

Détection de différents agents potentiellement pathogènes chez des lapins atteints d'entéropathie épizootique du lapin. Recherche de corrélation entre la présence de ces agents et l'observation de la pathologie par comparaison avec des lapins non atteints

C. PERSILLON¹, C. FRANCHET¹, D. LICOIS², G. RAVOT¹

¹Protéus, 70 allée Graham Bell, 30000 Nîmes, France

²INRA, UR86, BioAgresseur Santé Environnement, 37380 Nouzilly, France

Résumé. Des séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques de différents agents potentiellement pathogènes (bactéries, virus et phages) ont été recherchées dans un inoculum reproduisant l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) (inoculum TEC3). Les séquences qui ont été détectées dans cet échantillon ont ensuite été recherchées dans une série d'échantillons : autres inoculums (TEC), inoculums négatifs issus de lapin EOPS, échantillons intestinaux issus de lapins d'élevages atteints ou non d'EEL, échantillons d'air collectés lors de reproduction expérimentale de l'EEL. Ces résultats permettent de proposer des hypothèses sur le ou les agents pathogènes responsables de l'EEL. La validité de ces hypothèses devra être évaluée par des expérimentations complémentaires.

Abstract - Detection of potentially pathogenic agents in rabbits affected by Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE). Search for a correlation between the presence of these agents and the pathology by comparison with non affected rabbits. DNA or RNA sequences specific for several potentially pathogenic agents (bacteria, viruses, phages) have been searched in an inoculum reproducing ERE (inoculum TEC3). The ones that have been detected in this sample have been searched in different kinds of samples: other inoculums (TEC), negative (control) inoculums, intestinal samples collected from rabbits of rabbit farms affected or not by ERE, air samples collected during experimental reproduction of ERE. These results allow proposing hypotheses about the pathogenic agent(s) responsible for ERE. The validity of these hypotheses will have to be confirmed by complementary experiments.

Introduction

Depuis l'émergence de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL), des recherches ont été entreprises pour tenter d'identifier et d'isoler le ou les agents pathogènes responsables de ce syndrome digestif grave. Les éléments disponibles initialement laissaient suspecter une infection virale. Les travaux ont donc d'abord été ciblés sur la recherche de virus (Le Gall *et al.*, 1998, Licois *et al.*, 2000, Le Gall-Reculé *et al.*, 2002, notes 13 et 14 sur l'EEL (<http://www.tours.inra.fr/urbase/internet/resultats/enterocolite/entero1.htm>)). En dehors de rotavirus, retrouvés dans les inoculums TEC de l'INRA (TEC1 et dérivés), (Licois et Coudert, 2001) et dans certains échantillons de terrain (Céré *et al.*, 2000, Marlier *et al.*, 2003), aucun autre type de virus n'a pu être mis en évidence. Les rotavirus ne sont sans doute pas les agents primaires impliqués dans la maladie (Licois *et al.*, 2005). De même, les recherches effectuées dans le domaine de la bactériologie n'ont pas permis d'apporter une réponse univoque (Licois *et al.*, 2000, Marlier *et al.*, 2003). *Clostridium perfringens* est néanmoins un bon candidat, sans pour autant que son rôle primaire dans le développement de l'EEL n'ait été pour le moment démontré (Le Normand *et al.*, 2003, Dewrée *et al.*, 2003). A ce jour, l'agent responsable de l'EEL n'est donc pas identifié.

Dans ces conditions, d'autres pistes devaient être explorées. C'est ainsi qu'une approche moléculaire

basée sur l'analyse des acides nucléiques extraits des contenus intestinaux d'animaux atteints d'EEL, comparativement à ceux provenant d'animaux sains, semblait intéressante. En outre, l'utilisation de bio-collecteurs permettant de concentrer les particules présentes dans l'air d'un local hébergeant des lapins atteints par l'EEL, dans un faible volume de liquide a permis de disposer d'échantillons moins riches en micro-organismes mais capables de reproduire l'EEL par inoculation *per os* chez le lapin (Licois *et al.*, 2003). Nous rapportons ici les analyses moléculaires réalisées sur les échantillons de collecte d'air, les inoculums TEC et des prélèvements intestinaux issus de lapins exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) (témoins négatifs) ou d'élevages atteints par l'EEL.

1. Matériel et méthodes

1.1. Cultures

Les clostridies aérotolérantes ont été recherchées par culture en milieu LB à 30°C sans agitation. Les anaérobies strictes ont été recherchées par culture en milieu HSYTG (Half strength tryptone-yeast extract-glucose medium) contenant 1g/L NaCl et 0,1g/L MgCl₂.6H₂O (Brefort *et al.*, 1977) en conditions anaérobies. Les échantillons dans lesquels aucune croissance n'a été constatée ont été considérés comme négatifs pour les clostridies. Les acides nucléiques ont été extraits des cultures pour lesquelles une croissance a été détectée.

1.2. Extraction d'acides nucléiques

Les acides nucléiques ont été extraits des cultures (pour la détection des clostridies) et des échantillons pour la détection des autres cibles. Les cellules présentes dans les échantillons et les cultures ont été lysées dans un FastPrep (BIO101), pendant 3 x 45 s dans un tube de matrice D (BIO101). Les acides nucléiques ont ensuite été purifiés avec le kit Qiagen DNA Stool.

1.3. Amplification

Les agents infectieux recherchés sont présentés dans le tableau 1 ainsi que les méthodes de détection choisies pour chacun d'eux.

Tableau 1 : Cibles recherchées et mode de détection

Cible recherchée	Mode de détection*
intégrases phagiques	PCR CoDeHOP (7)
lysozymes phagiques	PCR CoDeHOP (4)
Shiga toxine	PCR CoDeHOP (3)
ADN ribosomal 16S de la clostridie P2040	PCR nichée
toxines 1 à 6 de <i>C. perfringens</i>	PCR (6)
toxines 1 à 3 de <i>C. difficile</i>	PCR (3)
rotavirus	RT-PCR CoDeHOP (3)
astrovirus	RT-PCR CoDeHOP (1)
calicivirus	RT-PCR CoDeHOP (4) + RT-PCR spécifique (1)
adénovirus entériques	PCR CoDeHOP (1)
parvovirus	PCR spécifique (1)
coronavirus / torovirus	RT-PCR CoDeHOP (1)
orthoréovirus	RT-PCR CoDeHOP (7)
orbivirus	RT-PCR CoDeHOP (8)
coltivirus	RT-PCR CoDeHOP (3)

* entre parenthèse, le nombre de paires d'amorces

Pour les séquences cibles très conservées (toxines de Clostridies) des amorces spécifiques ont été dessinées. En revanche, dans les cas où nous cherchons à détecter une famille de gènes ou de virus, des amorces dégénérées ont été dessinées selon la méthode CoDeHOP (Rose *et al.*, 1998) dans les régions les plus conservées. Dans certains cas, les séquences sont suffisamment homologues pour qu'une seule paire d'amorces CoDeHOP permette la détection de toutes les séquences de la famille (exemple : parvovirus) ; pour d'autres cibles, les séquences ont dû être regroupées en sous-groupes, avec une paire d'amorces CoDeHOP par sous-groupe (exemple : rotavirus).

Dans le cas des ADN 16S de la Clostridie isolée d'un échantillon de collecte d'air (P2040), la PCR simple n'était pas suffisamment spécifique de cette espèce : une PCR nichée a donc été réalisée.

Les séquences de bactéries, de parvovirus ou d'adénovirus étant de l'ADN, elles ont été recherchées par PCR. Les séquences virales (sauf adénovirus et parvovirus) étant de l'ARN, elles ont été recherchées par RT-PCR. Les phages peuvent être

présents soit libres à l'intérieur de la bactérie (dans ce cas, leur génome est soit de l'ADN, soit de l'ARN selon les espèces) soit intégré dans le génome de la bactérie sous forme d'ADN. Les séquences de phages ont donc été amplifiées par PCR et RT-PCR.

2. Résultats

2.1. Recherche des séquences cibles dans l'inoculum TEC3

Une étude bibliographique a été réalisée afin d'identifier les agents causant des maladies gastro-intestinales chez les mammifères ainsi que les agents pathogènes du lapin. Ces agents sont des bactéries, des phages conférant une pathogénicité aux bactéries qu'ils infectent et des virus (voir tableau 1).

Une première sélection des cibles d'intérêt a été réalisée en analysant deux échantillons : l'inoculum TEC3 (Licois *et al.*, 2005) et un échantillon préparé selon le même protocole que TEC3 mais à partir de lapins EOPS (témoin négatif).

Phages : (tableau 2). Tous les produits amplifiés à partir de TEC3 ont été séquencés pour identification. Les séquences ont été comparées à celles présentes dans les bases de données par BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Les produits amplifiés ne présentant aucune homologie significative avec des séquences publiées sont probablement des artefacts dus à l'utilisation des amorces dégénérées. Trois séquences présentent de fortes homologies avec les séquences de lysozyme des bactériophages μ et Qin et d'intégrase du bactériophage 21. A notre connaissance, aucune publication ne décrit de gènes de toxines associés aux phages Qin et Mu, ni de lien entre de tels phages et la pathogénicité de leurs hôtes. En revanche, le phage 21 est un phage lambdoïde et certains phages lambdoïdes codent pour les Shiga toxines et sont donc associés à la virulence de leurs hôtes (Perna *et al.*, 2001). Trois paires d'amorces CoDeHOP permettant la détection des Shiga toxines ont donc été dessinées et les échantillons TEC3 et témoin ont été analysés. L'analyse du seul amplicon obtenu (environ 500 pb, échantillon TEC3) a montré qu'il ne correspondait pas à une Shiga toxine. Les analyses réalisées semblent donc montrer que l'EEL ne serait pas liée à la présence d'un phage.

Tableau 2 : Détection des phages dans l'échantillon TEC3

Cible	PCR ou RTPCR	paire d'amorces	produit(s) amplifié(s) (pb)	homologie (BLAST)
lysozyme	PCR (*)	n°4	500	aucune
			300(*) 200	phage μ (96%)
	RT-PCR	n°2	310	aucune phage Qin (99%)
Intégrase	PCR	n°6	340	phage 21 (95%)

(*) une bande de la même taille est détectée dans l'échantillon témoin

Tableau 3 : Détection des cibles dans différents échantillons

Echantillon	PR V1	P20 40	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	CP 5	CP 6
TEC4	+	+	+	-	-	+	-	-
	+	+	+	-	+	+	-	-
	+	+	+	-	+	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-	-
TEC3	+	+	+	-	-	+	+	-
	+	+	+	-	+	-	-	-
TEC1	+	+	+	-	+	+	-	-
TEC4 10 ⁻²	+	+	+	+	+	-	-	-
TEC4 10 ⁻⁴	-	-	+	-	-	-	-	-
TEC4 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	+	-	-
Inoc – (EOPS-	-	-	-	-	-	-	-	-
air +	+	+	+	-	+	-	-	-
air +	+	+	+	-	+	-	-	+
air +/-	-	+	+	-	-	-	-	-
air +/-	+	+	+	-	-	-	-	-
int +	+	-	+	-	+	-	-	-
int +	+	-	+	-	+	-	-	-
int +	+	+	+	-	-	-	-	-
int +	+	-	+	-	-	+	-	-
int +	+	+	+	-	-	-	-	-
int +	+	+	+	-	-	-	-	-
int +	+	+	+	-	-	-	-	-
int +	+	+	+	-	+	-	-	-
int +	+	+	+	-	-	+	-	-
int + AS	-	+	+	-	+	-	-	-
int + AS	-	+	+	-	+	+	-	-
EOPS-A	+	-	-	-	-	-	-	-
EOPS-A	+	-	+	-	-	-	-	-
EOPS-B	+	-	+	-	+	-	-	-
EOPS-B	+	-	-	-	-	-	-	-
EOPS-A	+	-	-	-	-	-	-	-
EOPS-A+cocc	-	+	+	-	+	-	-	-
EOPS-A+coli	-	-	-	-	-	-	-	-
int –	+	-	+	-	-	-	-	-
int –	+	-	-	-	-	-	-	-
Int –	+	-	+	-	-	-	-	-
int –	+	+	+	-	-	-	-	-
Int –	+	-	+	-	-	-	-	-

air + : collecte d'air reproduisant l'EEL après inoculation à des lapins EOPS, air +/- : collecte d'air induisant une perte de GMQ après inoculation à des lapins EOPS ; TEC : inoculum INRA ; inoc - : inoculum négatif (contrôle) ; int + : échantillon intestinal de lapins sevrés issus d'élevages différents, atteints d'EEL ; int + AS : échantillon intestinal de lapins atteints d'EEL avant sevrage ; int - : échantillon intestinal de lapins sevrés issus d'élevages différents non atteints ; EOPS : échantillon intestinal de lapins EOPS de 2 origines différentes (A et B) ; +cocc : inoculés coccidies ; +coli : inoculés *E. coli* O103.

Clostridies : aucune séquence codant pour une toxine de *C. difficile* n'a été détectée. En revanche, une séquence spécifique des ADN 16S de la Clostridie P2040 était présente dans les deux échantillons (TEC3 et témoin). Les séquences codant pour les toxines

CP1, CP4 et CP5 de *C. perfringens* sont présentes dans TEC3 mais aucune n'est présente dans le témoin.

Virus : Des amplicons ont été obtenus avec six paires d'amorces différentes. Quatre de ces paires correspondent à la même famille de virus ; les produits amplifiés font respectivement 420, 480, 500 et 900pb). Les deux autres correspondent à deux autres familles ; les produits amplifiés font respectivement 320 et 900pb. Les six produits amplifiés ont été séquencés et analysés par BLAST (Altschul *et al.*, 1997) : cinq d'entre eux n'ont aucune homologie significative avec des séquences publiées ; il s'agit probablement d'artefacts de PCR. La sixième séquence a une forte homologie avec une famille de virus (il ne s'agit pas des rotavirus déjà détectés dans les inoculums TEC). Cette séquence a été appelée PRV1.

2.2 Recherche des séquences cibles dans une série d'échantillons intestinaux

Les cibles détectées dans l'inoculum positif (ADN 16S de la clostridie P2040, toxines de *C. perfringens* CP1 à CP6 et PRV1) ont ensuite été recherchés dans une série d'échantillons afin d'évaluer la corrélation entre leur présence et la maladie.

Différents types d'échantillons ont été analysés :

- différents inoculums (TEC) préparés par l'INRA à partir de lapins atteints d'EEL ainsi que des dilutions de ces inoculums
- des inoculums négatifs provenant de lapins EOPS
- les échantillons de collecte d'air prélevés lors de reproduction expérimentale de l'EEL.
- des échantillons intestinaux de lapins issus d'élevages atteints ou non d'EEL

Les résultats sont présentés dans le tableau 3. Une corrélation évidente entre la présence de la cible dans l'échantillon et la maladie n'apparaît pour aucune des cibles recherchées. Cependant, la détection de séquences d'acides nucléiques spécifiques d'agents pathogènes dans ces échantillons devra être prise en compte lors d'études complémentaires. Il est à noter que, pour des échantillons analysés plusieurs fois au cours d'expériences indépendantes comme TEC3 et TEC4, les résultats sont reproductibles pour les cibles PRV1, ADN 16S de la clostridie P2040 et toxines CP1, CP2 et CP6. En revanche, la détection des séquences correspondant aux toxines CP3, CP4 et CP5 n'est pas reproductible. La présence de faux négatifs est envisageable si la charge de l'échantillon est proche du seuil de détection de la PCR, et ceci d'autant plus que les échantillons sont complexes (échantillons intestinaux).

3. Discussion

Le fait qu'aucune corrélation directe n'apparaisse entre la présence d'une des cibles recherchées et la maladie peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- (1) Il est envisageable qu'aucune des séquences cibles détectées ne corresponde à un agent impliqué dans l'EEL.

(2) Le Normand *et al.* (2003) ont mis en évidence que deux profils cliniques différents sont présents chez les lapins atteints d'EEL et que ces profils différents correspondent à la présence de toxines différentes. Ceci expliquerait qu'aucune toxine ne soit présente dans la totalité des échantillons positifs.

(3) Ce profil complexe de résultats laisse penser que l'EEL pourrait être due à une combinaison de plusieurs agents pathogènes, l'un présent naturellement chez les lapins sains (dit agent 1) et l'autre (dit agent 2) qui serait le facteur déclenchant. L'interprétation des résultats d'analyses selon cette hypothèse est alors plus complexe. En effet, les échantillons issus de lapins non atteints peuvent être positifs pour l'agent 1 (lapins « infectables ») ou négatifs ; en outre, ils peuvent même être positifs pour l'agent 2 à conditions d'être négatifs pour l'agent 1. Les lapins atteints doivent être positifs pour les deux agents. En revanche, les inoculums doivent être positifs pour l'agent 2 mais ils peuvent aussi être positifs pour l'agent 1. Le nombre d'échantillons des différents types est trop faible pour faire une analyse statistique de ces résultats en suivant les différentes hypothèses émises ci-dessus.

Les résultats de cette étude, qui représente un travail systématique important, permettent cependant d'exclure, parmi tous les agents qui pourraient être impliqués dans cette pathologie, de nombreux phages et virus, les parasites eucaryotes et probablement de nombreuses espèces bactériennes dont *C. difficile* et *Shigella*.

Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de différents agents potentiellement pathogènes dans des échantillons issus de lapins atteints d'EEL. Le nombre d'échantillons (positifs et négatifs) disponibles ne permet pas de conclure sur l'implication de ces agents dans la pathologie. Des études complémentaires seront menées afin de vérifier l'implication des agents détectés dans la pathologie de l'EEL. Les protocoles de détection par PCR et RT-PCR seront optimisés et calibrés afin de pouvoir déterminer la quantité de chaque agent détecté présente dans un échantillon. Différentes méthodes de fractionnement des inoculums (centrifugation, filtration, chauffage) seront évaluées, à la fois du point de vue du maintien de l'infectiosité et du point de vue de la présence des agents détectés au cours de cette étude. La présence des agents sera suivie en cinétique au cours de l'infection en abattant des lapins témoins sains et des animaux inoculés de manière séquentielle.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'OFIVAL

et à la gestion des fonds par un comité de pilotage ITAVI-INRA-AFSSA. Les auteurs remercient également toutes les personnes qui ont fourni des échantillons.

Références

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T., SCHÄFFER, A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. LIPMAN, D., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- BREFORT G., MAGOT M., IONESCO H., SEBALD M., 1977, Characterization and transferability of *Clostridium perfringens* plasmids, *Plasmids*, 1 : 52-66
- CERE N., NIEPCERON A., VASSEUR M., LORROT M., VAUTHEROT J.F., LICOIS D. 2000. Detection of rabbit rotavirus by Polymerase chain reaction in feces and comparison of gene 9 sequence between two isolated strains. *World Rabbit Science*. Vol 8. Supplement N°1: 207-213.
- DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., VINDEVOGEL H., MARLIER D. 2003b. Caractérisation de 60 souches de *Cl. perfringens* isolées de lapins morts d'EEL. *10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr*, Paris 19 – 20/11/03., ITAVI Ed., Paris
- LE GALL G., MORISSE J.P., PICAULT J.P., ALLEE C., LE BIHANNIC P., COLLIN P. 1998. Essais de reproduction expérimentale de l'Entérite Epizootique du Lapin (E.E.L.). *7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr* Lyon 13 - 14 /05/98, 13-19, ITAVI Ed., Paris
- LICOIS D., COUDERT P. 2001. Entéropathie Epizootique du Lapin : reproduction expérimentale, symptômes et lésions observés. *9èmes Journ Rech Cunicoles Fr*. Paris 28-29/11/01, 139-142, ITAVI Ed, Paris.
- LICOIS D., COUDERT P., CERÉ N., VAUTHEROT J.F.. 2000. Epizootic Enterocolitis of the rabbit : a review of current research. *World Rabbit Science*. Vol 8. Supplement N°1: 187-194.
- LICOIS D., FRANCHET C. PERSILLON C. 2003. Obtention d'échantillons d'air, prélevés dans des locaux expérimentaux à l'aide de bio-collecteurs, chez des lapins sains et des lapins après reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL). Test d'infectiosité des échantillons collectés. *10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr*, Paris 19 – 20/11/03., ITAVI Ed., Paris.
- LICOIS D., WYERS M., COUDERT P., 2005. Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36, 601-613.
- MARLIER D., DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H. 2003. L'Entéropathie Epizootique du Lapin: un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. *10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr*, Paris 19 – 20/11/03, ITAVI Ed, Paris
- LE NORMAND B., LE GUENEC J., MOALIC J.Y. 2003. Contribution à l'étude toxinotypique des souches de *Clostridium perfringens* isolées dans l'entéropathie du lapin. Relations avec la clinique observée. *10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr*, Paris 19 – 20/11/03., ITAVI Ed., Paris
- PERNA NT, PLUNKETT G 3RD, BURLAND V, MAU B, GLASNER JD, ROSE DJ, MAYHEW GF, EVANS PS, *et al.*, 2001, Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. 25;409(6819):529-33.
- ROSE TM, SCHULTZ ER, HENIKOFF JG, PIETROKOVSKI S, MCCALLUM CM, HENIKOFF S. 1998 Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* Apr 1;26(7):1628-35