

# Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4 : effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps

D. LICOIS, P. COUDERT

INRA, UR86, BioAgresseur, Santé, Environnement, 37380 Nouzilly, France  
(dlicois@tours.inra.fr)

**Résumé** - Un inoculum (TEC4) a été nouvellement constitué à partir de prélèvements intestinaux obtenus chez des lapins EOPS, expérimentalement infectés avec TEC3. Sa capacité à reproduire l'EEL a été testée à différentes doses et après conservation, en milieu sec et à température ambiante. Quelle que soit la dose inoculée et ce jusqu'à la dose 1/1000<sup>ème</sup>, la réponse des animaux (EOPS ou conventionnels) est similaire : reproduction d'une pathologie qui se développe dès la première semaine, associée à des signes cliniques d'EEL et à une mortalité variant de 10 à plus de 40%. A la dose de 1/10000<sup>ème</sup>, un décalage d'une semaine environ est observé avant l'apparition de la maladie. Par contre, la virulence de TEC4 n'est pas affectée, après près d'un an de conservation à température ambiante, en milieu sec.

**Abstract – Infectiousness of inoculum TEC4: dose effect and persistence of virulence according to time.** A new inoculum (TEC4) was recently made up, starting from intestinal contents obtained from SPF rabbits experimentally infected with TEC3. Its capacity to reproduce the ERE syndrome was tested with various doses and after conservation, in dry environment at room temperature. Whatever the inoculated dose and this until that of 1/1000<sup>th</sup>, the response of animals (SPF or conventional) was similar: reproduction of a pathology which develops over the first week, associated with clinical signs of ERE and mortality varying from 10 to more than 40%. At the dose of 1/10000<sup>th</sup>, the disease appeared about one week later. On the opposite, the virulence of TEC4 was not affected, after nearly one year of conservation at room temperature, on dry medium.

## Introduction

L'EEL (Entérococolite Epizootique du Lapin), maladie émergente qui affecte les élevages de lapins depuis 1996, a été caractérisée grâce à l'obtention d'inoculums (TEC) susceptibles de reproduire le syndrome (Licois *et al.*, 2005). Après épuisement de l'inoculum stock correspondant à TEC3, un nouveau stock que l'on appellera TEC4 a été reconstitué. Il convenait de valider ce nouvel inoculum en testant son pouvoir infectant à différentes doses. Cela a été fait comparativement chez des lapins EOPS et conventionnels.

Par ailleurs, des données épidémiologiques remontant au début de l'EEL en France, laissaient suspecter un degré de survie du pathogène dans le temps, par exemple la capacité à reproduire la maladie avec de l'aliment contaminé, conservé pendant 2 à 4 mois (Notes d'informations sur les travaux de recherches conduits sur l'EEL, n° 3 et n° 7, <http://www.tours.inra.fr/urbase/internet/resultats/enterocolite/entero1.htm>). Bien que ce point soit susceptible d'apporter à la fois des éléments de connaissances sur le pathogène en cause ou de revêtir des aspects plus pratiques au niveau des élevages, il n'a à notre connaissance jamais été vérifié scientifiquement. Nous avons donc voulu, avec TEC4, évaluer dans quelle mesure le pouvoir infectant de cet inoculum était maintenu au cours du temps. L'idée était de se situer au plus proche du terrain avec comme concept d'évaluer le facteur de risque représenté par la contamination de l'environnement (en déterminant en particulier combien de temps l'infectiosité de l'inoculum TEC4 perdure dans l'environnement). Cette contamination pouvait tout

aussi bien être le local, les cages..., mais le modèle que nous avons choisi, parce que le plus facilement maîtrisable, a été de l'aliment contaminé expérimentalement.

## 1. Matériel et Méthodes

### 1.1. Animaux

Les animaux EOPS utilisés proviennent de l'UE Pathologie Aviaire et Parasitologie de l'INRA de Tours. Ils sont indemnes des agents potentiellement pathogènes que l'on peut classiquement rencontrer chez le lapin (Licois *et al.*, 2005). Les animaux conventionnels propres proviennent d'un éleveur de lapins de chair chez lequel aucun épisode d'EEL n'a été identifié depuis que la maladie existe en France. Tous les lapins ont été sevrés à 32 jours et inoculés en moyenne une semaine plus tard. L'eau de boisson et l'aliment ont été distribués *ad libitum* sans aucune supplémentation, ni en antibiotique ni en anticoccidien.

### 1.2. Inoculum

L'inoculum TEC 4 a été constitué à partir de prélèvements de contenus intestinaux de 58 lapins EOPS inoculés avec l'inoculum TEC3, au cours de 10 protocoles réalisés entre 2001 et 2003. Ces 58 animaux, morts ou sacrifiés entre J2 et J10 après inoculation, présentaient des signes cliniques caractéristiques de l'EEL. L'inoculum TEC4 a été préparé dans les mêmes conditions que celles décrites par Licois *et al.* (2005) et conservé congelé à -20°C jusqu'à utilisation. Il a été vérifié indemne de coccidies et d'*Escherichia coli coli* mais dérivant directement de TEC3, il contient probablement des rotavirus et *Clostridium perfringens*.

### 1.3. Etude de l'infectiosité de TEC4

La virulence de l'inoculum TEC4 a été testée au cours de plusieurs essais, en faisant varier le statut sanitaire des animaux (lapins EOPS lapins vs lapins conventionnels propres) et la dose inoculée. Le jour de l'inoculation, l'inoculum est préparé extemporanément : décongélation à température ambiante, dilution avec de l'eau stérile et administration de la dose souhaitée sous un volume de 500 µl (inoculation *per os*).

#### 1.3.1. Comparaison lapins EOPS-lapins conventionnels et effet dose (1 à 1/100<sup>ème</sup>)

Trois doses d'inoculum TEC4 (1/1, 1/10<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup>), administrées par voie orale ont été testées. Les effectifs d'animaux correspondants, figurent dans le tableau 1. Les lapins ont été pesés une à deux fois par semaine et l'expérimentation a duré 29 jours post infection (PI). Mortalités et diarrhées ont été enregistrées quotidiennement.

**Tableau 1** - Schéma expérimental de l'essai comparatif effet dose chez des lapins EOPS et conventionnels propres, indiquant le nombre de lapins utilisés.

Dose (0.5 ml)	Conventionnels	EOPS
1/1	10	15
1/10	15	20
1/100	15	20
0 (Non inoculés)	5	5

#### 1.3.2. Test des doses 1/1000<sup>ème</sup> et 1/10 000<sup>ème</sup>

Lors de cet essai nous avons comparé les doses 1/1000 et 1/10000. Trois lots ont été constitués : un lot de 12 lapins témoins placés dans une salle à raison de 2 lapins par cage et deux lots de 15 animaux placés chacun dans un isolateur et inoculés *per os* avec 0.5 ml de TEC4 dilué au 1/1000<sup>ème</sup> et 1/10000<sup>ème</sup>. Cet essai a duré 17 jours.

#### 1.3.3. Test de confirmation de l'infectiosité de la dose 1/10000<sup>ème</sup>

Une seconde expérimentation a ensuite été réalisée où seule la dose 1/10000<sup>ème</sup> a été testée, mais sur un effectif de 58 lapins inoculés par voie orale. Cet essai a duré 14 jours.

Pour les deux derniers essais, les lapins ont été pesés 2 fois pas semaine alors que mortalité et diarrhée étaient enregistrées tous les jours.

### 1.4. Etude du maintien de l'infectiosité de l'inoculum conservé sur milieu sec, en fonction du temps.

Quatre essais ont été réalisés, correspondant à des temps de conservation de 21, 42, 63 jours et également 11 mois après la préparation de l'aliment contaminé. La contamination de l'aliment a été effectuée selon la procédure décrite par Licois *et al.* (2005), à raison de 500 µl du produit TEC4 dilué dans 10 ml vaporisé sur 100g d'aliment. L'aliment ainsi préparé a été conservé au sec et à température

ambiante (18-20°C). Lors des inoculations chaque animal a reçu 100g d'aliment contaminé, soit la ration ingérée en 24h. Pour chaque essai une comparaison a eu lieu avec une inoculation classique par voie orale de 500 µl (milieu liquide) de TEC4. Un lot de lapins non inoculés était utilisé comme témoin.

### 1.5. Analyses statistiques

Les gains de poids ont été analysés par analyse de variance (Systat) et test de Tukey.

## 2. Résultats

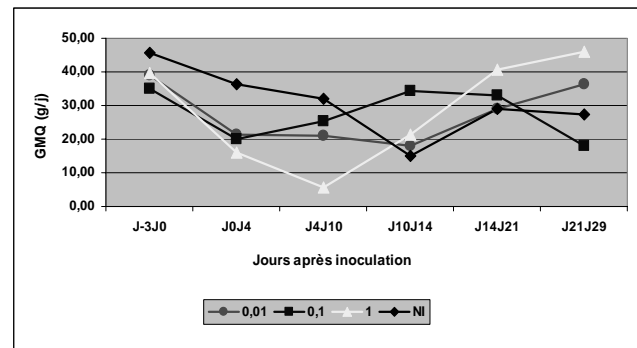
### 2.1 Infectiosité de TEC4

#### 2.1.1. Comparaison EOPS - conventionnels.

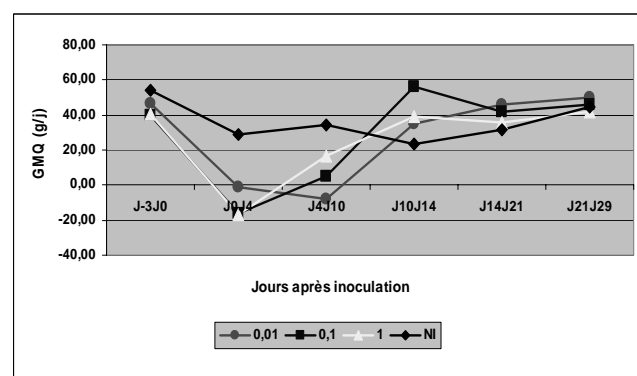
On constate une chute significative du GMQ entre J0 et J4 PI (P<0.05), dans les 2 groupes d'animaux, EOPS (Fig 1) et Conventionnels (Fig 2) par rapports aux lots témoins. En revanche on ne note aucun effet dose, y compris chez les lapins EOPS où des écarts plus importants sont observés, en raison d'une grande variabilité individuelle.

Chez les lapins EOPS, la mortalité a été de 35%, 35% et 46.6% respectivement pour les doses 1/100, 1/10 et 1/1. Chez les conventionnels la mortalité a été de 33%, 20% et 10% respectivement pour les doses 1/100, 1/10 et 1/1. Des lésions macroscopiques évidentes d'EEL ont été observées chez les lapins autopsiés.

**Figure 1** - Evolution du GMQ des lapins EOPS inoculés avec différentes doses de TEC4.



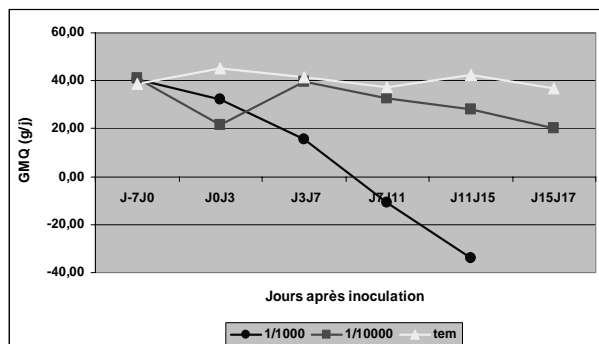
**Figure 2** - Evolution du GMQ des lapins Conventionnels inoculés avec différentes doses de TEC4.



### 2.1.2. Effet dose 1/1000<sup>ème</sup> et 1/10000<sup>ème</sup>, premier essai

Aucun des lapins témoins n'est mort et n'a présenté de signe clinique. La croissance moyenne de ce lot a été de 41,2 g/j sur la période étudiée (figure 3).

**Figure 3** – Evolution du GMQ chez des lapins témoins et inoculés avec les doses 1/1000<sup>ème</sup> et 1/10000<sup>ème</sup> de TEC4.



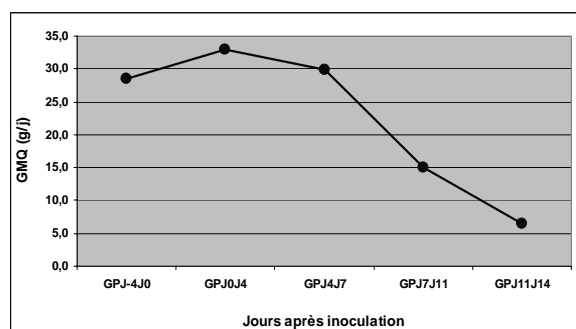
Tous les lapins inoculés avec la dose 1/1000<sup>ème</sup> ont été malades avec, dès J3 PI, une croissance très significativement réduite par rapport à celle des témoins ( $P < 0.001$ ). La mortalité dans ce lot a été de 33%. Tous les lapins morts présentaient au moins un signe typique de l'EEL.

Curieusement dans le lot inoculé avec la dose 1/10000<sup>ème</sup>, aucun animal n'est mort et n'a présenté de signe clinique. Seul le GMQ a été affecté, avec une baisse significative comparativement à celui des témoins, entre J0 et J3 ( $P < 0.001$ ) mais aussi en fin d'expérience, entre J15 et J17 ( $P < 0.05$ ).

### 2.1.3. Deuxième essai : effet de la dose 1/10000<sup>ème</sup>.

Dans cet essai, la croissance a été relativement faible au cours des 7 premiers jours (30,4 g/j) et 4 lapins sont morts sans signe clinique ni lésionnel évident d'EEL. A l'inverse on constate que le GMQ décroît significativement ( $P < 0.001$ ), à partir de J7 PI, en comparaison de ce qu'il était au cours de la première semaine (figure 4). 10 animaux sont morts au cours de cette seconde période et 6 d'entre eux ont été autopsiés ; tous avaient des lésions caractéristiques de l'EEL. La mortalité globale sur la durée de l'essai a été de 24%.

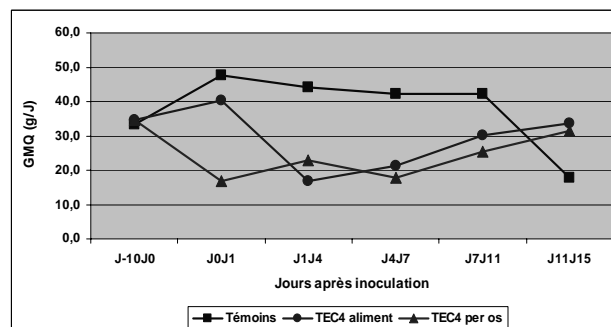
**Figure 4** – Evolution du GMQ chez des lapins inoculés avec la dose 1/10000<sup>ème</sup> de TEC4.



### 2.2. Persistance de la virulence de TEC4 en fonction du temps

Les 4 essais ont tous donné des résultats similaires : reproduction d'une maladie caractéristique de l'EEL. Seuls les résultats sur la croissance des animaux utilisés dans le *dernier essai* (aliment contaminé et conservé 11 mois à température ambiante) sont indiqués sur la figure 5. En dehors de la chute significative très précoce, observée à J1 PI chez les animaux inoculés *per os* par rapport à ceux contaminés *via* l'aliment, le GMQ a évolué de manière comparable pour les deux lots inoculés. En revanche le GMQ de ces 2 lots est significativement plus faible que celui des témoins, entre J1 et J7 PI ( $P < 0.001$ ). La mortalité chez les lapins inoculés *via* l'aliment a été de 19 % (5/26) contre 26% (6/23) pour le lot inoculé *per os*. Tous les lapins morts, présentaient à l'autopsie des signes lésionnels caractéristiques de l'EEL. Aucune mortalité ni diarrhée n'a été constatée dans le lot témoin.

**Figure 5** - Evolution du GMQ chez des lapins sains ou inoculés avec l'inoculum TEC4, administré *per os*, immédiatement après décongélation ou *via* l'aliment, conservé 11 mois après sa préparation.



## 3. Discussion

La première constatation que l'on peut faire de l'ensemble des expérimentations est que l'inoculum TEC4 est en tout point comparable aux inoculums préalablement établis (TEC1, TEC2 et TEC3). Le syndrome EEL est reproduit avec une morbidité proche de 100% et une mortalité très variable (de 10 à plus de 40%) et parfois sans relation avec la dose utilisée, ce que nous avons déjà signalé par le passé (Licois, 2002). La plupart des animaux morts présentent un tableau clinique et lésionnel qui correspond à la symptomatologie décrite pour l'EEL (Kühn, 2005 ; Licois *et al.*, 2005). Ce nouveau stock a été, comme les précédents, mis à la disposition de nos partenaires publics ou privés. Il a été fourni aux généticiens INRA de Toulouse (Garreau *et al.*, 2005) et aux sociétés Proteus (Persillon *et al.*, 2005) et Evialis (Boisot *et al.*, 2005).

Les éléments nouveaux apportés ici concernent l'étude d'une dose faible et celle de la persistance de la virulence dans le temps. Les 2 expérimentations utilisant la dose 1/10000<sup>ème</sup> montrent que l'on a probablement atteint avec cette dose, la dilution limite

à partir de laquelle on ne retrouve plus exactement ce que l'on observait avec des doses plus élevées. En tout cas la cinétique de la maladie n'est plus la même. Alors qu'avec des doses supérieures ou égales à 1/1000<sup>ème</sup>, la croissance est affectée très rapidement (dès 3-4 jours après l'inoculation), on note un décalage d'environ une semaine avant l'apparition des symptômes avec la dose 1/10000<sup>ème</sup>. Cependant il est fondamental de constater que l'on peut encore reproduire la maladie avec une dose aussi faible et qui représente ici environ 0,05 mg de contenu intestinal inoculé par animal. Soulignons aussi qu'avec cette dose on observe toujours la chute précoce du GMQ caractéristique de l'inoculum (Coudert et Licois 2004).

Les résultats relatifs au maintien de l'infectiosité au cours du temps montrent clairement que l'inoculum TEC4, après près d'un an de conservation sur un milieu sec, reste toujours virulent. Même s'il est difficile d'évaluer une perte de viabilité éventuelle, en raison des doses relativement fortes, utilisées dans nos essais, il est intéressant de constater que l'agent de l'EEL est capable de résister longtemps dans l'environnement. S'il s'agit de bactéries, s'agit-il de formes végétatives ou plus probablement de formes sporulées susceptibles de résister plus longtemps ? En tout état de cause ces données sont un des éléments parmi d'autres à prendre en compte par les étiologistes

### Conclusion

Un nouveau stock d'inoculum a été constitué et validé. Au delà des aspects techniques, la persistance de la virulence sur une longue période et le fait que même des « traces » (50 µg) de contenu intestinal, puissent suffire à déclencher l'EEL, constituent des avancées dans la compréhension de l'épidémiologie de la maladie et dans l'approche étiologique.

### 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 Ph. Calahorra et D. Pinon pour leur participation technique à la réalisation des protocoles.

### Références

- BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., LICOIS D., COUDERT P. 2005. Interaction entre le passé sanitaire des lapines ou des lapereaux sous la mère vis-à-vis de l'Entéropathie Epizootique du Lapin et une contamination expérimentales des lapereaux en engraissement. *11èmes Journ. Rech. Cunicole*, Paris, 29-30/11/2005, ITAVI Ed.
- COUDERT P., LICOIS D. 2004. Study of early phenomena during experimental Epizootic Rabbit Enteropathy : preliminary results. *Proc. 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress*. Puebla, Mexico 7-10/09/2004, 220-225.
- GARREAU H., RUPP R., ROCHAMBEAU H. DE, LICOIS D. 2005. Variabilité génétique de la résistance à l'EEL : nouveaux résultats. *11èmes Journ. Rech. Cunicole*, Paris, 29-30/11/2005, ITAVI Ed.
- KÜHN, T. 2005. Übersichtsreferat zur Seuchenhaften Enteropathie der Kaninchen (ERE). *14th Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furbearing Animals and Pet Animals of Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin*. Verlag DVG Service GmbH. Celle 11.-12/05/2005, 109-121.
- LICOIS D. 2002. Bilan des travaux réalisés à l'INRA de Tours sur l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL). *Programme 1er semestre 2002* (Contrat INRA-ITAVI B2550 : rapport semestriel)
- LICOIS D., WYERS M., COUDERT P. 2005. Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36, 601-613.
- PERSILLON C., FRANCHET C., LICOIS D., RAVOT G. 2005. Détection de différents agents potentiellement pathogènes, chez des lapins atteints d'EEL. Recherche de corrélation entre la présence de ces agents et l'observation de la pathologie par comparaison avec des lapins non atteints. *11èmes Journ. Rech. Cunicole*, Paris, 29-30/11/2005, ITAVI Ed.