ont été transportés à la PlateForme d'Infectiologie Expérimentale (INRA PFIE), où ils ont été logés par cage de 5 dans deux salles, avec une répartition équilibrée des sexes et origines paternelles et maternelles. Sur les 980 lapins, 16 lapins sont morts ou ont été euthanasiés avant l'inoculation pour cause de troubles digestifs, principalement d'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL). L'EEL est une maladie gastro-intestinale qui peut être létale et dont l'étiologie est inconnue.

### 1.3. Inoculation et caractères mesurés

À l'âge de 42 jours, 964 lapins ont été infectés par *Pasteurella multocida*. Ils ont reçu une injection sous-cutanée entre les omoplates d'une dose de 8000 bactéries /0,1 mL de la souche LVT62 de *Pasteurella multocida*. Cette souche pyogène a été sélectionnée pour sa virulence et sa représentativité parmi 160

isolats de *Pasteurella multocida* collectés en élevages cunivols (Helloin *et al.*, 2015). Le statut sanitaire des lapins a été contrôlé quotidiennement durant les 14 jours suivant l'inoculation. Les lapins ont été pesés le jour de l'inoculation puis après 7 et 14 jours. Ces mesures ont permis de calculer la croissance 1 semaine (GMQ-PI1) et deux semaines (GMQ-PI2) après inoculation. Durant l'expérimentation, 120 lapins sont morts ou ont été euthanasiés. Les 844 lapins restant ont été autopsiés après euthanasie le 14<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation.

### 1.4. Définition des caractères de résistance

Les signes cliniques de Pasteurellose ont été enregistrés lors de l'autopsie. Une note évaluant le nombre et l'emplacement des abcès sur chaque partie du corps (point d'inoculation, parties avant, parties arrières du lapin, organes internes) a été attribuée. Elle était enregistrée sur une grille par les mêmes deux scientifiques pour toutes les bandes. La note de « 0 » était attribuée aux lapins ne présentant aucun abcès. Les notes de 1 à 4 correspondaient à une localisation des abcès à distance croissante du site d'inoculation (entre les omoplates, noté 1) jusqu'au corps entiers (noté 3), et aux organes internes (foie, rate, poumons, cavités pulmonaires et péritonéales, noté 4).

Des échantillons de foie, poumons, rate et abcès ont été prélevés et conservés à -80°C de 2 à 3 mois jusqu'à leur homogénéisation et mise en culture au Laboratoire départemental de Touraine pour l'identification et la quantification de *Pasteurella multocida*. Les échantillons de foie étaient prélevés uniquement sur les lapins morts ou euthanasiés durant l'expérimentation. À partir des résultats obtenus, une note « Bactérie » a été définie afin d'évaluer de 0 à 4, l'importance de la colonisation bactérienne. La note de 0 était attribuée aux lapins sans *Pasteurella multocida* détectée tandis que les notes de 1 à 4 correspondaient à une dissémination croissante des bactéries dans le corps. Un caractère composite de résistance, a été créé à partir de la combinaison des notes d'Abcès et de Bactérie. Une note de 4 a été attribuée aux lapins les plus résistants (ni abcès ni bactérie détectés). Les notes de 3 à 0 représentent une diminution de la résistance à la pasteurellose.

### 1.5. Analyses statistiques

Sur les 964 lapins inoculés, 953 lapins ont été conservés pour les analyses statistiques. Onze lapins morts ou euthanasiés sans signe clinique de Pasteurellose et sans qu'aucune *Pasteurella multocida* n'ait été détectée, ont été exclus de l'étude.

Les paramètres génétiques ont été estimés en utilisant un modèle linéaire avec le logiciel ASReml (Gilmour *et al.*, 2002). Les effets fixes suivants ont été testés pour chaque caractère: le sexe (2 niveaux), la bande (5 niveaux), la durée de gestation (4 niveaux : 30, 31, 32, 33 jours pour des effectifs respectifs de 23, 333, 556 et 37 lapins), le rang de mise-bas de la mère (6 niveaux) et les signes cliniques d'EEL (3 niveaux).

Les effets aléatoires testés étaient environnementaux ou génétiques. La portée et la cage (intra bande et intra salle) ont été incluses comme des effets d'environnement aléatoires. Un effet génétique direct et un effet génétique maternel ont été inclus comme effets aléatoires. Un effet lignée (paternelles et maternelle) a été introduit en utilisant des groupes génétiques dans le pedigree. Les valeurs de vraisemblance obtenues avec ASReml ont été utilisées dans des tests de vraisemblance avec logiciel R (R Core Team, 2015) pour contrôler la significativité des effets aléatoires. Les paramètres

génétiques ont été estimés en prenant uniquement en compte les effets fixes et aléatoires significatifs. Les estimations présentées ici sont la moyenne des résultats d'analyses quadri-caractères. Ces analyses incluent deux caractères mesurés sur les animaux croisés inoculés et deux caractères en sélection (le nombre de nés vivants et le poids au sevrage) mesurés sur des apparentés en race pure. Ces deux derniers caractères ont été introduits dans le modèle pour limiter les biais d'estimation causés par la sélection. Les résultats sur ces caractères seront présentés dans une autre publication.

**Tableau 1. Nombre d'animaux évalués, moyenne (écart-type), effets fixes significatifs, héritabilité et effet d'environnement commun de portée (erreur standard).**

Caractères	n	Moyenne (Ecart-type)	Significativité des effets fixes				h <sup>2</sup> (Erreur standard)	c <sup>2</sup> Portée (Erreur standard)
			EEL	Bande	Durée gestation	rang		
Résistance	953	1,81 (0,94)	**	*	ns	ns	0,16 (0,06)	ns
Abcès	953	2,61 (1,02)	**	*	ns	ns	0,13 (0,06)	0,06 (0,03)
Bactérie	951	1,36 (0,96)	**	**	ns	ns	0,09 (0,05)	ns
GMQ- presev	980	27,14 (4,27)	ns	**	**	**	0,13 (0,10)	0,46 (0,05)
GMQ-PI1	902	2,94 (18,23)	*	**	ns	ns	0,29 (0,07)	ns
GMQ-PI2	852	19,76 (17,89)	*	ns	ns	ns	0,19 (0,06)	ns

\*\* P-value < 0,001. \* P-value < 0,05. ns: Non-significatif (P-value > 0,05). Résistance, Abcès, Bactérie : notes de 0 à 4 (de 0 pour forte sensibilité, aucun abcès, aucune bactérie, à 4 pour résistance, forte dissémination des abcès, forte colonisation bactérienne).

GMQ: Gain Moyen Quotidien en grammes par jour. Presev : entre la naissance et le sevrage. PI1 : 1<sup>ère</sup> semaine post inoculation. PI2 : 2<sup>ème</sup> semaine post inoculation.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Chiffres clés sur l'ensemble de l'essai

Parmi les 953 lapins utilisés lors des analyses, 72 n'avaient aucun abcès, 72 n'avaient aucune *Pasteurella multocida* détectée, et 71 étaient notés comme résistants à la pasteurellose (sans abcès ni *Pasteurella multocida* détectée).

Les effets significatifs testés sont décrits dans le Tableau 1. L'effet de la durée de gestation permet de

corriger le poids sevrage pour les durées variables entre la naissance et le sevrage. Les effets cage et génétiques maternels n'étaient jamais significatifs. Les lapins atteints d'EEL sont aussi plus atteints par la pasteurellose, avec des notes d'Abcès et de Bactérie plus élevées, et une note de Résistance plus faible. Ils ont aussi une croissance inférieure en pré-sevrage et post inoculation. Ces résultats suggèrent une interaction possible entre pasteurellose et EEL.

**Table 2. Corrélations génétiques (au-dessus de la diagonale), phénotypiques (en-dessous de la diagonale) et erreurs standards (entre parenthèses).**

	Abcès	Bactérie	Résistance	GMQ-presev	GMQ-PI1	GMQ-PI2
Abcès		0,99 (0,16)	-0,99 (0,05)	-0,95 (0,46)	-0,99 (0,09)	-0,83 (0,15)
Bactérie	0,58 (0,02)		-0,98 (0,07)	-0,62 (0,43)	-0,97 (0,16)	-0,76 (0,16)
Résistance	-0,80 (0,01)	-0,84 (0,01)		0,79 (0,36)	0,98 (0,06)	0,70 (0,14)
GMQ-presev	-0,14 (0,04)	-0,08 (0,03)	0,13 (0,03)		0,49 (0,32)	0,45 (0,36)
GMQ-PI1	-0,67 (0,02)	-0,51 (0,03)	0,69 (0,02)	0,06 (0,04)		0,46 (0,18)
GMQ-PI2	-0,53 (0,03)	-0,58 (0,03)	0,56 (0,03)	0,02 (0,04)	0,31 (0,03)	

GMQ: Gain Moyen Quotidien en grammes par jour. presev : entre la naissance et le sevrage. PI1 : 1<sup>ère</sup> semaine post inoculation. PI2 : 2<sup>ème</sup> semaine post inoculation. Résistance, Abcès, Bactérie : notes de 0 à 4 (de 0 pour forte sensibilité, aucun abcès, aucune bactérie, à 4 pour résistance, forte dissémination des abcès, forte colonisation bactérienne).

### 2.2. Héritabilités

Les héritabilités sont présentées dans le Tableau 1. Parmi les 3 notes, celle de Bactérie a l'héritabilité la plus faible, à 0,09 ( $\pm 0,05$ ) et celle de Résistance a

l'héritabilité la plus élevée avec 0,16 ( $\pm 0,06$ ). L'héritabilité la plus forte est celle du GMQ-PI1, qui atteint 0,29 ( $\pm 0,07$ ). Il existe donc un contrôle génétique de la résistance à la pasteurellose, et ces

différentes notes pourraient être utilisées comme critères de sélection, même si cela suppose un dispositif expérimental important (inoculation de collatéraux de candidats à la sélection en bâtiments protégés).

Les héritabilités des notes sont similaires à celles de l'étude de Baselga et al., (1988), qui porte sur une note de lésions pulmonaires à l'autopsie. Nos héritabilités sont plus élevées que celle des études de Eady et al., (2004), Eady et al., (2007), et Gunia et al., (2015). Cela peut s'expliquer par l'exposition systématique des animaux au pathogène, et par un système de notation de la résistance aux maladies différent. Dans notre étude, le diagnostic de résistance ou sensibilité à la pasteurellose permet d'identifier une véritable résistance à l'infection ; ceci est plus difficile à obtenir dans le contexte d'une infection naturelle ou lorsque le diagnostic est uniquement basé sur des signes cliniques.

### 2.3. Corrélations

Les corrélations génétiques et phénotypiques sont présentées dans le Tableau 2. Les corrélations génétiques entre la note de Résistance et les différentes mesures de croissance sont élevées et positives, de 0,70 ( $\pm 0,14$ ) à 0,98 ( $\pm 0,06$ ). Les lapins les plus atteints par la pasteurellose ont une moins bonne croissance. Les corrélations génétiques entre les notes d'Abcès ou de Bactérie d'une part, et les caractères croissance et la note de Résistance d'autre part, sont fortement négatives.

Les corrélations génétiques sont favorables entre le GMQ en pré-sevrage et les différentes notes de résistance et de croissance post-inoculation ; les animaux ayant une meilleure croissance avant sevrage semblent être plus résistants, suggérant un effet plutôt favorable de la sélection pondérale sur les critères de résistance à l'infection par *Pasteurella*.

Les corrélations entre les différentes notes d'Abcès, Bactérie, Résistance, sont plus fortes avec le GMQ-PI1 qu'avec le GMQ-PI2. Cela peut s'expliquer par une différence de réponse à l'infection entre les deux périodes. Les lapins ont été plus fortement impactés la première semaine après inoculation comparativement à la deuxième semaine.

Ces premiers résultats montrent qu'il serait possible de sélectionner les lapins sur leur résistance à la pasteurellose. La note de résistance ou le GMQ de la 1<sup>ère</sup> semaine post infection peuvent être des critères de sélection intéressants, leurs héritabilités sont assez élevées, et ils sont fortement corrélés aux autres caractères mesurés.

### Conclusions

Notre étude présente une première estimation de paramètres génétiques de caractères de résistance à une infection expérimentale à *Pasteurella multocida*.

Elle fait apparaître une composante génétique des caractères de résistances enregistrés sur cette population. Ces résultats laissent présager de la possibilité de diminuer la prévalence des infections à *Pasteurella* grâce à la sélection des lapins sur un de ces caractères de résistance.

### Remerciements

Le projet a été financé par l'Institut Carnot Santé Animal 2015, par les entreprises de sélection Eurolap, Hycole et Hypharm, et par le CLIPP. Le premier auteur a reçu un financement post doctoral de la part de « the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n. PCOFUND-GA-2013-609102 » grâce au programme PRESTIGE coordonné par Campus France.

Nous remercions tous les participants au projet pour la qualité de leur travail, en particulier les équipes du CIRM, de PECTOUL, de la PFIE, d'Eurolap, Hycole, et Hypharm. Nous remercions le Laboratoire départemental de Touraine pour la qualité de ses analyses bactériologiques.

### Références

- Baselga, M., Deltoro, J., Camacho, J., & Blasco, A., 1988. Genetic analysis on lung injury in four strains of meat rabbit. *Proc. 4th World Rabbit Congress*. 120-127.
- Bishop, S. C., & Woolliams, A. J., 2010. On the genetic interpretation of disease data. *PLoS ONE*. 5:e8940.
- Carrey, G., 1988. Inference about genetic correlations. *Behaviour Genetics*. 18: 329-338.
- Coudert P., Rideau P., Virag G., Cerrone A., 2006. Pasteurellosis in rabbit. *In: Recent advances in rabbit sciences, Maertens L., Coudert P. (Eds), ILVO, Melle, Belgique, 147-162.*
- Eady, S. J., Garreau, H., & Hurtaud, J., 2004. Heritability of resistance to bacterial infection in commercial meat rabbit populations. *Proc. 8th World Rabbit Congress*: 51-56.
- Eady, S. J., Garreau, H., & Gilmour, A. R., 2007. Heritability of resistance of bacterial infection in meat rabbits. *Livestock Science*. 112. 90-98.
- Gilmour, A. R., Gogel, B. J., Cullis, B. R., Welham, S. J. & Thompson, R., 2014. ASReml User Guide Release 4.1 Functional Specification, VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP11ES, UK.
- Gunia, M., David, I., Hurtaud, J., Maupin, M., Gilbert, H., & H. Garreau, H., 2015. Resistance to infectious diseases is a heritable trait in rabbits. *Journal of Animal Science*. 93: 5631-5638.
- 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<sup>èmes</sup> J. Rech. Cunicoles, Le Mans*, 43-46.
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Merina Shrestha, Hervé Garreau, Elodie Balmisse, Bertrand Bed'hom, Ingrid David, Edouard Guitton, Emmanuelle Helloin, Guillaume Lenoir, Mickaël Maupin, Raphaël Robert, Frédéric Lantier, Mélanie Gunia



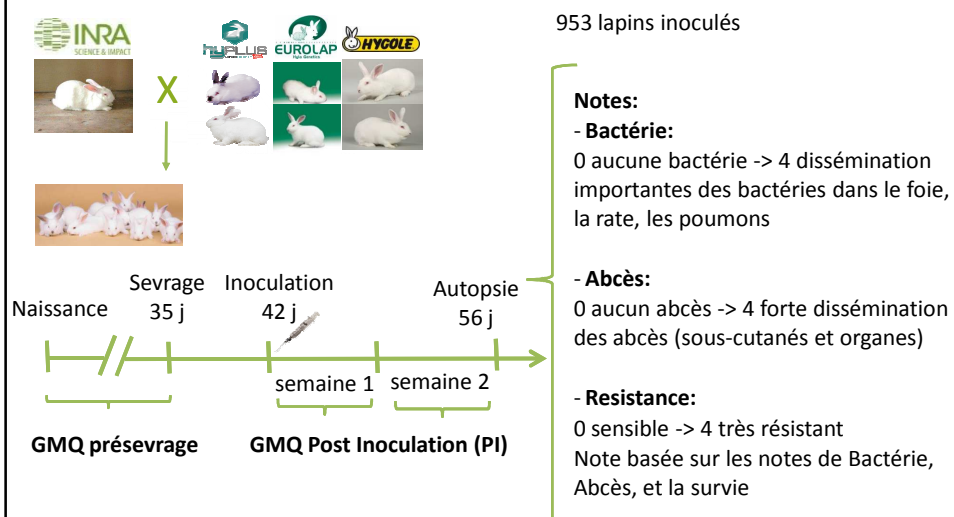
## Projet RELAPA (génomique pour la résistance génétique des lapins à la pasteurellose): Paramètres génétiques

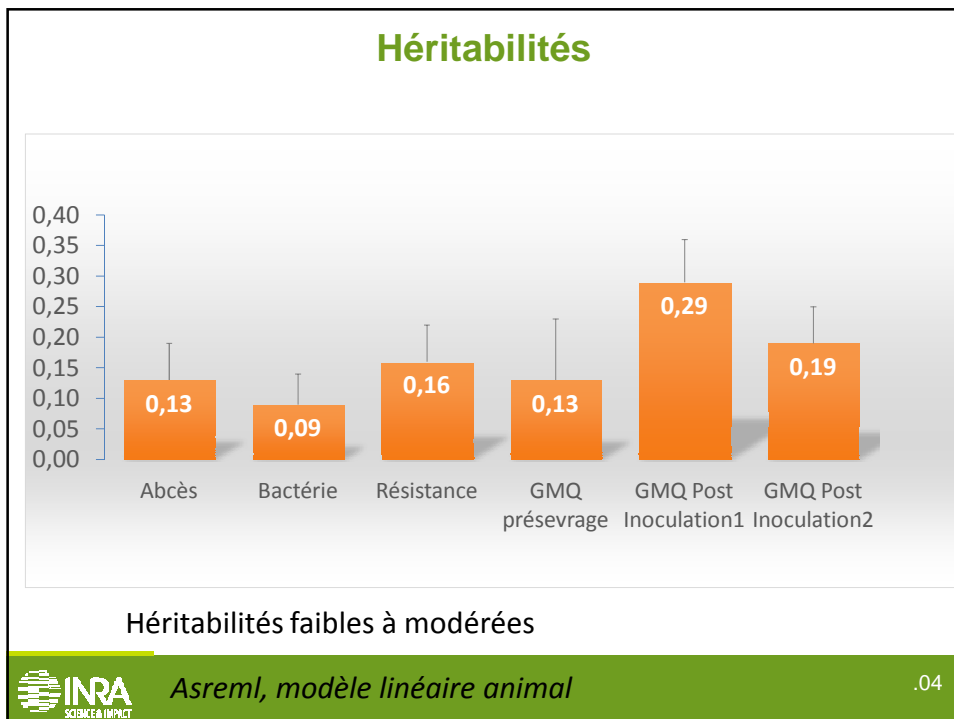
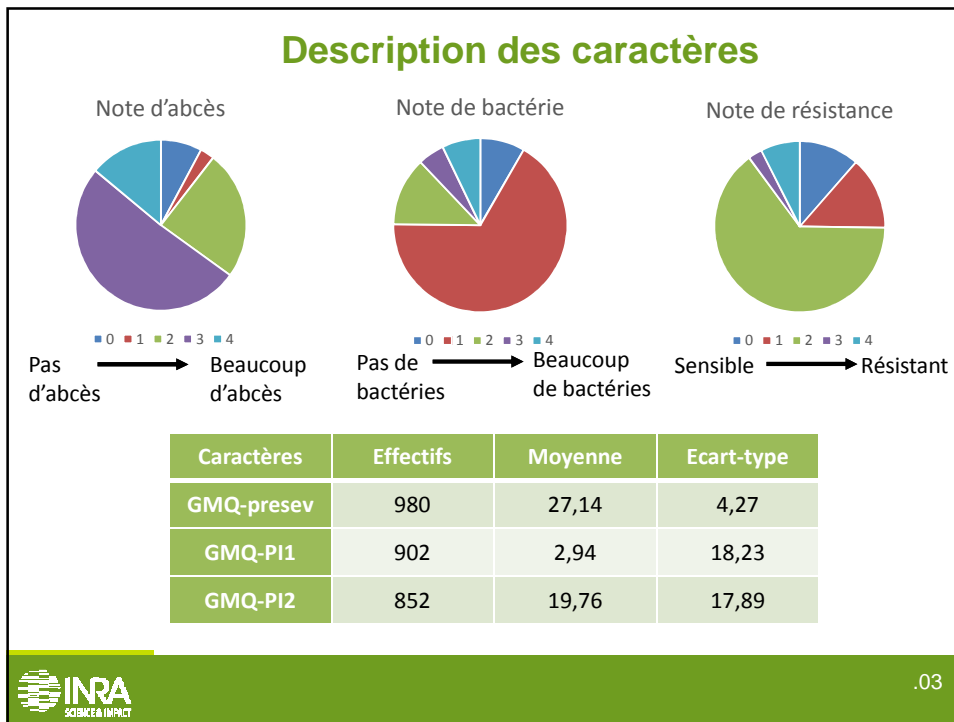


JRC 2019

28/05/2019

### Protocole expérimental





## Corrélations génétiques

	Bactérie	Résistance	GMQ pré-sevrage	GMQ PI semaine 1	GMQ PI semaine 2
Abcès	0,99	-0,99	-0,95	-0,99	-0,83
Bactérie		-0,98	-0,62	-0,97	-0,76
Résistance			0,79	0,98	0,70
GMQ pré-sevrage				0,49	0,45
GMQ PI semaine 1					0,46

Corrélations génétiques élevées et « logiques »

*En italique: corrélations non significativement différentes de 0*



.05

## Conclusion

- Il existe une composante génétique à la résistance à la pasteurellose
- Le GMQ en 1<sup>ère</sup> semaine Post-Infection pourrait être un bon critère de sélection:
  - héritabilité élevée (0,29)
  - corrélation favorable avec la résistance
  - plus simple à mesurer que les notes MAIS nécessite un challenge expérimental
- Suite => détection de régions du génome associées à la résistance à la pasteurellose



Pectoul GABI



Laboratoire de Touraine