

L'Entéropathie Epizootique des lapins : passé, présent et futur.

D. MARLIER¹

¹ Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Quartier Vallée 2, Boulevard de Colonster, 180
B4000 Liège Belgique

Résumé – Depuis son apparition fin de l'année 1996, l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) a fait l'objet de nombreuses recherches ayant pour but la mise en évidence de son (ses) étiologie(s). Des travaux ont d'abord été menés par des méthodes analytiques classiques (tentatives d'isolement viraux, cultures bactériennes par des méthodes standards, ...) pour aboutir aujourd'hui à des recherches reposant sur l'utilisation de techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes permettant la mise en évidence d'espèces non cultivables. Malheureusement, la plupart des travaux ont conduit à des résultats négatifs, difficilement publiables ou seulement sous forme fragmentaire lors de congrès, et seuls les chercheurs impliqués directement dans le domaine en ont été avertis. Les buts de cette synthèse seront (1) de retracer les principaux résultats obtenus dans ce domaine, (2) de replacer ces résultats antérieurs dans le cadre des hypothèses étiologiques les plus récentes et (3) de présenter les résultats des travaux menés en les intégrant dans des perspectives futures de recherches tenant compte des limites actuelles de ces analyses par métagénomique.

Abstract – Epizootic Rabbit Enteropathy, past, present, and future. Since it was first identified in 1996, Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) has been the subject of much research aimed at the highlighting of its aetiology. Conventional microbiological methods (virus isolation, bacterial cultures by standard methods ...) were first used. Then culture-independent molecular techniques were used to identify non-cultivable bacteria species. Unfortunately, most studies have led to negative results that were difficult to publish in peer review journal or that were only presented in fragmentary form in congress proceedings. So, only researchers directly concerned by ERE were informed. The goals of this synthesis will be (1) to present the main results obtained in research regarding ERE aetiology, (2) to replace these earlier results as part of the latest etiological hypotheses and (3) to integrate these results in future research perspectives taking into account the current limits metagenomic methods.

Introduction

Eu égard aux nombreux biais d'échantillonnage rencontrés dans les études réalisées, la prévalence et l'incidence exactes des pathologies touchant les lapins d'élevage ne sont que mal connues à ce jour. Cependant, les pathologies digestives sont inévitablement des causes majeures de morbidité, de mortalité et de pertes économiques chez le lapin de chair en croissance. Ces pathologies digestives peuvent être d'origine non biologique (alimentation, ...) ou d'origine biologique (virus, bactéries, parasites). En élevages cynicoles rationnels, les étiologies infectieuses sont beaucoup plus fréquentes et constituent la grande majorité des diagnostics établis même si l'intervention des causes non-biologiques comme agent favorisant ne peut pas être sous-estimée.

Les agents infectieux pour lesquels un rôle primaire est reconnu sont d'origine bactérienne (*Escherichia coli*, *Clostridium spiroforme*, *Clostridium piliforme*), d'origine parasitaire (*Eimeria* spp). D'autres bactéries peuvent jouer un rôle ponctuel telles que *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Lawsonia intracellularis*, *Haemophilus paracuniculus* (Marlier et al., 2003). Enfin, deux autres pathologies digestives sont toujours d'étiologie inconnue, l'entérite (entéropathie) mucoïde et

l'Entéropathie Epizootique des Lapins (EEL), cette dernière étant le thème même de cette synthèse (Licois et al., 2007). Les buts de cette présentation seront (1) de retracer les principaux résultats des recherches ayant tenté de déterminer l'étiologie de l'EEL, tout en (2) remplaçant ces résultats antérieurs dans le cadre des hypothèses étiologiques actuelles et (3) en les intégrant dans des perspectives futures de recherches tenant compte des limites actuelles de ces analyses par métagénomique. En fin de paragraphe et/ou de chapitre des remarques personnelles de l'auteur portant sur une vision rétrospective de la situation globale, des décisions prises, des résultats des recherches, des points majeurs pour les recherches futures, ... seront proposées comme autant de jalons de réflexion aux lecteurs.

Apparition et extension de l'EEL, problème de définition du syndrome, situation épidémiologique actuelle

Vers la fin de 1996, un nouveau syndrome clinique est apparu dans les élevages cynicoles rationnels (Duval, 1998 ; Licois, 1998). Les signes cliniques observés étaient relativement constants. La maladie apparaissait brutalement dans l'élevage alors que les pathologies digestives habituelles étaient rares et/ou bien contrôlées. Lors du premier passage, des troubles digestifs majeurs associés à des taux de mortalité très

élevés (30 à 80%), sur des animaux en engraissement entre 6 et 14 semaines étaient constatés. Le tableau clinique global était dominé par un ballonnement abdominal considérable des animaux atteints avec une intensité très limitée, voire une absence totale, des diarrhées. Par la suite, ces signes cliniques et ces mortalités continuaient à réapparaître systématiquement sur les animaux en engraissement et des cas sporadiques étaient parfois observés chez des animaux plus âgés (cheptel reproducteur) (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Licois et al., 2000).

Devant l'ampleur du problème (observation par les vétérinaires de terrain, mortalités et pertes financières rapportées par les éleveurs, ...), dès le début de 1997, un programme d'épidémiosurveillance de cette affection a été organisé par la FENALAP et, de manière très proactive, une séance spéciale d'information a déjà été organisée dans le cadre des 7^{èmes} journées de la Recherche Cunicole qui se tinrent les 13 et 14 mai 1998 à Lyon.

La première remarque pouvant être faite est que, dès le départ, l'importance de cette pathologie émergente a été clairement prise en considération tant par la profession, les chercheurs que par les pouvoirs publics.

Historiquement, selon Duval (1998), l'EEL aurait fait son apparition dans les élevages des régions Poitou-Charentes, des Pays de la Loire et de la Bretagne en janvier 1997. En mars 1997, le "foyer ouest" s'est étendu et un foyer est apparu en Auvergne. En mai 1997, des cas ont été déclarés dans les départements de la Manche et de la Nièvre; en juillet 1997 dans les départements de la Loire, de la Drôme et de l'Ardèche; en août 1997 dans les départements du Tarn et Garonne et de l'Aveyron. Enfin, en octobre 1997, des élevages des régions Aquitaine, Alsace et Nord ont été atteints par l'EEL. Dès le départ des cas d'EEL seront également rapportés en Espagne (Gallicie dès fin 1996 – début 1997). Bien qu'aucune donnée officielle ne soit disponible, on peut estimer que des cas d'EEL étaient présents dans les élevages industriels en Belgique dès fin 1997 – début 1998 (données non publiées). Aujourd'hui l'EEL est présente dans plusieurs autres pays d'Europe tels que le Royaume Uni, les Pays-Bas, la Grèce (Xylouri et Fragiadakis, 2006), l'Italie, le Portugal et la Hongrie (Licois et al., 2006). En dehors d'Europe des cas sporadiques exclusivement fondés sur des descriptions cliniques parfois douteuses auraient été rapportés en Afrique du Nord (Licois et al., 2006), et peut-être au Mexique (Rodriguez-De Lara et al., 2008) et en Turquie.

Dès le départ, les premières approches scientifiques et médicales ont consisté à définir la maladie en termes cliniques et à essayer de reproduire le syndrome chez des lapins de laboratoire conventionnels ou SPF (Licois et al. 2005). Alors que les signes cliniques en élevages semblaient constants, la définition des lésions macroscopiques permettant le diagnostic

nécropsique de l'EEL a posé problème. Elle n'a été établie définitivement qu'après les premières reproductions expérimentales du syndrome chez des lapins SPF. En effet, en élevage et chez les animaux de terrain, des complications bactériennes secondaires se développent très souvent en phase terminale conduisant parfois à de sévères inflammations localisées ou diffuses tant de l'intestin grêle que du caecum conduisant à une erreur de dénomination (entéocolite épizootique) encore trop souvent commises à ce jour (Licois, 1998). En l'absence de complications bactériennes secondaires, les lésions macroscopiques observées à l'autopsie sont un très important ballonnement abdominal qui reflète une dilatation majeure de l'estomac et de l'intestin grêle, ces segments intestinaux étant remplis par un contenu intestinal très liquide. Macroscopiquement, on n'observe aucune lésion d'entérite aiguë ou chronique, ni d'hémorragies intestinales (Licois, 1998). Dans certains cas, le caecum peut être dilaté par du gaz. De même, le contenu caecal est parfois remplacé par une grande quantité de mucus plus ou moins solidifié. Le caractère très limité de la diarrhée, l'iléus et la modification du contenu caecal ont conduit, et conduisent toujours à des confusions entre l'EEL et l'entéropathie mucoïde, pathologie décrite depuis les années 1980 (Marlier et al., 2003). Cette confusion est pourtant absurde. En effet, l'EEL apparaissait dès le départ comme un syndrome digestif antérieur (estomac – intestin grêle), s'étendant très rapidement au sein d'un élevage ainsi qu'entre les élevages selon un mode de maladie contagieuse et touchant les animaux en croissance. A l'inverse, l'entéropathie mucoïde est un syndrome digestif postérieur (caecum – colon) à expansion lente au sein de l'élevage et sans expansion en dehors de l'élevage et touchant surtout des animaux plus âgés que les lapins à l'engraissement.

La situation épidémiologique actuelle réelle de l'EEL est très mal connue. Sur base des rapports des vétérinaires de terrain (données non publiées), la pathologie est toujours un problème majeur dans les élevages français et espagnols. La maladie est toujours très présente en Belgique et aux Pays-Bas mais la diminution drastique du nombre d'élevages industriels dans ces pays rend difficile toute interprétation des rapports de cas. Sur base d'observations de vétérinaires de terrain en France et aux Pays-Bas (données non publiées), il peut être estimé que l'EEL aurait une prévalence « élevages touchés » de plus de 90 % dans les grands pays producteurs européens. De même l'EEL serait toujours très présente dans des élevages semi-industriels. Depuis la fin des années 2000, des cas d'EEL en maternité sont de plus en plus fréquemment rapportés sur des lapines primipares ou sur des lapereaux de 15 à 30 jours (Boissot et al., 2011). Aucun lien direct n'a été établi à ce jour entre les formes observées à l'engraissement et en maternité. Progressivement, les cas d'EEL ont été signalés en

élevages biologiques ou en élevages amateurs où ils sont également très fréquents.

L'EEL était et semble toujours être un problème européen, les descriptions des cas cliniques connus étant en accord avec la définition lésionnelle du syndrome. Par contre, les rapports provenant d'autres pays sont plus suspects et laissent penser à certaines erreurs de diagnostic. A la connaissance de l'auteur aucune enquête épidémiologique exhaustive sérieuse n'a été menée au départ pour connaître avec précision les liens possibles existant entre les premiers cas alors même que les premières exploitations touchées semblent avoir été approvisionnée par la même firme d'aliments. Les causes d'apparition et les liens éventuels avec des acteurs précis tels que les marchands d'aliments et/ou les sélectionneurs de lapins aurait dû être analysés de manière approfondie comme l'aurait voulu une réaction cartésienne devant une pathologie émergente. De même la situation actuelle concernant l'EEL est très mal connue et ne repose que sur les rapports de cas de terrain. La confusion entre EEL et entéropathie mucoïde est malheureusement encore d'actualité même dans des articles publiés très récemment (Bäuerl et al., 2014) ce qui rend l'interprétation des résultats très difficiles pour ne pas dire caduque.

Mise au point des inocula de référence (TEC) - premiers résultats de recherche 1996 – 2006 – travaux de recherches par utilisation de techniques microbiologiques conventionnelles

Dès 1997, des essais de reproduction expérimentale de l'EEL ont été tentés. Au départ, différents inoculum et voies d'inoculation ont été utilisés et se sont traduits par des problèmes de répétabilité et de reproductibilités entre les essais (Le Gall et al., 1998; Licois, 1998; Licois et al., 1998). Parmi les inocula testés (aliments contaminés, contenus intestinaux de lapins malades, broyats de différents organes, filtrats de contenus digestifs, sang d'animaux malades) (Le Gall et al., 1998; Licois, 1998), l'administration d'aliments contaminés ou de contenus digestifs sont apparus comme les deux meilleures approches. Des différences majeures dans les taux de mortalité observés après inoculation d'animaux conventionnels ou SPF sont vite apparues, conduisant à proposer, chez les animaux SPF, des protocoles expérimentaux utilisant des immunosuppresseurs préalablement à l'inoculation afin d'augmenter l'intensité des signes cliniques et les mortalités (Licois et al., 1998). Ces protocoles ont vite été abandonnés. En effet, outre la lourdeur de la méthode, l'étude cinétique de l'évolution des gains quotidiens moyens chez des animaux SPF associée à l'identification des lésions typiques de l'EEL (animaux morts en cours d'expérience ou par abattage séquentiel) sont vite

apparues comme étant le meilleur moyen d'étudier une EEL expérimentale (Licois et al., 2005).

Conjointement à ces premiers essais, le développement d'un inoculum de référence limitant les variabilités inter expérimentales (dose infectante, taux de mortalité, voie d'inoculation,) est vite devenu incontournable (Licois et al., 2005). Sur ces bases la série des inocula TEC (pour TECHNIA, firme d'alimentation ayant fourni les échantillons de terrain) ont été développés. L'inoculum initial TEC1 (contenus caecaux de lapins malades inoculés avec l'inoculum de terrain TEC) donnant ensuite les générations suivantes d'inoculum de référence à savoir TEC2, TEC3 et TEC4, chaque numéro représentant le nombre de passage sur animaux SPF. D'autres inocula, moins virulents, ont été créés à partir d'échantillons de terrain belges et hollandais (Licois et al., 2003 ; Marlier et al., 2006). Leur utilisation expérimentale est cependant restée anecdotique.

Ces reproductions expérimentales sur lapin SPF ont permis de décrire avec précision les signes cliniques typiques à savoir : dans les 12 à 24 heures après inoculation orale, un arrêt de la prise alimentaire puis hydrique 24 à 48 heures plus tard. A ce stade une diarrhée aqueuse de très faible intensité est parfois présente alors que le tableau clinique est dominé par le ballonnement abdominal considérable qui persiste voire empire jusqu'à la mort des animaux généralement entre le 3ème et le 9ème jour après infection (Licois et al., 2005).

Les lésions typiques de l'EEL macroscopiques et microscopiques ont également été décrites avec précision sur les cas expérimentaux confirmant que l'EEL est bien une entéropathie primaire et non une entérite à proprement parler (Licois et al., 2005 ; Marlier et al., 2006 ; Dewrée et al., 2007). Au début de l'épidémie, des lésions pulmonaires amenant à établir des diagnostics de pneumonies aiguës ont de façon erronée été liées à l'EEL (Licois et al., 2006). Cette observation ne doit plus être retenue comme un critère diagnostique à ce jour. Chez les animaux d'élevage, le tableau lésionnel typique, est très souvent modifié par le développement de complications bactériennes secondaires qui compliquent le tableau. Cette situation rend parfois le diagnostic difficile, surtout si d'autres pathologies telles que les coccidioses ou les clostridioses à *Clostridium spiroforme* sont présentes conjointement. Dans ces cas, l'observation d'un ballonnement stomacal majeur lié à la présence d'un contenu stomacal beaucoup trop abondant et excessivement

liquide présent sur un nombre significatif d'animaux autopsiés sera le critère diagnostique majeur.

A ce jour, l'inoculation de lapin SPF avec suivi des GOM, des signes cliniques de ballonnement et des lésions macroscopiques chez les animaux morts est toujours le seul et unique moyen de confirmer la présence de(s) agent(s) responsable(s) de l'EEL dans un échantillon.

En dépit des très nombreuses recherches menées, l'étiologie est toujours inconnue à la date de rédaction. Une infection bactérienne avec un rôle favorisant ou vecteur de l'alimentation sans que l'alimentation ne soit l'étiologie primaire est l'hypothèse actuelle. Cette notion d'infection bactérienne a cependant mis longtemps à s'imposer, l'hypothèse virale ayant été privilégiée au début des recherches (1996 – 1997). Deux raisons majeures peuvent expliquer que le concept d'infection bactérienne ait été trop rapidement écarté au départ. La première est l'absence d'uniformité dans les résultats des examens bactériologiques menés en aérobiose et en anaérobiose tant sur les animaux de terrain que lors des premières reproductions expérimentales. La seconde est l'aspect épidémiologique en condition de terrain qui correspondait mieux à une infection virale qu'à une maladie bactérienne (Licois, 1998 ; Licois et al., 2006).

L'hypothèse d'une étiologie bactérienne repose sur des observations directes lors des recherches ou par élimination d'autres agents. Toutes ces études microbiologiques ont été réalisées par des méthodes analytiques classiques (mise en culture, observation microscopique, passage sur cultures de cellules, ...) (Marlier et al., 2006 ; Szalo et al., 2007 ; Huybens et al., 2011). Dès le départ, l'étude de la composition des inoculum TEC qui sont préparés par tamisage et centrifugation à basse vitesse de contenus caecaux, a permis d'exclure les étiologies alimentaires pures, parasitaires et mycotiques (Licois et Coudert, 2001). En effet, comme le syndrome peut être reproduit de façon fiable, le rôle d'agents infectieux (parasites, champignons, virus et bactéries) ne se trouvant pas dans l'inoculum pouvait être écarté. Aucun des inocula de référence ne contient de parasites ni de toxines mycotiques connues, ce qui élimine ces hypothèses. De même les expériences de centrifugation différentielle des inoculums de références avec fractionnement par différentes méthodes ont permis d'éliminer les agents viraux (Szalo et al., 2007 ; Licois 2007) tout en confirmant l'hypothèse infectieuse. Les TEC sont exempts de

lagovirus, pestivirus, circovirus, adenovirus, coronavirus, parvovirus mais contiennent des rotavirus (Céré et al., 2000, Marlier et al., 2003, Marlier et al., 2005 ; Licois et al., 2005 ; Szalo et al., 2007). Le rôle de ces rotavirus a été éliminé par la suite car, l'EEL ne peut pas être reproduite par inoculation avec les rotavirus contenu dans le TEC. En outre, Szalo et collaborateurs (2007) ont produit par centrifugation sur gradient discontinu de sucrose une fraction d'inoculum dérivée de TEC3 exempte de rotavirus et permettant de reproduire l'EEL.

De nouveau, le rôle étiologique des espèces bactériennes non présentes dans le TEC peut être éliminé dès le départ, ce qui est notamment le cas de *Pasteurella multocida*, *Clostridium spiroforme* et *Escherichia coli*, les TEC en étant exempts (Licois et Coudert, 2001 ; Licois et al., 2005). De même Les résultats des examens bactériologiques réalisés de manière standardisée et systématique (aérobiose / anaérobiose) sur des animaux de terrain (Marlier et al., 2003 ; Marlier et al., 2006 ; Marlier et Vindevogel, 2003) montrent que la flore isolée des contenus digestifs est relativement pauvre. Une implication directe et/ou comme étiologie unique de certains taxons dans l'EEL a pu être écartée sur base d'un ou de plusieurs des critères suivants : (1) faibles fréquences d'isolement à partir des cas typiques provenant d'animaux de terrains, (2) échec lors de ré-inoculation expérimentale directe d'une ou de plusieurs souches, (3) absence totale de cette bactérie dans les prélèvements. Ces taxons sont *Enterococcus casseliflavus* et/ou *durans*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Bacillus licheniformis*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Vibrio* sp, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium fallax*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium baratii*, *Capnocytophaga* spp, *Bacteroides* spp, *Haemophilus paracuniculus*, *Pasteurella* sp., *Salmonella* sp. et *Yersinia* sp. (Marlier et al., 2003 ; Marlier et al., 2006 ; Dewrée et al., 2004 ; Szalo et Marlier, 2006 ; Huybens et al., 2010).

Le rôle joué par *Clostridium perfringens* dans l'étiologie de l'EEL a fait l'objet de nombreuses discussions car cette bactérie est très fréquemment isolée (80%) de contenus digestifs de lapins de terrain morts d'EEL (Marlier et al., 2006). A l'inverse, elle n'est que beaucoup plus rarement isolée du contenu caecal de lapins SPF (20%) lors de reproductions expérimentales réussies d'EEL (Dewrée et al., 2004). De même, l'inoculation de souches provenant de lapins morts d'EEL à des lapins sains ne permet pas de reproduire la maladie (Marlier et al., 2006). Chez

des lapins de terrains morts d'EEL et par génotypage par PCR, 2 toxinotypes majeurs, le A et le C, ont été mis en évidence respectivement pour 66 et 34% des souches. Le gène codant pour l'entérotoxine est également présent dans 73 % des souches. A côté de l'isolement direct de la bactérie, la mise en évidence de sa toxine majeure α produite par toutes les souches indépendamment du toxinotype peut également être utilisée à titre diagnostique. Globalement cette toxine peut être détectée dans le contenu digestif de 70% des animaux morts d'EEL (absence dans 30% des cas) alors qu'elle est détectée dans 20% des cas chez des animaux morts d'autres pathologies digestives (Dewrée et al., 2003). Par contre ni la toxine β , ni l'entérotoxine ne peuvent être mise en évidence directement dans le surnageant des cultures des souches provenant de lapins morts d'EEL, ni des contenus des inocula de référence (Dewrée et al., 2003 ; Marlier et al., 2006). Toutes ces observations indiquent clairement que si *Cl. perfringens* joue un rôle dans la mortalité globale enregistrée lors de passage d'EEL en élevage, un rôle étiologique direct et unique semble très peu probable. Cette interaction sur la mortalité globale pourrait aussi expliquer les effets thérapeutiques de la bacitracine de zinc.

Les toxines A/B de *Cl. difficile* n'ont jamais pu être mises en évidence dans les contenus digestifs (cæcaux et/ou intestin grêle) d'animaux de terrains et d'expériences morts d'EEL. aux moyens d'un kit commercial (Marlier et al., 2006).

Au niveau clinique et dès 2002, l'hypothèse d'une étiologie bactérienne (bactérie toxino-gène) était confortée par plusieurs observations. La première est la présence d'une phase précoce de la pathologie observée lors des reproductions expérimentales et ne pouvant s'expliquer que par un facteur « toxique ». La seconde est fondée sur une filtration différentielle des inocula référence démontrant la présence de deux facteurs. Le premier a une taille inférieure à 0,45 μ et permet de reproduire la phase précoce de la maladie visible dès J1 après inoculation. Le second a une taille supérieure à 0,45 μ et reproduit principalement la phase plus tardive visible dès J2 – J3 après inoculation. Enfin l'administration conjointe des deux facteurs permet la reproduction d'une EEL expérimentale typique (Marlier et al., 2003). La troisième observation, et probablement la plus significative, est que chez des animaux EOPS inoculés, il est possible d'observer la présence de bactéries en surface et entre les cellules de l'épithélium intestinal parfois même dans les entérocytes sans que des lésions des structures

nerveuses telles que celles de la « Grass disease » des chevaux ou du « Key-Gaskell » chez les chats ne soient présentes. Les observations en microscopie électronique à transmission ou à balayage des mêmes animaux confirment la présence de bactéries d'une taille approximative de 1500 nm par 700 nm, avec une paroi bactérienne potentiellement de type Gram négatif (Dewrée et al., 2007).

A ce stade, les conclusions étaient que le(s) agent(s) étiologique(s) de l'EEL est (sont) probablement une (des) bactérie(s) incultivable(s) sur milieux inertes. Cette conclusion étant supportée par l'ensemble des travaux antérieurs ainsi que par l'impossibilité de reproduire l'EEL par inoculation de lapins avec un pool des souches bactériennes obtenues après culture au départ de l'inoculum TEC3 en aérobie et en anaérobie (Marlier et al., 2006). De très nombreux autres résultats de laboratoire partiels, non concluants ou négatifs ont été obtenus au cours de ces recherches (Dewrée et al., 2004 ; Szalo et Marlier, 2006) tels que des tentatives de développement de méthodes simples d'observation de l'agent directement in situ ; des études de la réponse humorale d'animaux morts d'EEL vis-à-vis des souches bactériennes cultivables présentes dans le TEC3 ; la production de sérums épuisés susceptibles de posséder des anticorps dirigés contre le(s) agent(s) responsable(s) de l'EEL ; l'étude approfondie de la flore bactérienne présente dans l'inoculum de référence TEC3, par bactérioscopie, par immunofluorescence et par cultures aérobies et anaérobies ; l'étude du caractère sporulant ou non de l'agent étiologique de l'EEL ; sa résistance aux traitements thermiques et chimiques ; le développement de méthodes de mise en culture spécifiques par inoculation d'œufs embryonnés, par culture de segments intestinaux *ex vivo* ; par mise en cultures primaires de cellules intestinales ; par isolement de bactérie après adhésion préalable sur substrat cellulaire, (Dewrée et al., 2004 ; Szalo et Marlier, 2006)

Toutes ces résultats partiels ou négatifs n'ont jamais, et ne seront probablement jamais, publiés et/ou divulgués largement. Les recherches sur l'EEL sont le reflet d'un problème majeur en sciences à savoir la publication de résultats négatifs. Cette situation a conduit plusieurs équipes à reproduire inutilement des expérimentations n'ayant pas abouti dans d'autres laboratoires ce qui a conduit à des pertes de temps et de moyens financiers. On peut néanmoins se réjouir que, dans le cadre spécifique de l'EEL, les deux plus grosses équipes ayant travaillé sur cette pathologie (INRA Tours et ULg Liège) aient dès le

départ décidé d'une collaboration structurée et active. L'auteur remercie personnellement Dominique Licois pour cette coopération.

Utilisation des techniques de biologie moléculaire pour analyse des populations bactériennes complexes ; 2007 - 2012

Après 10 ans de recherche sur l'entéropathie épidémiologique du lapin, l'hypothèse étiologique la plus probable était celle d'un ou plusieurs agents bactériens incultivables (Licois et al., 2006; Marlier et al., 2006; Szalo et al., 2007). Les techniques de bactériologie classique ayant montré leurs limites, d'autres approches devaient être envisagées. Cette situation n'était pas étonnante si on tient compte que seul 20 à 40% des espèces présentes dans le tractus digestif seraient identifiables par des méthodes traditionnelles (Macfarlane et Macfarlane, 2004; Suchodolski et al., 2004). Une étude comparant les flores bactériennes caecales de lapins sains, malades d'EEL et présentes dans les TEC afin de tenter d'identifier l'agent ou les agents responsables de l'EEL apparaissait comme la seule alternative possible. De nouveau eu égard aux nombreux résultats négatifs, l'intégralité de ces travaux n'a pas été publiée dans des *peer review*. Ils ont néanmoins été repris dans le cadre d'une thèse de doctorat en sciences vétérinaires (Huybens, 2012). Ces résultats seront résumés dans le cadre de cette synthèse notamment pour éviter une redondance inutile des expérimentations futures.

La première partie des travaux menés a consisté à tenter de réduire au maximum la flore bactérienne présente dans les échantillons. Pour ce faire des techniques de fractionnement (centrifugation sur gradient de sucrose, traitements chimiques, traitements aux antibiotiques, ...) ont été mises au point afin de réduire le nombre d'espèces bactériennes n'ayant pas de lien étiologique direct avec l'EEL tout en conservant le(s) agent(s) dont la présence était démontrée dans les échantillons par inoculation à des lapins EOPS (Szalo et al., 2007 ; Huybens et al., 2009 ; Huybens et al., 2011 ; Huybens, 2012). Les différentes fractions inoculées ainsi que leurs modes de préparation, les taux de morbidité, mortalité et la virulence globale sont présentées dans le tableau 1. Quatorze échantillons à savoir, TEC3, TEC4, sept fractions de TEC4 avec des virulences variables, deux fractions de TEC4 obtenues après test d'adhésion en culture de cellules, et trois contrôles négatifs (contenus caecaux de sains EOPS, élevage non contaminé et lapin de compagnie) ont ensuite été

sélectionnés pour analyse moléculaire (Huybens et al., 2009 ; Huybens et al., 2011 ; Huybens, 2012).

Après préparation, les flores bactériennes ont d'abord été analysées par des techniques de bactériologie classique (identification/quantification des espèces cultivables sur des milieux traditionnels et examen bactérioscopique direct après coloration de Gram) puis des techniques de microbiologie moléculaire ont été utilisées. L'hypothèse de recherche était la mise en évidence d'une ou plusieurs séquences génomiques spécifiques. Ce(s) séquence(s) devai(en)t être présente(s) dans les fractions reproduisant la pathologie et absente(s) de celles ne la reproduisant pas. Les méthodes utilisées ont été la RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe) (Huybens et al., 2011), l'ARDRA (analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié, ici le 16SrDNA) (Huybens, 2011), la DGGE (Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant pour l'analyse des régions hypervariables V3 et, V6 à V8 du gène 16SrDNA) (Huybens, 2011) suivie du séquençage de certaines bandes, et le séquençage haut débit (Huybens et al., 2015) pour analyse globale de la flore présente dans les échantillons. Il est hors du propos de cette synthèse de décrire ces méthodes. Seuls les résultats seront donc présentés.

Par RAPD, 12 profils différents ont été obtenus avec présences de bandes spécifiques dans deux cas. (Huybens, et al., 2011). Malheureusement, aucun lien n'a pu être établi avec l'EEL sur le terrain. La première séquence (R6B – 396pb) fait partie d'un gène de virulence connu appelé *yijP*. Ce gène est très conservé chez *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria* sp, *Escherichia fergusonii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* et *Shigella boydii*. Ce gène code pour une protéine contenant trois domaines. Le premier est localisé dans la membrane cytoplasmique, le second a une fonction enzymatique de sulfatase et le troisième a une fonction inconnue. La souche bactérienne porteuse de cette séquence a été isolée (*S. epidermidis*) (Huybens, 2011) mais son inoculation n'a pas reproduit l'EEL. La seconde séquence dénommée (AP5 – 788pb) est une séquence inconnue. Neuf phases ouvertes de lectures sont présentes dans la séquence mais une seule a une correspondance dans les banques de données existantes. Cette phase ouverte de lecture correspondrait à une protéine d'*Eggerthella lenta*, une espèce présente dans le tractus digestif humain et participant à la digestion des lignines (Clavel et al., 2006; Jin et al., 2007).

Les profils de restriction (ARDRA) obtenus après digestion avec 22 enzymes différentes n'ont pas permis de mettre en évidence de manière systématique une bande présente dans les fractions reproduisant la maladie, mais absente ou en quantité faible dans les témoins négatifs et les fractions non virulentes (Huybens, 2011).

Des bandes d'intérêt ont été mises en évidence par analyse (DGGE) (Huybens et al., 2008 ; Huybens 2011) des régions V3 et V6 à V8. Les séquences mises en évidence dans les bandes d'intérêt étaient différentes selon les échantillons. Aucune séquence spécifique aux inocula positifs n'a été mise en évidence lors des séquençages des bandes d'intérêt. Sur base des séquençages, les bactéries présentes dans les différentes bandes appartenaient aux familles des *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae* et *Enterococcaceae*.

En complément aux études sur les échantillons, la DGGE a également été utilisée pour suivre l'évolution des flores fécales de lapins sains et inoculés avec TEC4. Des échantillons de matières fécales et de sang ont été collectés en cours de développement de la maladie. L'évolution du nombre de bandes par jour a été suivie pour les profils de la région V3 et régions V6-V8. Aucune bande n'est significativement plus, ou moins, présente chez les inoculés que chez les témoins. Les profils et nombre de bandes sont liés au lapin et non à l'inoculum ou au jour. Une analyse plus spécifique des bandes apparaissant deux jours après inoculation a été effectuée. Aucun genre particulier ne semble lié aux nouvelles bandes. Simplement Les bactéries du phylum Firmicutes semblent se développer plus facilement en phase aiguë de la maladie, conclusion déjà tirée grâce aux analyses bactériologiques réalisées par des méthodes conventionnelles.

De même une bactériémie transitoire a pu être mise en évidence chez un nombre restreints (3/18) de lapins inoculés mais jamais chez les animaux témoins. Sur base des résultats d'amplification, plusieurs espèces étaient présentes conjointement dans les prélèvements sans qu'aucune conclusion ne puisse être tirée. Les hémocultures réalisées sur ces trois prélèvements ont permis d'isoler une souche de *Bacillus* spp et d'une souche de *Staphylococcus pasteurii*. Aucune bactérie n'a pu être mise en évidence dans le troisième prélèvement (Huybens, 2011).

Face à ces échecs répétés, des analyses globales des flores bactériennes présentes dans 6 échantillons (tableau 1) TEC4, TEC3, fraction 50% de TEC4, TEPH (ne contenant pas d'*Enterococcus faecium*) et 1

témoin négatif ont été soumis à une analyse par séquençage à haut débit. Une analyse globale de dizaines de milliers de séquences a été effectuée avec 16 851 séquences retenues au final pour l'analyse. Ce nombre représente entre 4000 et 6300 séquences pour chaque échantillon. Les flores séquencées sont très différentes des flores cultivées. Six phylums ont été identifiés. Les Firmicutes et les Bacteroidetes sont les phylums dominants dans toutes les fractions. Ceci est peu étonnant car ces phylums représenteraient plus de 97% de la flore caecale chez les lapins sains. Les autres phylums étaient les Proteobacteria, les Actinobacteria, les Fusobacteria et les Tenericutes. Entre 35 et 86 genres ont été identifiés dans chaque prélèvement. Malheureusement, les dendrogrammes construits sur base des résultats ne regroupent pas les fractions en fonction de leur virulence. La richesse et la diversité des échantillons est égale voire supérieur à celle d'échantillons de matière fécale humaine ou de sol (Huybens et al., 2013).

En dépit des espoirs placés dans ces méthodes moléculaires et aux avancées significatives obtenues par utilisation de ces dernières dans d'autres domaines médicaux, les limites de résolution de ces méthodes, souvent au niveau du genre bactérien, ont été atteintes sans que l'étiologie de l'EEL puisse être définitivement déterminée. Il peut donc s'agir d'une espèce bactérienne au sein d'un genre, ou de souches pathogènes au sein d'une espèce connue ou inconnue.

Les premiers résultats obtenus lors du séquençage à ultra haut débit montrent que l'utilisation de la biologie moléculaire est toujours intéressante mais ne serait probablement capable que de limiter les recherches de l'étiologie au niveau d'une famille ou d'un seul genre bactérien. Dans l'état actuel des connaissances, il apparaît peu probable que l'identification directe de l'agent ne soit possible par ces seules méthodes génétiques.

Gestion et traitement de l'EEL en élevages.

A ce jour les deux traitements les plus souvent recommandés sont la bacitracine de zinc (Boissot et al., 2004) ou la tiamuline (Coudert et al., 2000). Il est de l'avis de l'auteur que la bacitracine se montre généralement plus efficace, la maladie restant généralement sous contrôle aussi longtemps que l'antibiotique est distribué dans l'eau de boisson. Des reprises de mortalité sont régulièrement signalées 3 à 5 jours après arrêt des traitements. L'idée de ne pas intervenir et d'attendre que plusieurs attaques soient passées dans l'élevage en espérant le développement d'une éventuelle immunité, comme cela a parfois été recommandé ne se traduit jamais par une amélioration

durable. Un renforcement drastique des mesures d'hygiène générale (pédiluve entre les locaux, manipulation stratégique des cadavres, utilisation de gants, changement d'habits etc. entre les locaux) semble de nature à améliorer la situation en élevage.

L'application de mesures techniques de limitation de l'ingéré et l'adoption d'une formulation alimentaire adaptée (richesse en fibres, nature des fibres) sont également des mesures basiques (Boissot et al., 2003). De même, en élevage, la gestion de l'EEL seule, sans mise en place de méthodes de diagnostic, de traitement et de gestion des autres maladies digestives qui favorisent l'explosion de l'EEL et en augmentent les conséquences (interaction coccidiose subclinique / EEL notamment), est évidemment source d'échecs thérapeutiques majeurs.

Perspectives et problèmes futurs.

Malheureusement la première remarque sera pessimiste. En effet, depuis le départ à la retraite de D. Licois (INRA Tours) et l'arrêt des subventions de recherches portant sur l'EEL (D. Marlier, ULg, Belgique) plus aucun laboratoire n'entretient les inocula de référence dont la durée de vie du pouvoir infectieux est inconnue. La disparition de ce matériel serait une perte majeure.

Bien que l'hypothèse virale ait été écartée, la détermination du virome digestif du lapin pourrait conforter cette théorie.

Les coûts des analyses génétiques ayant singulièrement diminué ces dernières années, la répétition des recherches par séquençage haut débit sur un beaucoup plus grand nombre d'échantillon serait sûrement de nature à mieux cadrer le(s) agent(s) étiologique(s), cette augmentation du nombre permettant peut être de contrecarrer la résolution limitée au genre des analyses par HT sequencing.

Une toxine semble intervenir directement dans la pathogénie de l'EEL en tous cas dans la phase précoce de l'infection expérimentale. Cette phase précoce est observée, entre autre, après inoculation par voie orale (1) du filtrat de TEC3 (Marlier et al., 2003) ; (2) de surnageant de centrifugation du TEC3 sur gradient de sucrose (Szalo et al., 2007) ; et (3) de surnageant d'une centrifugation de 2h à 8000g du TEC4 (Licois, 2007). Une protéine de 75kDa présente dans ce surnageant serait spécifique au TEC (Licois, communication personnelle). La caractérisation de cette protéine par protéomique pourrait permettre la mise en évidence de la (des) bactérie(s) qui la produise(nt).

Conclusions.

Malheureusement, à ce jour, ni les études effectuées en bactériologie classique, ni celles ayant fait appel à des méthodes de bactériologie moléculaire ne nécessitant pas de mise en culture n'ont permis de déterminer l' (les) espèce(s) bactérienne(s) intervenant dans l'étiologie de l'EEL. Toutes ces études ont seulement permis d'éliminer des hypothèses (*Cl. perfringens*, *Enterococcus faecium*, *Ent. Faecalis*, *Pseudomonas luteola*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, ...). Enfin, les résultats des études en biologie moléculaire semblent montrer que la richesse et la densité de la communauté bactérienne caecale totale ne sont pas affectées durant une reproduction expérimentale de l'EEL, ce qui plaiderait plutôt pour un facteur étiologique unique.

Remerciements

L'auteur remercie D. Licois (INRA Tours, France) et J. Mainil (secteur bactériologie ULg, Belgique) pour les nombreuses années de collaboration fructueuse même si l'étiologie de l'EEL est toujours un mystère.

Références

- Boissot P., Licois D., Gidenne T. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. 10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Paris, 2003
- BÄUERL C., COLLADO M.C., ZUÑIGA M., BLAS E., PEREZ MARTINEZ G., 2014. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy. PLoS One. 22 doi: 10.1371/journal.pone.0105707.
- Boissot P., Duperray J., Guyonvarch A., Licois D., Coudert P. Interaction entre le passé sanitaire des lapines ou des lapereaux sous la mère vis à vis de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) et une contamination expérimentale de ces lapereaux en engraissement. 11èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Paris, 2005
- BOISSOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., RICHARD A., LICOIS, D. COUDERT P., 2004. Evaluation of the effectiveness of soluble bacitracin (bacivet s) in drinking water compared to bacitracin in the feed (albac), during an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy syndrome. 8th world Rabbit Congress, 2004, Puebla Mexico
- Coudert P., Rideaud P., Raboteau D., 2000. Epizootic Rabbit Enterocolitis: spontaneous evolution and attempt to control the disease. 7th world Rabbit Congress, 2000, Spain, Valencia
- DEWRÉE R., MARLIER D., VINDEVOGEL, H. 2004 Rapport final de la convention de recherche S6070, L'entéropathie épizootique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) : étude de l'étiologie et des moyens de prévention", convention S 6070 des recherches subventionnées par le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture
- DEWRÉE R., MEULEMANS L., LASSENCE C., DESMECHT D., DUCATELLE R., MAST J., LICOIS D., VINDEVOGEL H., MARLIER D. 2007. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Sci.*, 15, 91-102.
- DUVAL M.L. Développement de l'Entérocologie en France. 7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Lyon 1998

- HUYBENS N. 2012. Contribution to the identification of the aetiological agent of epizootic rabbit enteropathy. Marlier D.; Mainil J. Promoteurs, Thèse de doctorat en sciences vétérinaires, Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, ISBN 9782875430236
- HUYBENS N., HOUËIX J., SZALO M., LICOIS D., MAINIL J., MARLIER D., 2008. Is epizootic rabbit enteropathy (ERE) a bacterial disease? In: proceeding of the Proceedings of the 9th WRSA – World Rabbit Congress, Verona, Italy,
- HUYBENS, N., HOUËIX, J., LICOIS, D., MAINIL, J., MARLIER, D., 2013. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples. *Vet. J.* 196:109-110
- HUYBENS N., HOUËIX J., LICOIS D., MAINIL J., MARLIER D., 2009. Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces the Epizootic Rabbit Enteropathy. *World Rab. Sci.* 17: 185-193.
- HUYBENS, N., HOUËIX, J., LICOIS, D., MAINIL, J., MARLIER, D., 2011. Epizootic rabbit enteropathy: Comparison of PCR-based RAPD fingerprints from virulent and non-virulent samples. *Vet. J.* 190: 416-417.
- HUYBENS, N., HOUËIX, J., LICOIS, D., MAINIL, J., MARLIER, D., 2011. Epizootic rabbit enteropathy inoculum (TEC4): antibiograms and antibiotic fractionation. *Vet. Res. Com.* 35 : 13 – 20.
- HUYBENS N., MAINIL J., MARLIER D., 2010 Rapport final de la convention de recherche RT 06/7 Identification moléculaire des bactéries impliquées dans l'entéropathie épizootique du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) et développement d'une prophylaxie vaccinale ; convention de recherches RT 06/7 MINRABBIT subventionnées par le Ministère de la Santé Publique, de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire et de l'Environnement.
- LE GALL J.P., PICAULT J.P., ALLÉE C., LE BIHANNIC P., COLIN P. Essais de reproduction expérimentale de l'entérite épizootique du lapin (E.E.L.). 7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Lyon 1998
- LICOIS D. Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'Entérocélite Epizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie. 7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Lyon 1998
- LICOIS D. Etude in vivo de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4, inoculum utilisé pour la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin. 12èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Le Mans 2007
- LICOIS D., COUDERT P. Entéropathie Epizootique du Lapin : reproduction expérimentale, symptômes et lésions observées. 9èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Paris, 2001
- LICOIS D., DEWRÉE R., COUDERT P., VINDEVOGEL H., MARLIER D. Essai de reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) avec des inoculums originaires de Belgique et des Pays-Bas et avec des souches bactériennes isolées de ces inoculums ainsi que de TEC2 et TEC3 (inoculums INRA). 10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Paris, 2003
- LICOIS D., COUDERT P., CERÉ N., VAUTHEROT J.F. Epizootic enterocolitis of the rabbit : review of current research. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000
- LICOIS D., VAUTHEROT J.F., COUDERT P., DAMBRINNE G., 1998. Experimental reproduction of epizootic enterocolitis in SPF rabbits. *World Rab. Sci.* 6 : 349-353.
- LICOIS D., WYERS M., COUDERT P., 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.* 36: 601-613
- LICOIS D., COUDERT P., MARLIER D., 2007. Epizootic Rabbit Enteropathy. In : Recent advances in rabbits sciences. L. Maertens, C. Coudert. Eds Publication of the COST and ESF, ISBN 92-898-0030-5.
- MACFARLANE S., MACFARLANE G.T., 2004. Bacterial Diversity in the Human Gut. *Adv. Appl. Microbiol.* 54: 261-289
- MARLIER D., DEWRÉE R., DELLEUR V., LICOIS D., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H., 2003 Formation continue. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Ann. Med. Vet.* 147 : 385 - 392.
- MARLIER D., DEWRÉE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., Poulipoulis A., Vindevogel H. L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. 10èmes Journ. Rech. Cunicole Fr, Paris, 2003
- MARLIER D., DEWRÉE R., LASSENCE C., LICOIS D., MAINIL J., COUDERT P., MEULEMANS L., DUCATELLE R., VINDEVOGEL H., 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet. J.* 172: 493-500.
- RODRIGUEZ-DE LARA R., CEDILLO-PELAEZ C., CONSTANTINO-CASAS F., FALLAS-LOPEZ M., COBOSPERALTA M.A., GUTIERREZ-OLVERA C., JUAREZ-ACEVEDO M., MIRANDA-ROMERO L.A., 2008 Studies on the evolution, pathology, and immunity of commercial fattening rabbits affected with epizootic outbreaks of diarrhoeas in Mexico: a case report. *Res. Vet. Sci.* 84: 257-268.
- Suchodolski J.S., Ruaux C.G., Steiner J.M., Fetz K., Williams D.A., 2004. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4702-4708
- SZALO I., LASSENCE C., LICOIS D., COUDERT P., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H., MARLIER D., 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J.* 173: 652-657.
- SZALO M., MARLIER, D. 2006 Rapport final de la convention de recherche - S6143 L'entéropathie épizootique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) : étude approfondie de l'étiologie et des moyens de prévention, convention S 6143 des recherches subventionnées par le Ministère de la Santé Publique, de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire et de l'Environnement
- XYLOURI E., FRAGKIADAKIS M., 2006. Epizootic rabbit enteropathy - current data and control. *J. Hellen. Vet. Med. Soc.* 57: 302-314.

Tableau 1 : Nom, origine, mode de préparation et virulence des inoculums utilisés

Nom	Origine et technique de préparation	Virulence
TEC3	Inoculum de référence de l'INRA produit à partir du troisième passage de matière fécale contaminée sur lapin EOPS	+++
TEC4	Inoculum de référence de l'INRA produit à partir du quatrième passage de matière fécale contaminée sur lapin EOPS	+++
Sur	Surnageant récolté après centrifugation sur coussin de sucrose	-
10%	Contenu du coussin de sucrose 10% après centrifugation	non testée
20%	Contenu du coussin de sucrose 20% après centrifugation	non testée
30%	Contenu du coussin de sucrose 30% après centrifugation	+
40%	Contenu du coussin de sucrose 40% après centrifugation	non testée
50%	Contenu du coussin de sucrose 50% après centrifugation	++
CT	Culot récolté après centrifugation sur coussin de sucrose	+++
RK501	Passage de la fraction 50% sur des cellules RK13	++
RK502	Passage de la fraction RK501 sur des cellules RK13	+/-
RIN (rinçage)	Liquide de rinçage récolté avant récupération de la fraction RK502	-
PLA	Passage de la fraction 50% sur une boîte de culture cellulaire vide	-
CERK	Résultat du traitement de la fraction RK501 par une solution d'éthanol / chloroforme	-
DOX	Résultat du traitement du TEC4 par une solution de doxycycline	+++
BACI	Résultat du traitement du TEC4 par une solution de bacitracine	+++
TAB	Témoin positif du traitement du TEC4 par le fractionnement aux antibiotiques.	+++
TEPH	Résultat du traitement du TEC4 par un tampon pH 2,2	+++
50PH	Résultat du traitement du 50% par un tampon pH 2,2	+/-
TEM1	Témoin négatif provenant du contenu caecal d'un lapin EOPS, préparé comme du TEC	-
TEM2	Témoin négatif provenant du contenu caecal d'un lapin domestique, préparé comme du TEC	-
TEM3	Témoin négatif provenant du contenu caecal d'un lapin d'élevage sain, préparé comme du TEC	-
TEM4	Témoin négatif provenant du contenu caecal de quatre lapins EOPS, préparé comme du TEC	-