

MODELE DE REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE L'ENTEROCOLITE ÉPIZOOTIQUE CHEZ DES LAPINS EOPS

LICOIS D., VAUTHEROT J.F., COUDERT P., DAMBRINE G.

INRA, Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie, 37380 NOUZILLY - France

RESUME : Soixante-quatre lapins EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés), âgés de 4 à 6 semaines ont été répartis en deux lots égaux. L'un (TC), a été traité pendant 3 semaines avec un corticoïde, la dexamétasone, à raison de 3 injections de 4 mg/kg, par semaine. L'autre lot (NT), a reçu seulement des injections d'eau physiologique. Après 19 jours de traitement, l'ensemble des animaux a été inoculé par voie orale, avec du broyat digestif susceptible d'induire l'Entérocologie Epizootique du Lapin (EEL). Les résultats ont montré qu'avant l'inoculation, la croissance a été fortement réduite dans le lot traité à la dexamétasone : poids vif réduit de 24% par rapport au lot non

traité. L'inoculation a entraîné une élévation considérable de la mortalité dans le lot TC : 65,5%, contre 13,8% dans le lot sans corticoïde, au cours des 9 jours d'observation ayant suivi l'inoculation. Les lésions caractéristiques de l'EEL ont été retrouvées chez 74% des lapins morts dans le lot TC et chez 100% de ceux du lot NT. La mortalité est apparue un jour plus tôt chez les lapins TC : à J2 post-inoculation, vs J3 pour le lot NT. Dès J1, des lésions spécifiques de l'EEL ont été détectées dans le lot TC. Ce modèle expérimental animal (immunodépression de lapin EOPS) constitue une avancée capitale pour la suite des travaux sur l'EEL.

ABSTRACT : Experimental reproduction of Epizootic Enterocolitis with SPF rabbits

Sixty-four 4 to 6-week-old SPF (specified pathogen free) rabbits were distributed into two equal groups. The first one (TC) was treated with injections of dexametasonone (4 mg/kg) during 3 weeks, at the rate of 3 injections per week. The second one was only given saline solution (NT). After 19 days of treatment all the animals were orally inoculated with digestive product able to induce (EER). The results showed, before inoculation, a strong growth depression in the TC group: live weight reduced by 24% with regard to the NT group. During the 9 days of

observation following inoculation, an important increase of the mortality was observed in the treated group: 65.5%, with corticoïd, instead of 13.8% in the control group. The specific lesions of EER were observed in 74% of the dead rabbits of the TC group and in 100% in the NT one. This mortality began one day earlier in the TC group: day 2 post inoculation vs day 3 for the the NT one; and as early as day one, characteristic lesions of EER were detectable in the TC group. This experimental animal model (immunodepressed SPF rabbits) can be considered as an important tool for further studies on EER.

INTRODUCTION

Depuis fin 1996-début 1997, un nouveau syndrome digestif grave est apparu dans les élevages cynicoles de l'ouest de la France. Cette pathologie, caractérisée par une diarrhée aqueuse de faible intensité précédée d'une baisse de consommation d'aliment, entraîne une mortalité très élevée (30 à 80%). La diffusion de la maladie a été très rapide. Elle s'est étendue aux autres régions de France en 1997 et 1998 (DUVAL, 1998) et en Europe (LEBAS et COUDERT, 1997). Dénommée Entérocologie Epizootique du Lapin (EEL), cette maladie, qui atteint préférentiellement les lapereaux en engraissement, se distingue des autres pathologies intestinales connues chez le lapin par un tableau clinique et lésionnel spécifique. Outre la diarrhée et la mortalité, on observe généralement un ballonnement abdominal prononcé dû à une dilatation de tous les segments du tractus digestif y compris l'estomac dont les contenus sont très liquides. Ces symptômes sont parfois associés à une parésie caecale et à la présence de mucus, notamment dans le côlon (COUDERT *et al.*, 1997). Par contre aucune lésion macroscopique de congestion ou d'inflammation n'est visible, en particulier au niveau du caecum, alors que cet organe est le siège privilégié de lésions typiques d'entérites aiguës, dans les cas de coccidiose caecale, de clostridiose ou de colibacillose due aux *Escherichia coli* entéropathogènes (LICOIS, 1998).

Les essais de reproduction expérimentale de l'EEL ont clairement démontré l'intervention d'un agent infectieux dans le développement de la maladie (LE GALL *et al.*, 1998, LICOIS, 1998). L'origine alimentaire qui prévalait au début a été progressivement exclue (LEBAS 1998). Plusieurs arguments plaident en faveur d'une hypothèse virale de l'EEL notamment l'absence d'efficacité de la plupart des antibiotiques, le caractère épizootique, la diffusion de l'agent pathogène, la transmissibilité de la maladie ainsi que l'existence de lésions histologiques pulmonaires (WYERS, 1998). Expérimentalement, l'EEL a été reproduite à partir d'aliment contaminé, par contact entre animaux et par inoculation de broyats intestinaux ou pulmonaires (BEZILLE, communication personnelle, LE GALL *et al.*, 1998, LICOIS, 1998). Nous avons également montré que la reproduction expérimentale de l'EEL chez des lapins EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) se traduisait par une morbidité et un taux de mortalité faible (10-15% en moyenne, jusqu'à 20-25% dans le meilleur des cas) alors que la mortalité chez des lapins conventionnels était supérieure à 60% (LICOIS, 1998). Pourtant la reproduction expérimentale de la maladie dans un modèle EOPS est primordiale pour éviter toute interférence avec d'autres pathogènes que celui étudié et recherché. Nous avons donc cherché à améliorer la réponse des lapins EOPS à un inoculum qui reproduit le tableau clinique de l'EEL. Cet

article décrit les résultats de reproduction expérimentale de l'EEL après induction d'une immunodépression.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Soixante-quatre lapins néo-zélandais blancs (souche INRA A1077), âgés de 4, 5 et 6 semaines au moment de leur mise en place, ont été utilisés. L'effectif a été réparti en 2 lots égaux comportant 6 lapins de 6 semaines, 6 de 5 semaines et 20 de 4 semaines. L'un des lot a été traité par un corticoïde (lot TC) et l'autre a reçu de l'eau physiologique (lot NT). Les lapins ont été pesés 3 fois par semaine. La diarrhée et la mortalité ont été enregistrées quotidiennement. Tous les lapins morts ont été autopsiés. Ces animaux provenaient de l'élevage EOPS de notre laboratoire (COUDERT *et al.*, 1988). Ils sont indemnes de coccidies, d'helminthes, de *sarcoptes*, de pasteurelles, de *Clostridium spiroforme*, de *Clostridium piliforme* (*Bacillus piliformis*) ainsi que des sérogroupes connus des *Escherichia coli* entéropathogènes (O103, O128, O132, O109, O15....).

Immunodépression

Le protocole d'immunodépression a été adapté de ceux décrits pour le lapin par POLACK *et al.*, 1997 et par CERE, 1998. Les animaux ont reçu 3 injections intramusculaires de Dexalone (phosphate sodique de dexaméthasone - Coophavet, France), par semaine, sur une période de 19 jours précédant l'inoculation, une injection le jour de l'inoculation et une dernière injection, 2 jours après l'inoculation. La première administration a été effectuée à la dose de 5 mg/kg et les suivantes à la dose de 4 mg/Kg.

Inoculum

L'inoculum a été obtenu en mélangeant à volumes égaux les prélèvements provenant de 3 animaux EOPS, morts les 4^{ème} et 5^{ème} jours après une inoculation visant à reproduire l'EEL, lors d'une expérimentation précédente. Tous présentaient les signes cliniques caractéristiques de l'EEL. L'expérimentation correspondait au 4^{ème} passage sur animaux EOPS d'un inoculum initial ayant pour origine des lapins d'un élevage conventionnel. Chaque prélèvement a été traité de la façon suivante : prélèvement et pesée de l'ensemble intestin grêle-caecum-côlon, plein ; dilution au 1/3 en tampon phosphate pH 7,4 (PBS) ; broyage et tamisage sur maille de 0,5 mm ; congélation à -20°C jusqu'à utilisation. Tous les lapins ont reçu l'inoculum par sonde oesophagienne, à raison de 7 ml par animal.

RESULTATS

Effet de l'immunodépression seule

Compte tenu des effectifs, entre les 3 classes d'âge étudiées, aucune différence notable intra-lot « traités » d'une part et « non traités » d'autre part, n'a été observée. Aussi pour chaque lot, avons nous regroupé l'ensemble des données des lapins des 3 classes d'âge.

Aucune mortalité ni diarrhée, pour les 2 lots expérimentaux, n'ont été enregistrées pendant la période précédant l'inoculation. Cependant les doses élevées de dexaméthasone utilisées ont fortement ralenti la croissance des animaux traités (Figure 1). A début de l'expérimentation (soit 19 jours avant l'inoculation), le poids moyens des lapins était de 742 ± 197 g pour le lot TC et 756 ± 233 g pour le lot NT. Après 19 jours de traitement, le poids des lapins TC était de 24% inférieur à celui des animaux NT, soit 1088 ± 195 vs 1434 ± 255 g. Après 8 à 10 jours de

Figure 1. Evolution du GMQ chez des lapins traités ou non à la dexaméthasone et inoculés avec un broyat digestif induisant l'EEL (moyenne et écart type).

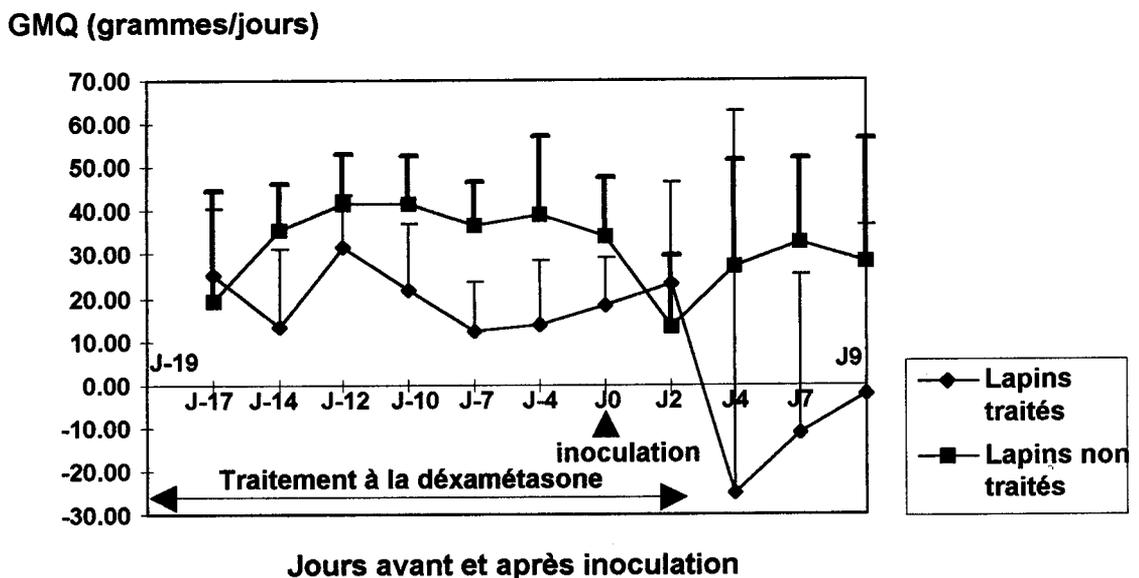


Tableau 1 : Evolution de la mortalité et des atteintes intestinales chez des lapins traités ou non à la dexamétasone et inoculés avec un broyat digestif induisant l' EEL.

Jours post inoculation	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9
<i>nombre de morts</i>	-	1	1	-	-	1	1	-
Lot NT		D+, EEL+ PC+, M++	D-, EEL+++ PC+++ , M-			D-, EEL +++ PC+++ , M-	D+, EEL++ PC+, M-	
<i>nombre de morts</i>	7	2	5	1	-	1	2	1
Lot	D-, EEL+++ PC-, M+	D++, EEL+++ PC-, M-	D++, EEL+++ PC-,M-	D++, EEL+++ PC+++ , M-		D+, EEL+++ PC+++ , M+++	D+, EEL- PC++, M++	D+, EEL- PC+++ , M++
	D-, EEL+++ PC++, M-	D+, EEL+++ PC+, M+++	D-, EEL+++ PC-, M-				D++, EEL+++ PC+++ , M-	
	D-, EEL+++ PC+, M-		D+, EEL+++ PC+, M+++					
TC	D- EEL+++ PC+++ , M-		D++, EEL- PC-, M-					
	D-, EEL++ PC+++ , M-		D+, EEL+++ PC-, M+++					
	D-, EEL- PC++, M+							
	D-, EEL- PC+++ , M+++							

D diarrhée, EEL : dilatation de tous les segments intestinaux, absence d'inflammation macroscopiquement visible

PC : parésie caecale (assèchement du contenu caecal), M : présence de mucus dans le côlon.

-, +, ++, +++ : absence ou présence, avec une intensité plus ou moins forte du phénomène observé.

traitement, nous avons pu constater également des modifications macroscopiques du pelage (poils ternes, cassants...), chez les animaux ayant reçu la dexamétasone.

Effet de l'inoculation

Mortalité, diarrhée, lésions d'EEL.

Le lendemain de l'inoculation, pour chacun des 2 lots, trois animaux apparemment sains, ont été abattus. Aucune anomalie lésionnelle n'a été observée pour les 3 lapins du lot NT. A l'inverse un des trois lapins TC présentait déjà des lésions caractéristiques de l'EEL, à un stade initial (moins prononcé que sur des animaux morts plus tardivement). L'aspect du tube digestif paraissait normal chez les deux autres lapins. Les trois animaux du lot TC présentaient une atrophie importante de l'appendice vermiforme par comparaison avec celui des lapins du lot NT.

La mortalité a réellement débuté à J2 pour le lot TC et à J3 pour le lot NT mais elle a été surtout considérable entre J2 et J4 pour les lapins ayant reçu la dexamétasone (Tableau 1). Elle s'est ensuite étalée jusqu'à J9, date à laquelle l'expérimentation a été arrêtée. Dans le lot TC,

65,5% des lapins sont morts dont 74 % avec les signes cliniques typiques de l'EEL contre 13,8% dans le lot NT, tous avec des lésions d'EEL. Les lapins abattus à J1 ont été exclus dans ce calcul. La diarrhée, le développement d'une parésie caecale ou la présence de mucus semblent se manifester de manière aléatoire mais il convient de souligner qu'aucun des lapins morts à J2 n'était atteint de diarrhée. Tous les lapins morts présentaient une atrophie de l'appendice vermiforme, dans le lot TC. Pour l'ensemble des deux lots aucune lésion caractéristique correspondant à des infections bactériennes ou parasitaires connues chez le lapin n'ont été observées. Les contrôles parasitaires, les seuls qui ont été réalisés pour le moment, se sont révélés négatifs.

Croissance

Après l'inoculation, le poids des lapins non traités croît très faiblement pour atteindre 1515±262 g à J9. Ceci s'explique par une altération du gain de poids moyen quotidien (GMQ), notamment à J2 (Figure 1). Pour les animaux traités, le poids moyen reste stable de J2 à J9 à

environ 1135 g en raison d'un GMQ qui chute de façon importante à J4 et reste négatif jusqu'à J9 (Figure 1).

DISCUSSION

La pathologie intestinale est sans conteste la principale cause de mortalité et de morbidité chez le lapereau en croissance. Une pathologie digestive apparemment nouvelle est apparue fin 1996 - début 1997 dans les élevages rationnels, d'abord dans l'ouest de la France puis a diffusé rapidement vers les autres régions françaises (DUVAL, 1998). Simultanément cette pathologie a fait son apparition dans la plupart des pays d'Europe. Caractérisée par des signes cliniques et des symptômes spécifiques, elle se différencie des autres maladies atteignant le tube digestif (colibacillose, clostridiose, coccidiose...). Par contre elle présente de nombreuses similitudes avec une pathologie décrite antérieurement sous les vocables d'entérite mucoïde ou d'entéropathie mucoïde (MUIR, 1943 ; HURT, 1949 ; HAGEN, 1956 ; VAN KRUNINGEN et WILLIAMS, 1972). Selon ces auteurs ces affections pouvaient décimer un nombre important d'animaux, en particulier en Grande Bretagne et aux États-Unis, pratiquement les seuls pays où cette maladie a été étudiée, avec la Hongrie (VETESI, 1970). Les différents auteurs ont décrit notamment, une mortalité élevée avec une expression forte de la maladie entre les âges de 7 et 10 semaines, une soif importante des animaux, la distension de l'abdomen et la dilatation de tout le tractus digestif, la parésie caecale dans certains cas et bien sûr l'émission de mucus. Il n'y a pas de modification de la température corporelle. L'absence de lésions macroscopiques et histologiques, en dehors d'une hyperplasie des cellules à mucus le long de l'intestin grêle, est également un élément souligné par VAN KRUNINGEN et WILLIAMS (1972). C'est pourquoi la terminologie d'entéropathie mucoïde est de préférence utilisée à celle d'entérite mucoïde du fait qu'il n'y a pas d'inflammation visible de l'intestin (FLATT *et al.*, 1974). La différence réside dans le caractère sporadique des cas décrits alors que l'EEL qui sévit en Europe depuis près de deux ans correspond à une véritable épizootie. Il est cependant vrai que les conditions de productions cunicoles et les circuits de commercialisation ne sont plus comparables.

Dans l'état actuel des connaissances le seul moyen de d'étudier la maladie passe par la reproduction expérimentale sur animaux. L'utilisation de lapins EOPS constitue un outil de choix pour s'affranchir des interférences dues aux agents potentiellement pathogènes présents chez des lapins conventionnels. Or, les résultats antérieurs obtenus avec des lapins EOPS, ont montré que le taux moyen de mortalité se situait entre 10 et 15% (LICOIS, 1998) et que le pourcentage d'animaux malades n'était guère plus élevé. Ceci signifie qu'il aurait fallu travailler sur des effectifs importants pour disposer de matériel biologique permettant différentes études comme la purification de l'agent pathogène et pour constituer des inoculum nécessaires aux protocoles de reproductions expérimentale.

Afin d'augmenter la réponse des animaux nous avons induit avant inoculation, une forte immunodépression à l'aide de dexaméthasone, chez des lapins EOPS. L'action du

seul traitement s'est traduit au moins par deux phénomènes : d'une part par une réduction importante de la croissance et d'autre part par une atteinte des organes lymphoïdes, comme l'a révélé l'atrophie de l'appendice vermiforme des animaux traités. Selon POLACK (communication personnelle), les protocoles d'immunisation utilisant le même corticoïde entraînent chez le lapin, une lymphopénie, une régression du thymus, une réduction du poids de la rate et une absence de réponse aux lymphocytes T lors de tests de transformation lymphoblastique à l'aide de concanavale A ou de phytohématagglutinine. Soulignons qu'aucune mortalité consécutive à l'immunodépression n'a été observée lors de protocoles similaires employés à plusieurs reprises sur des lapins EOPS de même origine (CERE, 1998). Ces auteurs ont aussi noté des modifications touchant le pelage. Après inoculation, l'effet le plus spectaculaire est l'incidence du traitement immunodépresseur sur le taux de mortalité et aussi sur la cinétique de la maladie. Dans le lot NT, on assiste à une altération du GMQ observable surtout à J2, ce qui est conforme aux données antérieures obtenues chez des lapins EOPS non traités (LICOIS, 1998). Nous retrouvons également un taux de mortalité classique, voisin de 15% chez des lapins EOPS témoin, celle-ci débutant vers les 3-4^{ème} jours après l'inoculation. Dans le lot TC, la mortalité est supérieure à 65% et débute dès J2, avec d'emblée 24% de morts ce jour là. Des lésions d'EEL sont même décelables chez les animaux traités, dès J1.

Les études bactériologiques sont en cours mais la rapidité d'évolution de la maladie ainsi que l'absence de signes inflammatoires spécifiques des affections bactériennes propres aux lapins, confortent l'hypothèse virale. D'un point de vue méthodologique, l'augmentation du nombre d'animaux répondant positivement à l'inoculation laisse entrevoir des perspectives de travail plus développées : constitution d'un inoculum de référence, mise en oeuvre de techniques de purification, recherche du ou des agents pathogènes.

Remerciements : Nous tenons à remercier P. Hervouet, et P. Robart qui nous ont gracieusement fourni l'inoculum initial, Y Breuzin et A Francineau pour le maintien et la production des animaux EOPS dans un environnement devenu à haut risque, et M. Dupuis pour son assistance technique.

Reçu : 2 décembre 1998.

Accepté : 7 décembre 1998.

REFERENCES

- CERE N., 1998. Etude de la primo-infection à *Pneumocystis carinii* chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) : développement parasitaire et transmission. Thèse Université F. Rabelais Tours. Fev. 1998, 125 p.
- COUDERT P., LICOIS D., BESNARD J., 1988. Establishment of a Specified Pathogen Free breeding colony (SPF) without hysterectomy and hand-rearing procedures. In: *Proceedings of*

- the 4th Congress of the World Rabbit Science Association, (S. HOLDAS ed.), October 10-14, Budapest, RCPAN, Herceghalom, Hungary, 137-148.
- COUDERT P., LEBAS F., LICOIS D., 1997. Une Nouvelle pathologie ravage les élevages. La profession se mobilise. *Cuniculture*, **24**, 225-229.
- DUVAL M.L., 1998. Développement de l'entérocologie en France. In : 7^e Journées de la Recherche Cunicole en France. Lyon, 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : l'Entérocologie Epizootique. Ed. ITAVI, Paris, 1-8.
- FLATT R.E., WEISBROTH S.H., KRAUS A.L., 1974. Metabolic, Traumatic, Mycotic and Miscellaneous Diseases of rabbits. In: *The biology of the laboratory rabbit* (Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL, ed), Academic Press, New York and London. 435-451.
- HAGEN K.W., 1956. Infectious diseases of the rabbit. In: *Animal Disease, Yearbook of Agriculture. US government Printing Office, Washington D.C.*, 562-563.
- HURT L.M., 1949. In : Annual Report. Los Angeles County Livestock Department. Los Angeles, California, pp 97.
- LEBAS F., 1998. Entérocologie Epizootique et alimentation du lapin. In : 7^e Journées de la Recherche Cunicole en France. Lyon, 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : l'Entérocologie Epizootique. Ed. ITAVI, Paris, 9-12.
- LEBAS F., COUDERT P., 1997. Entérocologie : les données récentes. *Cuniculture*, **24**, 269-272.
- LE GALL G., MORISSE J.P., PICAULT J.P., ALLEE C., LE BIHANNIC P., COLIN P., 1998. Essais de reproduction expérimentale de l'Entérocologie Epizootique du Lapin (EEL). In : 7^e Journées de la Recherche Cunicole en France. Lyon, 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : l'Entérocologie Epizootique. Ed. ITAVI, Paris, 13-19.
- LICOIS D., 1998. Bilan des travaux réalisés à l'INRA, sur l'Entérocologie Epizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale. In : 7^e Journées de la Recherche Cunicole en France. Lyon, 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : l'Entérocologie Epizootique. Ed. ITAVI, Paris, 20-26.
- MUIR R., 1943. The problems of backyard of poultry and rabbits. *Vet Rec.*, **55**, 87.
- POLACK B., CERE N., LE RHUN D., GUILLOT J., CHERMETTE R., 1997. Cultivation of Rabbit *Pneumocystis carinii* on cell derived from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Euk Microbiol.* **44**, 22S.
- VAN KRUIJNINGEN J.H., WILLIAMS C.B., 1972. Mucoïd enteritis of rabbits; Comparison to cholera and cystic fibrosis. *Vet. Pathol.*, **9**, 53-77.
- VETESI F., 1970. A nyúl un mucoïd enteritisen (coli-enterotoxemiaga). *Magy. Allatorv. Lapja*, **25**, 464-471.
- WYERS M., 1998. Trois questions à propos de l'histopathologie de l'entérocologie du lapin. Interview de V. Dedet. *La semaine vétérinaire*, 9 mai 1998.
- Site Web consulté : <http://www.rabbit-science.com> : Rubrique Informations générales sur le lapin/ Entérocologie du lapin.