

# Age au sevrage et sensibilité à une infection expérimentale par une souche d'E. coli O103

M. GALLOIS<sup>1</sup>, S. BOULLIER<sup>2</sup>, A. MILON<sup>2</sup>, T. GIDENNE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Station de Recherches Cunicoles, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup>INRA/ENVIT, UMR 1225, Ecole Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

**Résumé** – 10 portées de 9 lapereaux, sevrées à 21 (S21, n=5) ou 35 jours (S35, n=5), ont été inoculées à 28 jours avec 10<sup>4</sup> E. coli O103 (souche E22 entéropathogène), après vérification de la séronégativité des mères vis-à-vis de ce sérotype. La maladie (anorexie, perte de poids, diarrhée et mort) a évolué très rapidement dans le lot S21 : à 36 jours, 50% de lapereaux S21 étaient morts, alors que les 2 premiers morts S35 étaient seulement observés. La maladie s'est ensuite développée de façon similaire dans le lot S35 : 50% de lapereaux S35 morts à 45 jours, et un taux de mortalité semblable au lot S21 à 63 jours. Le lait semble conférer une protection transitoire à la colibacillose à O103, qui pourrait être en partie liée à une moindre croissance temporaire des E. coli O103 dans le tractus digestif (excrétion colibacillaire fécale inférieure de 31 à 36 jours dans les portées S35 vs. S21).

**Abstract** – Weaning age and sensitivity to an experimental infection by an *E. coli* O103 strain. 10 litters of 9 young rabbits, weaned at 21 (W21, n=5) or 35 days (W35, n=5), were inoculated at 28 days with 10<sup>4</sup> *E. coli* O103 (E22 enteropathogenic strain). Does were seronegative towards this serotype. The disease (anorexia, weight loss, diarrhoea and death) quickly developed in W21 litters: at 36 days, 50% of W21 rabbits were dead, whereas the first deaths were only observed in the W35 group. The evolution of the disease was then similar in W35 litters: 50% of W35 dead rabbits at 45 days, and a similar mortality rate to W21 group at 63 days. Milk seems to confer a transitory protection against O103 colibacillosis, which could be partly related to a temporary lower growth of *E. coli* O103 in the digestive tract (faecal excretion of *E. coli* lower in W35 than in W21 litters from 31 to 36 days).

## Introduction

La colibacillose est une maladie fréquemment rencontrée en élevage cunicole. Différents sérotypes sont incriminés, avec la prédominance de certaines souches d'*Escherichia coli* O103 (Camguilhem et Milon, 1989). Si leur pouvoir pathogène spécifique est reconnu, des facteurs favorisants ont probablement un rôle non négligeable dans le déclenchement de la colibacillose. Ainsi, Licois *et al.* (1990) avaient mis en évidence un effet de l'âge des animaux sur leur sensibilité à la forme létale de la colibacillose (souche O103:K:H2), avec une période de réceptivité maximale située entre 4 et 5 semaines d'âge. Par ailleurs, les différentes souches d'*E. coli* semblent exercer un pouvoir pathogène différentiel selon le groupe d'âge : lapereaux allaités vs. sevrés (Peeters *et al.*, 1984). A notre connaissance, l'hypothèse que le déclenchement de la colibacillose en engraissement pouvait dépendre davantage du sevrage, que de l'âge des animaux n'a jamais été envisagée. Or, le sevrage est un moment où de nombreux bouleversements nutritionnels et physiologiques ont lieu. Nous avons donc étudié l'effet de l'âge au sevrage sur la sensibilité des lapereaux à une infection expérimentale à 28 jours par la souche E22 d'*E. coli* (O103:H2:K-).

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Schéma expérimental

Le protocole a été initialement conçu en considérant 2 facteurs : âge au sevrage (21 vs. 35 jours) et âge au

moment de l'infection (28 vs. 42 jours). Six lots d'animaux ont ainsi été constitués (Tableau 1). Les lots S21-I42 et S35-I42 ont servi de témoins aux lots I28 jusqu'à 42 jours. Les témoins étaient également inoculés avec une souche non pathogène (BM21).

**Tableau 1.** Lots, inoculations et nombre de portées par lot

Nom du lot	Séquence inoculation		Nombre de portées initial
	J28	J42	
S21-T	BM21	BM21	3
S35-T	BM21	BM21	3
S21-I28	E22	-	5
S35-I28	E22	-	5
S21-I42	BM21	E22	4
S35-I42	BM21	E22	4

S21 : sevrage à 21 jours, S35 : sevrage à 35 jours, E22 : souche O103 pathogène, BM21 : souche non pathogène, T : témoin, I28 : inoculation avec la souche E22 à 28 jours, I42 : inoculation avec la souche E22 à 42 jours

### 1.2. Animaux et logement

Cette étude a été réalisée sur 24 portées de 9 lapereaux de croisement PS Hyplus 19\*PS Hyplus 39 (Groupe Grimaud) dans une salle unique. Les lapines étaient séronégatives (anticorps sériques anti-LPS O103 non détectés) au début de l'expérimentation. A partir de 14 jours, les lapereaux de tous les lots ont reçu un aliment spécifique (protéines brutes=17,3% et ADF=18,7%) supplémenté en robénidine (66 mg.kg<sup>-1</sup>). Les lapines et leurs portées ont alors été séparées et

un allaitement contrôlé a été réalisé chaque matin jusqu'au sevrage. A 35 jours, les portées ont été séparées en 2 dans les lots témoins, ainsi que dans les lots I28 si plus de 5 lapereaux de la cage d'origine survivaient.

### 1.3. Inoculations expérimentales

Deux souches d'*E. coli* ont été utilisées dans cette expérimentation (Tableau 1) : E22, une souche entéropathogène O103:H2:K- rhamnose négative, et BM21 non pathogène afin de placer les témoins dans des conditions expérimentales analogues (Boullier *et al.*, 2003). Les inoculations ont consisté en l'administration *per os* de 1 à 2 mL d'une solution contenant  $10^4$  bactéries.

### 1.4. Mesures et prélèvements

Dès 28 jours, un examen clinique a été effectué quotidiennement et la mortalité contrôlée 2 fois par jour. Sur tout animal mort, une autopsie et un prélèvement de contenu cœcal pour analyses bactériologiques ont été réalisés afin d'identifier les animaux morts de colibacillose, ainsi qu'à 63 jours sur les lapereaux survivants euthanasiés. L'ingestion collective et les poids individuels ont été mesurés 2 fois par semaine dans l'ensemble des lots. Des prélèvements de fèces ont été effectués 2 fois par semaine dans les lots inoculés avec la souche E22, et 1 fois par semaine dans les lots témoins afin de suivre l'excrétion colibacillaire.

### 1.5. Analyses bactériologiques

Une gélose EMB-D (Eosine-Bleu de Méthylène) a été ensemencée avec différentes dilutions de fèces ou contenus cœcaux et incubée 24 heures à 37°C. Un comptage des colonies de colibacilles a alors été réalisé. Dix de ces colonies ont ensuite été repiquées sur une gélose contenant du rhamnose (Phenol red agar base dehydrated). Le nombre de colonies ne métabolisant pas le rhamnose, donc correspondant très probablement à la souche E22, a été déterminé. En cas de doute sur l'identité des colonies, un test de séroagglutination avec des anticorps anti-LPS O103 a été effectué (Camguilhem *et al.*, 1986).

### 1.6. Analyse des données

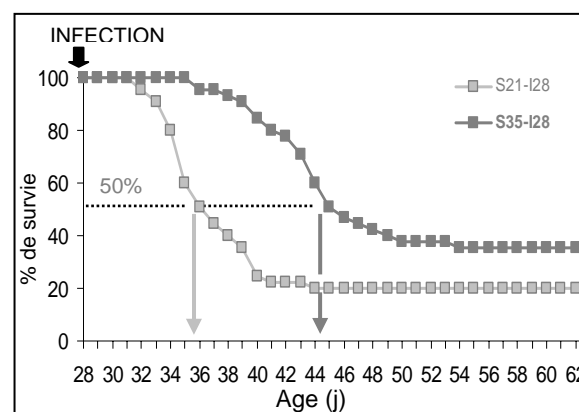
Lors du contrôle bactériologique de 36 jours, le colibacille pathogène a été isolé sur une cage I42. L'hypothèse initiale d'une erreur a été infirmée lors du contrôle bactériologique suivant : 11 autres cages T et I42 étaient contaminées à 42 jours. Malgré l'euthanasie des lapereaux des cages contaminées, le phénomène s'est poursuivi. Aussi, seules les données des lots I28, et des témoins jusqu'à 42 jours (lots T et I42 regroupés) non contaminés, seront exploitées dans cette étude. Une analyse de variance (proc GLM, SAS) a été réalisée sur l'ensemble des données. Dans le cas de données concernant uniquement les lots I28, l'effet de l'âge au sevrage a été testé. Pour les données incluant les lots témoins, l'effet souche inoculée a été ajouté au modèle ainsi que l'interaction âge au sevrage\*souche inoculée. Les données présentées

dans les tableaux et figures sont les moyennes arithmétiques.

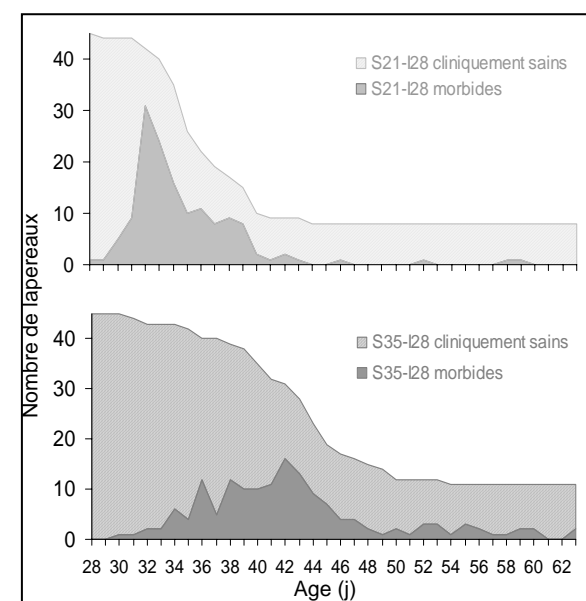
## 1. Résultats et discussion

### 2.1. Morbidité et mortalité des lapereaux I28

**Figure 1.** Courbe de survie à la colibacillose à *E. coli* O103 des lapereaux infectés à 28 jours selon que le sevrage est réalisé à 21 (S21-I28) ou 35 (S35-I28) jours



**Figure 2.** Evolution de la morbidité des lapereaux infectés à 28 jours par *E. coli* O103 selon que le sevrage est réalisé à 21 (S21-I28) ou 35 (S35-I28) jours



L'évolution de la courbe de survie est décalée selon l'âge au sevrage (Figure 1). A 36 jours, alors que la mortalité des lapereaux S21 atteignait 50%, les 2 premiers morts S35 étaient seulement observés. Le taux de mortalité de 50% a été atteint à 45 jours dans le lot S35, soit en décalage de 9 jours par rapport au lot S21. A partir de 44 jours, la mortalité n'a plus évolué dans le lot S21, tandis que des mortalités par colibacillose ont été observées jusqu'à 54 jours dans le lot S35. A 63 jours, 20% des lapereaux S21-I28 et 35,6% des lapereaux S35-I28 survivaient. L'évolution de la mortalité a été plus brutale pour les animaux

**Tableau 2.** Croissance relative journalière en fonction de la souche d'*E. coli* inoculée à 28 jours (I28 : souche E22 pathogène et T : souche BM21 non pathogène) et de l'âge au sevrage (S21 : 21 jours et S35 : 35 jours)

	Croissance relative journalière, en %				CVr, %	Valeurs de P		
	S21-I28	S35-I28	S21-T	S35-T		Souche	Age au sevrage	Interaction
J21-J28	9,1 (44)	7,9 (45)	8,4 (63)	9,6 (62)	18,0	NS	NS	†
J28-J31	2,0 <sup>a</sup> (43)	8,3 <sup>b</sup> (44)	7,4 <sup>b</sup> (62)	8,0 <sup>b</sup> (58)	33,8	***	***	***
J31-J35	1,3 <sup>a</sup> (26)	5,5 <sup>b</sup> (42)	6,2 <sup>b</sup> (58)	6,8 <sup>b</sup> (59)	39,3	**	**	*
J35-J38	-0,2 <sup>a</sup> (17)	4,0 <sup>ab</sup> (39)	7,1 <sup>bc</sup> (33)	8,2 <sup>c</sup> (32)	55,0	***	**	†
J38-J42	2,9 <sup>ab</sup> (9)	0,6 <sup>a</sup> (31)	5,0 <sup>b</sup> (23)	4,7 <sup>b</sup> (27)	84,5	***	NS	NS

Croissance relative : Gain de poids moyen sur la période\*100/ Poids en début de période; Sur une ligne, les moyennes sans lettre en commun sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ); Valeurs de P : NS  $P > 0,10$ , †  $P < 0,10$ , \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ; (n) : effectif.

**Tableau 3.** Ingestion d'aliment en fonction de la souche d'*E. coli* inoculée à 28 jours (I28 : souche E22 pathogène et T : souche BM21 non pathogène) et de l'âge au sevrage (S21 : 21 jours et S35 : 35 jours)

	Ingestion en g.j <sup>-1</sup>				CVr, %	Valeurs de P		
	S21-I28	S35-I28	S21-T	S35-T		Souche	Age au sevrage	Interaction
J14-J21	1,0 (5)	0,4 (5)	0,6 (7)	0,6 (7)	61,0	NS	†	†
J21-J28	27,4 <sup>a</sup> (5)	8,7 <sup>b</sup> (5)	25,3 <sup>a</sup> (7)	14,1 <sup>b</sup> (6)	26,3	NS	***	†
J28-J31	41,6 <sup>a</sup> (5)	31,0 <sup>a</sup> (5)	59,7 <sup>b</sup> (7)	38,9 <sup>a</sup> (6)	20,2	**	***	NS
J31-J35	24,4 <sup>a</sup> (5)	40,2 <sup>b</sup> (5)	70,5 <sup>c</sup> (7)	53,8 <sup>b</sup> (6)	15,5	***	NS	***
J35-J38	38,1 <sup>a</sup> (7)	55,9 <sup>a</sup> (10)	92,5 <sup>b</sup> (9)	91,8 <sup>b</sup> (8)	22,7	***	NS	NS
J38-J42	52,9 <sup>a</sup> (4)	48,4 <sup>a</sup> (10)	102,6 <sup>b</sup> (6)	102,7 <sup>b</sup> (7)	21,5	***	NS	NS

Sur une ligne, les moyennes sans lettre en commun sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ); Valeurs de P : NS  $P > 0,10$ , †  $P < 0,10$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ; (n) : effectif.

S21 : elle s'est étendue sur 12 vs. 18 jours pour les lapereaux S35. Ainsi, le pourcentage de survie à la colibacillose a été affecté par l'âge au sevrage entre 33 et 49 jours d'âge, ( $P < 0,05$ ). L'évolution de la morbidité (symptômes de diarrhée) a été similaire (Figure 2). Le pic de morbidité pour les lapereaux S21 s'est situé à 32 jours (près de 74% d'animaux morbides) vs. 42 jours pour les lapereaux S35 (environ 52%). L'évolution a également été plus fulgurante pour les lapereaux S21.

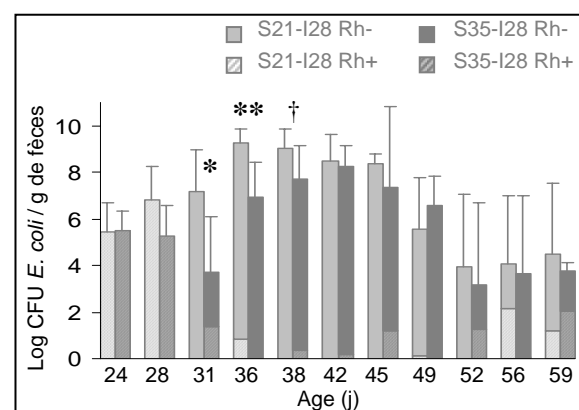
## 2.2. Croissance et ingestion des lapereaux

D'après le tableau 2, la croissance relative des lapereaux I28 dépend de l'âge au sevrage. Ainsi, la croissance des lapereaux S21-I28 a été ralentie de 28 à 35 jours (4 à 5 fois plus lente que dans le lot S21-T), nulle de 35 à 38 jours puis a augmenté à partir de 38 jours. Quant aux lapereaux S35-I28, le ralentissement de croissance a débuté à 35 jours, et leur croissance était nulle de 38 à 42 jours. Entre 31 et 35 jours, les lapereaux S21-I28 ont ingéré 3 fois moins d'aliment que les lapereaux S21-T ( $P < 0,001$ ), alors que l'ingestion des S35-I28 était semblable à celle des S35-T (Tableau 3). A partir de 35 jours, l'ingestion des S35-I28 est devenue inférieure à celle du lot S35-

T (-39% et -53%, respectivement de J35 à J38 et de J38 à J42,  $P < 0,001$ ).

## 2.3. Excrétion colibacillaire des lapereaux I28

**Figure 3.** Excrétion colibacillaire des lapereaux infectés à 28 jours par *E. coli* O103 selon que le sevrage est réalisé à 21 (S21-I28) ou 35 (S35-I28) jours



CFU : colonie formant unité; Rh : rhamnose

D'après la figure 3, les lapereaux S21 et S35 présentaient une excrétion colibacillaire similaire à 24

et 28 jours. A 31 et 36 jours, l'excrétion totale a été plus importante pour les S21-I28 que pour les S35-I28 ( $P < 0,05$ ) et tendait également à être supérieure à 38 jours ( $P = 0,053$ ). De plus, excepté à 36 jours, cette excrétion a exclusivement été constituée de colibacilles rhamnose - dans le lot S21-I28. A partir de 42 jours, les excréments des 2 lots étaient à nouveau similaires. A 63 jours, environ 50% des lapereaux n'hébergeaient plus le colibacille pathogène dans leur cæcum (6/11 et 4/8 respectivement dans les lots S35 et S21).

### 3. Discussion

Lors d'une inoculation à 28 jours, le décalage de l'évolution de la maladie entre les deux groupes d'animaux est net et suggère que la sensibilité à la colibacillose à O103 est davantage dépendante du sevrage que de l'âge des animaux, sans pour autant infirmer l'existence d'une fenêtre d'âge où les lapereaux seraient plus sensibles à certaines souches de colibacilles. Ainsi, les lapereaux allaités sembleraient protégés de la forme létale de la maladie. En effet, d'après la littérature, l'évolution de la maladie est rapide dans le cas d'une inoculation expérimentale à O103 réalisée entre 32 et 42 jours sur des lapereaux sevrés à un âge classique (entre 28 et 35 jours). Quelle que soit la dose inoculée, la mortalité s'échelonne sur une période de 3 à 14 jours post-infection (Boullier *et al.*, 2003; Camguilhem et Milon, 1989; Licois *et al.*, 1982), ce qui correspond à l'évolution observée sur les lapereaux sevrés à 21 jours, et sur les lapereaux sevrés à 35 jours mais après leur sevrage. Aussi, nous retiendrons l'hypothèse que le lait maternel confère une protection temporaire à la colibacillose à *E. coli* O103 s'estompant rapidement après le sevrage. Par ailleurs, les lapereaux allaités excrètent moins de colibacilles pathogènes que les lapereaux sevrés à même âge. Ce moindre développement de la maladie en cours d'allaitement pourrait ainsi être lié à une inhibition temporaire de la croissance des bactéries. Une inhibition de l'adhésion des colibacilles aux entérocytes n'est cependant pas à exclure, et les deux phénomènes pourraient se combiner. Le lait pourrait exercer un effet antibactérien direct vis-à-vis de l'agent pathogène (lyse, inhibition de croissance...), et/ou un effet plus indirect par ses conséquences sur les conditions du milieu de vie de l'agent pathogène (flore commensale, pH, substrats...). D'après la littérature, de nombreuses substances du lait pourraient présenter de tels effets : des anticorps, des peptides issus de la digestion des caséines, des acides gras et monoglycérides... (Kolb,

2001). Cependant, si de nombreuses études montrent leur activité antimicrobienne sur différents genres bactériens *in vitro*, les résultats *in vivo* sont beaucoup plus aléatoires.

### Conclusion

L'hypothèse de la protection temporaire conférée par le lait maternel à une colibacillose expérimentale à *E. coli* O103 offre des pistes de travail intéressantes, comme l'identification des substances du lait de lapine potentiellement inhibitrices de l'expression du pouvoir pathogène de certaines souches de colibacilles. Sur un plan plus appliqué, ces résultats suggèrent qu'un sevrage précoce des lapereaux dans un contexte d'élevage où une souche d'*E. coli* O103 pathogène a été identifiée, constitue probablement un facteur favorisant le développement de la colibacillose.

### Remerciements

Les auteurs remercient les équipes de la Station de Recherches Cunicoles et de l'UMR Interactions Hôte-Agents Pathogènes pour leur aide technique, ainsi que Cybéla (Groupe Glon) pour leur participation financière.

### Références

- BOULLIER S., NOUGAYREDE J.P., MARCHES O., TASCA C., BOURY M., OSWALD E., DE RYCKE J., MILON A., 2003. Genetically engineered enteropathogenic *Escherichia coli* strain elicits a specific immune response and protects against a virulent challenge. *Microbes Infect.*, 5, 857-867.
- 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.
- CAMGUILHEM R., MUREAU G., NICOLAS J.A., BROCAS J., TOURNUT J., 1986. Groupage sérologique O et antibiosensibilité des souches d'*Escherichia coli* isolées en France sur les lapins diarrhéiques après le sevrage. *Revue Méd. Vét.*, 137, 205-212.
- KOLB A.F., 2001. The prospects of modifying the antimicrobial properties of milk. *Biotechnol. Adv.*, 19, 299-316.
- LICOIS D., COUDERT P., GUILLOT J.F., RENAUT L., 1982. Diarrhée expérimentale du lapin : étude de la pathologie due à des coccidies intestinales (*E. intestinalis*) et à des *Escherichia coli*. 3èmes Journ. Rech. Cunicole Fr., Paris, 8-9/12/82, Comm. N°27, 16pp. ITAVI Ed., Paris.
- LICOIS D., GUILLOT J.F., MOULINE C., 1990. Sensibilité du lapin à une souche pathogène d'*Escherichia coli* O103 : effet de l'âge des animaux. 5èmes Journ. Rech. Cunicole Fr., PARIS, 12-13/12/90, COMM. N°24, 8pp. ITAVI Ed., Paris.
- PEETERS J.E., POHL P., OKERMAN L., DEVRIESE L.A., 1984. Pathogenic Properties of *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheic Commercial Rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 34-39.