

**MUTANTS DU « LOCUS D'EFFACEMENT
DES ENTEROCYTES » (LEE)
DANS LA VACCINATION
CONTRE LA COLIBACILLOSE
O103 DU LAPIN**

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

Karine, Sylvie GRANGE

Née, le 27 Septembre 1972 à ISSY-LES-MOULINEAUX (Hauts-de-Seine)

Directeur de Thèse : M. le Professeur Alain MILON

JURY

PRESIDENT :

M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Alain MILON

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Jean EUZEBY

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A notre président de thèse,

M. le Professeur Henri Dabernat
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Bactériologie-Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

M. le Professeur Alain Milon
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie générale, Microbiologie et Immunologie

Que nous remercions pour l'aide apportée dans l'accomplissement de ce travail.
Sincère reconnaissance.

M. le Professeur Jean Euzéby
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie générale, Microbiologie et Immunologie

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.
Sincères remerciements.

A mes parents,

pour tout l'amour et le soutien que vous avez su m'apporter et qui ont contribué à ce que je suis devenue aujourd'hui. En espérant vous apporter autant.

Tout mon amour et ma profonde affection.

A mon frère,

A nos rires et nos disputes, pour m'avoir supportée tant d'années et tant apporté. je ne t'oublie pas même par delà les frontières.

Avec toute mon affection.

A toute ma famille, à ceux qui aujourd'hui ne sont plus là...

Malgré de trop rares retrouvailles, je ne vous oublie pas.

Avec toute mon affection.

A Guillaume,

En te remerciant de ta collaboration à ce travail ...et surtout de partager aujourd'hui ma vie.

Avec tout mon amour, à nos projets ensemble.

A Béatrice et Laurent, Florence et Nicolas, Céline et Sébastien, JJ et Cathy, François, Louis,

Qui, du lycée à aujourd'hui, ont su m'accepter telle que je suis et me soutenir dans les moments difficiles. A toutes nos soirées, passées et à venir...

Avec ma profonde amitié.

A Mathilde, Claire et Céline,

A toutes nos soirées, nos rires et nos « coups de gueule », nos voyages... sans vous ces études n'auraient pas eu la même saveur. A nos retrouvailles futures.

Toute mon amitié.

A Christelle, Christine et Vincent, au « Speedy Rock »

A nos folles soirées passées et j'espère futures... parce que la vie est plus belle en dansant.

Avec toute mon amitié

A Cookie,

Toi qui m'a quittée trop tôt, merci de m'avoir accompagnée pendant toutes ces années.

Merci de tes ronronnements et câlins généreux.

A tous ceux que j'oublie, qui ont un jour croisé ma route et ont sans aucun doute contribué à ce que je suis devenue,

Je vous dédie ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	19
<u>INTRODUCTION</u>	21
<u>PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	23
I) Physiologie digestive du lapin et classification des <i>E. coli</i> entéropathogènes	25
A) Le lapin : un système digestif complexe	25
A-1) Particularité digestive : caecum et caecotrophie	25
A-2) Flore digestive : un équilibre précaire	25
a) Implantation et localisation	27
b) Prédominance d'une flore anaérobie	27
c) Flore colibacillaire	28
A-3) Fragilité du lapin en élevage	28
B) Les différentes classes d' <i>E. coli</i> entéropathogènes	29
B-1) Première approche : sérotypage et biotypage	29
B-2) ETEC ou <i>E. coli</i> EntéroToxinogènes	32
B-3) EIEC ou <i>E. coli</i> EntéroInvasifs	33
B-4) EHEC ou <i>E. coli</i> EntéroHémorragiques	34
B-5) EAggEC ou <i>E. coli</i> EntéroAggrégants	34
B-6) EPEC ou <i>E. coli</i> EntéroPathogènes	34
II) La colibacillose du lapin	38
A) Souche RDEC-1 : première mise en évidence d'une étiologie EPEC	38
B) <i>E. coli</i> O103 : H2 : confirmation et virulence d'une EPEC chez le lapin	40
B-1) Confirmation de la pathogénicité	40
B-2) Incidence en élevage	41
B-3) Tableau clinique et lésionnel	42
B-4) Facteurs de virulence et déterminisme génétique	45

III) Application à la vaccination	46
A) Vaccination des mères avec un vaccin tué	47
B) Vaccination des lapereaux par voie intradermique	47
C) Vaccination des lapereaux <i>per os</i>	48
C-1) Protocoles expérimentaux utilisant la souche sauvage B10	
Protocole de base : administration pendant 10 jours après le sevrage	48
C-2) Administration pendant 4 ou 6 jours	49
D) Vaccination par des souches vivantes	49

DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES **51**

I) Matériel	53
A) Les lapins	53
B) Les souches bactériennes	53
B-1) Souche sauvage	53
B-2) Souche mutée	54
a) Caractéristiques	54
b) Obtention du mutant	55
C) Matériel de laboratoire	56
C-1) Pour les cultures bactériennes	56
C-2) Coloration	57
C-3) Recherche d'ookystes coccidiens	57
C-4) Matériel utilisé pour le suivi des animaux	57
II) Méthodes	58
A) Protocole de vaccination	58
B) Suivi clinique	59
C) Suivi bactériologique	59
C-1) Numération colibacillaire	59
C-2) Identification d'isolats colibacillaires	60
D) Suivi parasitologique	62
D-1) Recherche d'ookystes coccidiens	62
D-2) Recherche de <i>clostridium spiroforme</i>	62
E) Suivi immunologique	62

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION	65
I) Résultats cliniques	67
II) Résultats bactériologiques	68
III) Résultats parasitologiques	71
IV) Résultats immunologiques	72
DISCUSSION	75
CONCLUSION GÉNÉRALE	79
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83/92

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Vue schématique des viscères de lapin	26
Figure 2 :	Principales phases de la digestion	26
Figure 3 :	Représentation de l'adhésion des EPEC aux villosités (Milon, 1993)	36
Figure 4 :	Lésions de colibacillose avec typhlite hémorragique	43
Figure 5 :	Lésions de colibacilloses avec foyers nécrotiques hépatiques	43
Figure 6 :	Représentation schématique des gènes de virulence des <i>E. coli</i> O103	54
Figure 7 :	Schématisation du protocole de vaccination et du suivi bactériologique, immunologique et parasitologique	58
Figure 8 :	Protocole de dilution pour la numération colibacillaire	60
Figure 9 :	Protocole d'agglutination rapide sur lame	61
Figure 10 :	Principe de mesures de DO par la méthode ELISA	64
Figure 11 :	Courbes pondérales des lots témoins et vaccinés	68
Figure 12 :	Histogrammes des populations colibacillaires des lots témoins et vaccinés	69/70
Figure 13 :	Cinétique des anticorps pour les lots témoins et vaccinés	73
Figure 14 :	Mutants d'effecteurs E22	78
Figure 15 :	Schéma de diffusion des souches d' <i>E. coli</i> O103 dans les élevages (Milon, 1993)	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Principaux sérogroupes EPEC humains	30
Tableau 2 :	Principaux groupes d' <i>E. coli</i> impliqués dans des syndromes diarrhéiques humains (Levine, 1987 ; Boedecker et Sherman, 1986 ; Licois D., 1992)	31
Tableau 3 :	Comparaison phénotypique de la souche sauvage B10 et du mutant CA1/B10	55
Tableau 4 :	Relevés cliniques observés après vaccination par la souche CA1/B10	67
Tableau 5 :	Nombre de coccidies	71

INTRODUCTION

La cuniculture est un secteur d' élevage particulier qui a dû faire face depuis quelques années à une modification de ses pratiques; la production traditionnelle a peu à peu laissé la place à des productions rationnelles mieux adaptées.

Actuellement elle se situe au quatrième rang mondial derrière la Chine (329 000 tonnes), l' Italie (221 000 tonnes) et l' Espagne (145 000 tonnes). La production en 2000 est estimée entre 82 000 et 84 000 tonnes en baisse depuis 1999 (Braine A., 2002). La concentration de cette production se situe dans le Grand Ouest de la France.

Les élevages cunicoles tendent vers une production de plus en plus remarquable par une vitesse de rotation rapide: le cycle est court, la prolificité élevée et le renouvellement des reproducteurs fort (Boucher S. et Nouaille L., 2002).

Cette forte pression associée au confinement des animaux favorise l' émergence de pathologies majoritairement digestives en période d' engraissement.

Dès le début des années 1980, des entérites dues à des souches colibacillaires hautement pathogènes provoquent une morbidité et une mortalité dépassant parfois 50 % chez les lapins sevrés (Camguilhem, 1985). Ces répercussions économiques sévères, par le biais de perte de poids, de retard de croissance et de mortalité ont bien évidemment suscité l' intérêt de nombreuses études, révélant ainsi sa réelle causalité dans les affections digestives.

En France les souches du sérotype O103 appartenant aux EPEC prédomine et révèle une forte résistance aux antibiotiques.

La connaissance toujours plus approfondie des facteurs de virulence de ces souches permet d' entrevoir une alternative intéressante pour juguler ces affections sérieuses par la vaccination.

Notre travail propose de tester une souche sauvage génétiquement modifiée et rendue ainsi non pathogène dans le cadre d' un protocole vaccinal et de juger des perspectives offertes.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Nous rappellerons tout d'abord succinctement les particularités de la flore digestive du lapin afin de mieux appréhender la complexité et par là-même la sensibilité de cette espèce aux pathologies digestives.

Nous poursuivrons en distinguant les différentes classes d'*Escherichia coli* entéro-pathogènes associées à leurs facteurs de virulence en nous attardant plus particulièrement sur le groupe des EPEC incriminé dans la colibacillose O103 du lapin.

Nous détaillerons ainsi sa pathogénicité et les bases génétiques sur lesquelles se sont fondés les différents essais vaccinaux contre cette maladie.

Nous présenterons ensuite les différentes avancées dans le domaine vaccinal contre la colibacillose O103, étapes essentielles à l'élaboration de notre travail.

En dernière partie, nous développerons les résultats de notre travail concernant les essais vaccinaux contre la colibacillose O103 par des souches mutées vivantes.

I) PHYSIOLOGIE DIGESTIVE DU LAPIN ET CLASSIFICATION DES E. COLI ENTEROPATHOGENES :

A) LE LAPIN : UN SYSTEME DIGESTIF COMPLEXE :

A-1) Particularité digestive : cæcum et cæcotrophie

Le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est un mammifère herbivore non ruminant qui se distingue par des particularités anatomiques, marquées par un cæcum important, et biologiques, marquées par l' ingestion de ses crottes molles ou cæcotrophie (Figures 1 et 2).

Son grand cæcum contient une population de micro-organismes qui utilisent au mieux les nutriments fournis par sa ration. Outre la synthèse et l'absorption d'acides gras volatiles (AGV) issus des fermentations bactériennes, le lapin a trouvé une méthode astucieuse pour recycler une partie des nutriments non utilisés en pratiquant la cæcotrophie qui consiste à consommer ses fèces molles (cæcotrophes) directement prélevées à l'anus et émises préférentiellement le matin (Sandford, 1996).

Si cette singularité permet une utilisation optimale de la ration alimentaire, on est en droit de penser que cette pratique favorise l'entretien de flores bactériennes entéropathogènes, et donc, la pérennité voire la dissémination de ces infections entre congénères et notamment de la mère à ses petits (Milon, 1993).

A-2) Flore digestive : un équilibre précaire

Le tractus digestif du lapin peut être partagé en quatre segments : estomac, intestin grêle, cæcum et colon. Chaque segment joue un rôle particulier dans la digestion et l'assimilation des nutriments expliquant la répartition de la flore.

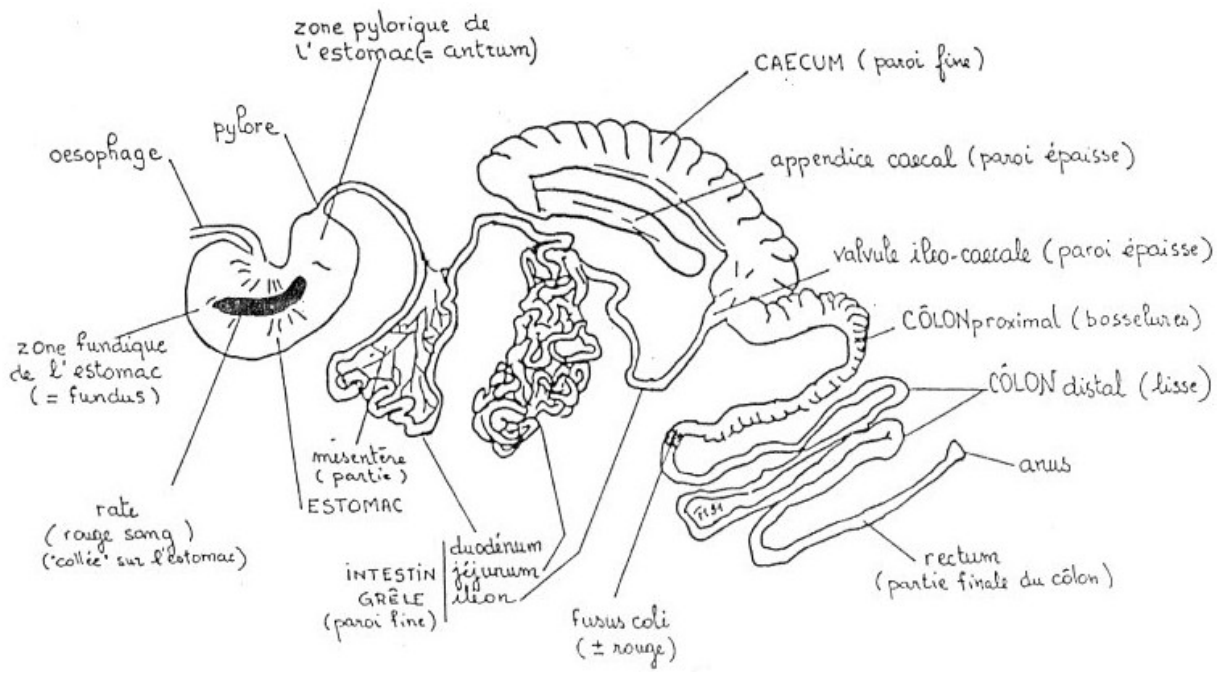


Figure 1 : vue schématique des viscères de lapin (LEBAS F., INRA Toulouse)

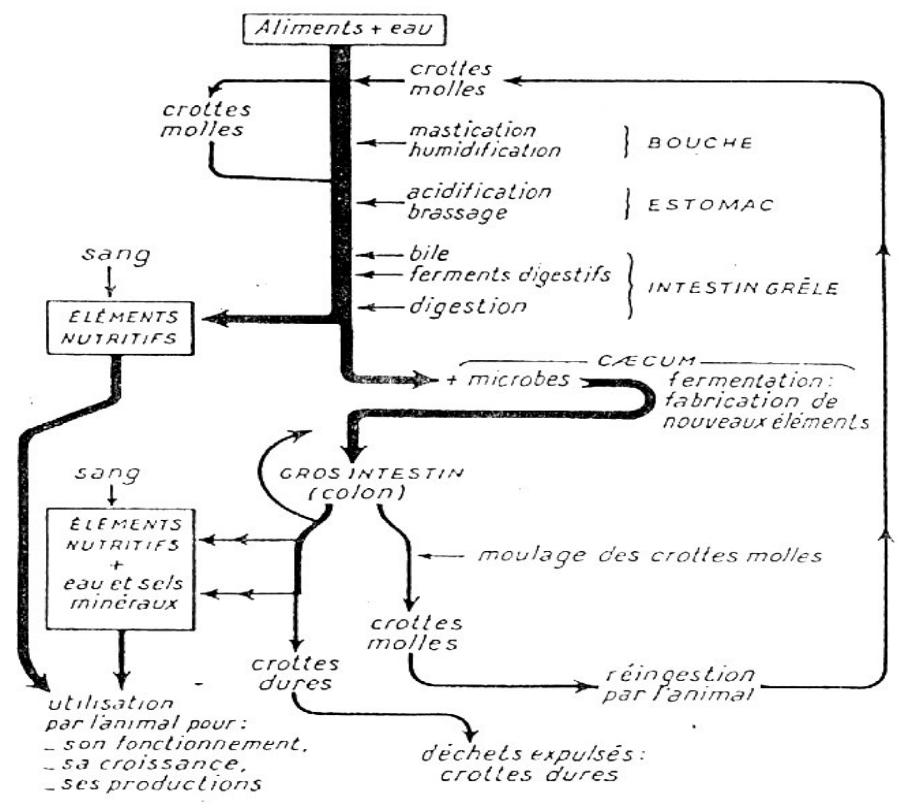


Figure 2 : Principales phases de la digestion

a) Implantation / localisation :

L'estomac présente un profil de colonisation variant individuellement mais, dans tous les cas, le nombre total de bactéries reste faible n'excédant jamais $10^4 - 10^6$ bactéries / g de contenu.

La colonisation de l'intestin grêle par les bactéries est plus rapide et plus abondante que dans l'estomac, les populations de la flore se stabilisant au sevrage entre $10^6 - 10^8$ bactéries / g de contenu.

Le cæcum et le colon présentent rapidement une flore abondante ($10^7 - 10^9$ / g de contenu) qui se maintiendra à des valeurs élevées ($10^9 - 10^{10}$ / g de fèces) tout au long de la vie de l'animal (Gouet et Fonty, 1973 ; Gouet et Fonty, 1979).

b) Prédominance d'une flore anaérobie :

La flore digestive du lapin est originale et se caractérise par la nette prédominance de bactéries anaérobies strictes non sporulées, Gram négatif, tels que *Bacteroides* et *Fusobacterium*, présents dans l'ensemble du tractus digestif. Ce phénomène est sans doute lié à la cæotrophie.

Les bactéries anaérobies sporulées, appartenant au genre *Clostridium*, sont présentes en quantité 100 à 1000 fois inférieure à *Bacteroides*.

Les lactobacilles sont toujours absents de l'intestin du lapin.

Les streptocoques (*Streptococcus faecalis* et *S. faecium*) sont presque toujours absents de l'estomac alors qu'ils colonisent régulièrement l'intestin grêle, le cæcum et le colon en quantité élevée dès la première semaine de vie.

Puis leur répartition devient plus irrégulière pour n'atteindre au sevrage que des populations de $10^2 - 10^4$ / g de contenu (Gouet et Fonty, 1979 ; Brugère-Picoux, 1995 ; Matthes, 1969 ; Milon A., 1993).

c) Flore colibacillaire :

Les entérobactéries, principalement représentées par *Escherichia coli*, sont généralement absentes chez les lapereaux nouveaux-nés. Puis leur nombre croît pour atteindre un maximum (10^7 / g de contenu caecal) peu avant le sevrage (soit 21 jours) avant de décroître rapidement pour se stabiliser à des populations de 10^4 / g de fèces après le sevrage.

Ces particularités anatomiques, digestives et biologiques font du lapin une espèce sensible à toute perturbation qui pourrait générer des troubles digestifs.

A-3) Fragilité du lapin en élevage :

Les lapereaux sevrés, après avoir vécu avec leur mère, passent en engraissement et se trouvent alors exposés à divers dérèglements digestifs dont les causes s'expriment seules ou de façon associée (Renault *et al.*, 1979).

Les diarrhées du lapin sevré sont plurifactorielles et la grande "émotivité" du lapin rend chaque stress potentiellement initiateur d'un dérèglement digestif.

Les causes de ce dysfonctionnement peuvent être non spécifiques (transport, nutritionnelles, zootechniques) ou spécifiques (antibiotiques, bactériennes, virales, parasitaires (coccidies)) isolées ou associées (Prescott J.F., 1978a et b). Il en résulte un déséquilibre de la flore caecale usuelle et un arrêt des habitudes, telle que la cæotrophie, créant ainsi un terrain favorable au développement de diarrhées colibacillaires ou autres (Licois D., 1986). Sous l'influence de ces facteurs secondaires, des bactéries du tube digestif physiologiquement présentes en faible quantité peuvent alors se multiplier et envahir l'organisme (Matthes, 1995).

On parle ainsi parfois de "complexe entéritique" ou "dysentérie" (Percy DH *et al.*, 1993).

Si pendant longtemps les colibacilles n'ont pas été considérés comme agents pathogènes vrais, il avait pourtant été noté que les numérations colibacillaires augmentaient fortement lors de pathologie digestive soulignant ainsi leur participation active au processus et dans tous les cas leur qualité de marqueurs de désordres intestinaux.

Des études plus poussées et surtout la reproduction expérimentale de colibacillose par certaines souches, telles que les souches O15 et O103, ont permis d'affirmer définitivement leur extrême virulence et leur implication dans les diarrhées sévères touchant les lapins sevrés et de déterminer la classe à laquelle elles appartiennent.

B) LES DIFFERENTES CLASSES D' E. C OLI ENTEROPATHOGENES :

Cette partie nous permet de faire le point sur les connaissances actuelles des *E. coli* responsables de diarrhée et leurs facteurs de virulence.

B-1) Première approche : sérotypage et biotypage

En 1885, Theodor Escherich isole un micro-organisme, *Bacterium coli commune*, aujourd'hui connu sous le nom d'*Escherichia coli*.

Ce bacille Gram négatif aéro-anaérobie facultatif, mobile ou non, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* est reconnu comme pouvant engendrer de sérieux troubles intestinaux tant chez l'homme que chez les animaux, la classification ayant de nombreux recoupements dans les deux espèces.

Le sérotypage, selon le schéma de Kaufmann (1947), est fondé sur les distinctions antigéniques exprimées par la bactérie et se décline comme suit :

AgO ou **somatiques** : il s'agit d'un lipopolysaccharide localisé dans la paroi (Ørskov et Ørskov, 1984) ; des réactions croisées entre *E. coli* et salmonelles ont été décrites.

AgK ou **capsulaires** : par exemple, K88 (F4) du porc ou K99 (F5) du veau (Ørskov, 1970). La majorité des souches colibacillaires en sont dépourvues (Ørskov, 1984).

AgH ou **flagellaires** : présents uniquement chez les bactéries mobiles.

Le biotypage, examinant les propriétés de fermentation des sucres ou d'autres substrats, est un complément intéressant pour différencier les souches colibacillaires (Camguilhem et Milon,

1989 ; Okerman et Devriese, 1985 ; Peeters *et al.*, 1988). Une corrélation positive est notée entre biotype et pathogénicité.

Tous ces sérogroupes et biovars ont été réunis par Neter, 1955 (cité par Levine M.M., 1987) sous le terme général d' *E. coli* entéropathogènes (tableau 1).

Toutefois le pouvoir pathogène n' est pas nécessairement ni directement lié à la possession de ces antigènes. Certaines souches expriment leur virulence en produisant des exotoxines ou en possédant d' autres facteurs de virulence.

L' exploration et la découverte de ces facteurs marquent une étape essentielle en proposant un schéma de classification des colibacilles plus cohérent basé sur leur mécanisme d' action, c'est-à-dire sur la notion de pathovar (variété pathogène d' *E. coli*).

Ce schéma, tout d' abord appliqué aux souches colibacillaires humaines, fut adapté aux souches animales en raison de leurs nombreuses similitudes.

Cinq groupes (pathovars) sont aujourd' hui reconnus chez les *E. coli* responsables de diarrhées (Levine, 1987) : les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroragrégatifs (EAggEC) et les *E. coli* entéropathogènes (EPEC).

Ces groupes sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 1 : Principaux sérogroupes EPEC humains

Principaux sérogroupes O d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC)	Référence
Classe I (adhésion localisée aux cellules Hep-2, EAF+) O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142	(Levine, 1987)
Classe II (adhésion diffuse ou pas d' adhérence aux Hep 2, EAF-) O18,O44, O112, O114	
Sérovars (O:H) les plus communs chez les EPEC	
O55:H6, O55:H7, O86:H2, O111:H2, O111:H12, O125:H21, O127:H21	(Ørskov, cité par Edelman et Levine, 1983)
O55:H6, O55:H7, O86:H2, O86:H34, O111:H2, O111:H12, O111:H21, O119:H6, O125:H21, O126:H27, O127:H9, O127:H21, O128:H2, O128:H7, O128:H12	(Sansonetti, 1985)

Tableau II : Principaux groupes d' *E. coli* impliqués dans des syndromes diarrhéiques humains (Levine, 1987, Boedecker et Sherman, 1986, Licois D, 1992)

Groupes	Propriétés caractéristiques des souches
EPEC (<i>E. coli</i> entéropathogènes)	<ul style="list-style-type: none"> - Sérogroupes et sérovars typiques (tabl. 1) - Pas de production d' entérotoxines LT et ST - Pas d' invasivité de type "Shigella" - Attachement/effacement des microvillosités intestinales - Pas de production (ou faible synthèse) de toxines Shiga-like
ETEC (<i>E. coli</i> entérotoxigènes)	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion aux entérocytes par fimbriae (CFA/I à IV) - Production d' entérotoxines ST et/ou LT - Sérovars humains typiques : O6:H16, O8:H9, O15:H11, O25:H42, O78:H12, O120:H7, O120:H-, ...
EIEC (<i>E. coli</i> entéroinvasifs)	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmide de virulence (\approx 140 MDa) - Invasion et prolifération dans cellules épithéliales et en culture - Test de Sereny positif (inoc. conjonctive de cobaye) - Immobiles, lactose nég., LDC nég. - Sérogroupes humains typiques : O28ac, O112, O124, O136, O143, O144, O173
EHEC (<i>E. coli</i> entérohémorragiques)	<ul style="list-style-type: none"> - Forte production de toxines Shiga-like - Attachement-effacement des microvillosités intestinales - Sérovars typiques : O157:H7, O26:H11, O103:H2, O172:H? - Plasmide de virulence de \approx 60 MDa
EAggEC (<i>E. coli</i> entéroaggrégatifs)	<ul style="list-style-type: none"> -fort pouvoir aggrégatif adhérent aux cellules de type Hep-2 ou HeLa -synthèse possible d'une toxine de type LT, proche de l'hémolysine - sérovars humains typiques : O127a :H2, O77 :H8, O86 :H-, O126 :H27

B-2) ETEC ou *E. coli* entérotoxigènes:

L' émergence et l' intérêt porté aux souches ETEC remonte à la fin des années 1960 et le début 1970.

Ces souches sont fréquemment identifiées lors de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement mais également dans les pays industrialisés où elles touchent principalement l' adulte sous la célèbre "diarrhée du voyageur" ou "Tourista" (Gorbach *et al.*, 1975).

En médecine vétérinaire, les espèces bovines et porcines semblent majoritairement touchées mais leur implication a également été mise en évidence dans les diarrhées du chien (Drolet *et al.*, 1994).

Le diagnostic différentiel de ces souches au sein de la flore intestinale est relativement délicat et repose sur la mise en évidence de deux facteurs de virulence définis par Smith et Halls, 1967, à savoir :

- la possession de l' antigène représentant les adhésines fimbriaires (ex : K99 / veau, agneau, K88 / porc)
- la capacité de synthèse d' entérotoxines, distinguées en une entérotoxine thermostable (ST) et thermolabile (LT).

Les ETEC n' envahissent pas les entérocytes mais adhèrent à leur surface sans endommager les microvillosités intestinales. Les structures responsables de cette propriété ont fait l' objet de nombreuses études chez les animaux. Citons pour référence les facteurs K88 (F4) des souches porcines (Hohmann et Wilson, 1975), K99 (F5) et Att 25 (Fy) des souches bovines (Burrows *et al.*, 1976 ; Pohl *et al.*, 1983 et 1987), F41 (Moon HW *et al.*, 1983). Ces principaux antigènes correspondent à des structures fimbriaires codées par des opérons plasmidiques (Pohl, 1993).

La classification élaborée à partir de ces adhésines semble mieux corrélée aux sérotypes que celle issue de la combinaison de toxines (Mainil, 1993 ; Mainil *et al.*, 1995).

Les souches humaines expriment également des facteurs d' adhésion appelés CFA (Colonization Factors Antigen), distingués en CFA/I et CFA/II (Boedecker *et al.*, 1986).

D' autre part, les ETEC se caractérisent par la production d' entérotoxines spécifiques à l' origine des troubles hydroélectrolytiques responsables de la diarrhée.

Il s'agit de toxines thermolabiles (LT) et thermostables (ST), distinguées en STa et STb (Tzipori, 1985 ; Rose et al., 1987).

Des recherches vaccinales ont été entreprises avec notamment des essais de vaccination sur les mères par des souches courantes pour prévenir la colonisation du tube digestif par des souches sauvages virulentes (Tzipori, 1985 ; Levine, 1987) et ainsi prévenir les entérites néonatales via l'immunité colostrale.

B-3) EIEC ou *Escherichia coli* Entéroinvasifs:

En 1971, Du Pont *et al.* (cité par Levine, 1987) décrivent chez l'homme des souches colibacillaires responsables d'un syndrome dysentérique accompagné ou non d'émission de sang et de mucus. Ces souches partagent de nombreux points communs avec les souches *Shigella dysenteriae* (Levine, 1987 ; Lior *et al.*, 1994). Des réactions croisées existent entre ces deux bactéries.

Ainsi, elles possèdent toutes deux la faculté d'envahir les entérocytes du colon pour s'y multiplier entraînant éventuellement leur destruction mais ne produisent ni ST ni LT (Licois D., 1992).

Ces propriétés invasives mettent en jeu des gènes chromosomiques et plasmidiques (plasmide de 140 kDa) et représentent un bon moyen de diagnostic par la réalisation du test de Sereny (induction d'une kératoconjonctivite chez le cobaye pour détecter le caractère invasif des souches EIEC ou des *Shigella*).

D'autres systèmes, telle que la production d'aérobactine ont été notés chez ces souches colibacillaires (Pohl P., 1993).

Ces EIEC n'ont jusqu'à présent été isolés que chez l'homme et certains singes (Lior *et al.*, 1994).

B-4) EHEC ou *E. coli* Entérohémorragiques:

En 1982, des foyers de colite hémorragique éveillent l'attention des chercheurs et permettent d'isoler un nouvel agent pathogène appartenant au sérovar O157 : H7 qui sera par la suite rendu responsable de Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU) aux USA et au Canada (Riley et al., 1983).

Le sérotype O26 : H11, déjà étudié par Øskov en 1951, fit l'objet de nouvelles études qui confirmèrent son implication étiologique dans des diarrhées infantiles (Scotland *et al.*, 1990 ; Levine, 1987).

En raison de la similitude entre les souches humaines et animales, de nombreuses équipes ont évoqué l'hypothèse d'un réservoir animal, impliquant notamment les denrées, principalement le lait cru et la viande bovine mal cuite dans la transmission à l'homme (Cray *et al.*, 1996 ; Bettelheim KA., 1996 ; Nadeau M., 1993).

Ces souches EHEC ne produisent pas de ST ni de LT mais produisent à taux élevé des cytotoxines actives sur les cellules Vero et les cellules HeLa d'où leur nom de verotoxines (VT) ou Shiga-like Toxin (SLT) ; celles-ci, distinguées en VT1 et VT2, sont en effet immunologiquement proches de la toxine de Shiga, produite par *Shigella dysenteriae* de type I (Levine, 1987 ; Cryan, 1990).

Leur particularité réside également dans leur capacité à induire, comme les EPEC, des lésions d'attachement/effacement associées à la destruction de l'épithélium de surface et glandulaire. Cette propriété partagée avec les EPEC peut expliquer les confusions qui persistent parfois, comme ce fut le cas pour le sérotype O26 (Tzipori *et al.*, 1989).

B-5) EAggEC ou *E. coli* Entéroaggrégatifs:

C'est le groupe colibacillaire le plus récemment identifié (Levine, 1987) et qui se caractérise par un pouvoir adhérent aggrégatif aux cellules de type Hep-2 ou HeLa sans exprimer les autres facteurs de virulence décrits jusqu'à présents (toxines ou facteur d'adhésion).

Ces souches ont été isolées lors de diarrhées infantiles aiguës et persistantes dans les pays en voie de développement.

L'hypothèse avancée est que cette faculté de colonisation / adhésion, si elle est requise, ne peut à elle seule être à l'origine de ces diarrhées (Cohen *et al.*, 1993). Baldwin *et al.*, 1992 ont mentionné la production d'une toxine de type LT, non encore définie, antigéniquement proche de l'hémolysine colibacillaire.

D'autres études ont par la suite permis d'isoler une toxine thermostable (codée par un plasmide) distincte des toxines ST produites par les ETEC (Savarino *et al.*, 1991).

B-6) EPEC ou *E. coli* Entéropathogènes

La définition stricte de ce dernier groupe s'est affinée grâce à la détermination de ses facteurs de virulence principaux responsables de la formation de lésions d'attachement/effacement (Edelman et Levine, 1983 ; Okerman L., 1988)

Les EPEC ont été très tôt incriminées dans des diarrhées infantiles ou d'adultes dans les pays développés même si aujourd'hui leur prévalence a nettement diminué (Edelman et Levine, 1983 ; Milon, 1993).

Ces souches ont été définies à l'origine par la caractérisation de leur antigène somatique (AgO) et flagellaire (AgH) et l'absence d'antigènes capsulaires (AgK -) (Ørskov *et al.*, 1984).

Leurs propriétés biochimiques, notamment la capacité de fermentation ou non de certains substrats, définissent un biovar, élément souvent fortement corrélé à la pathogénicité des souches (Camguilhem et Milon, 1989).

En médecine vétérinaire, ces souches sont impliquées dans les phénomènes diarrhéiques de nombreuses espèces (bovine, porcine, canine, féline) (Janke *et al.*, 1989 ; Okerman L., 1987) et représentent chez le lapin la seule classe colibacillaire pathogène d'importance puisqu'elles sont responsables de 25 à 40% des pertes économiques en élevage (Gyles CL., 1994) en comparaison avec les autres pathologies digestives (coccidiose, maladie de Tyzzer, rotavirose) rencontrées.

Ces souches se singularisent par une non production de toxine (ST, LT ou SLT) et une non invasivité.

Notons toutefois que certaines études ont décelé des traces d'une toxine proche des SLT (Peeters et al., 1984a) et que certaines souches auraient montré des capacités d'invasivité (Donnenberg *et al.*, 1989 ; Donnenberg *et al.*, 1992), sans confirmation à ce jour.

En revanche, ces souches induisent des micro-lésions spécifiques appelées lésions d'attachement/effacement en adhérant étroitement à l'épithélium intestinal ("attachement"). Elles entraînent le plus souvent la destruction de la bordure en brosse des entérocytes ("effacement") (Figure 3). Cette particularité leur vaut parfois le nom de AEEC (Attaching – Effacing *E. coli*) (Levine M.M., 1987 ; Peeters *et al.*, 1985 ; Cantey et Blake, 1977 ; Moon *et al.*, 1983 ; Janke *et al.*, 1989 ; Licois D., 1992 ; Knutton S., 1994).

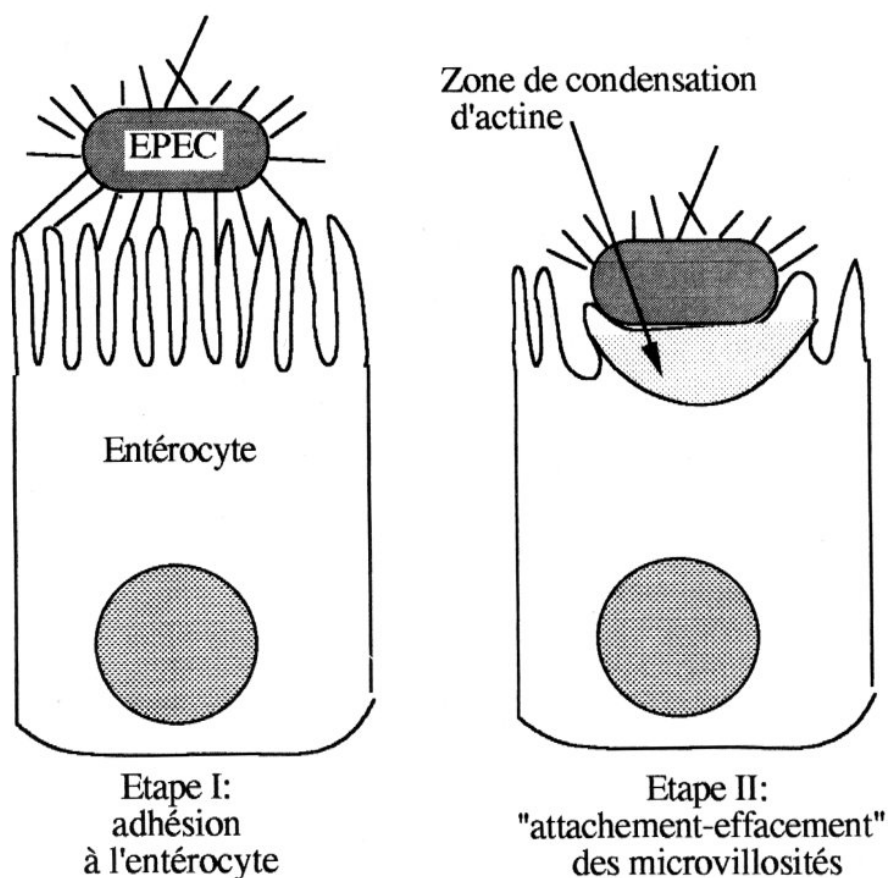


Figure 3 : représentation de l'adhésion des EPEC aux villosités intestinales (Milon, 1993)

Leur diagnostic se base sur cette particularité observée *in vitro* sur les cellules HeLa ou Hep-2 (Peeters J.E., 1993 ; Milon, 1993).

L'étude de cette interaction entre les entérocytes et les bactéries révèle deux phases (voir schéma d'adhésion) : tout d'abord un attachement initial de la bactérie aux cellules puis un effacement de la bordure en brosse avec un contact plus étroit permis par une intimine (Moon *et al.*, 1983 ; Knutton *et al.*, 1987 ; Tesh *et al.*, 1992). Ces lésions spécifiques d'attachement / effacement sont caractérisées par la formation d'un piédestal constitué d'actine où les bactéries sont fortement imbriquées et permettent un diagnostic par le test FAS (Fluorescent Actin Staining Test) (Knutton *et al.*, 1989).

De nombreuses études approfondissant la capacité d'adhésion aux cellules HeLa et HEp-2 ont démontré que les EPEC exprimaient leur adhérence soit de façon localisée (LA), c'est-à-dire formation de micro-colonies bactériennes focales (classe I) soit de façon diffuse (DA), c'est-à-dire sur l'ensemble de la surface cellulaire (classe II) (Benz *et al.*, 1990). Certaines souches n'appartenant pas aux sérovars classiques d'EPEC ont également présenté des adhésions de type localisé (Albert *et al.*, 1991).

Le phénotype LA est associé à des fimbriae de type IV codées par un plasmide et nommées BFP ("Bundle Forming Pili") et exclusivement présents sur les souches humaines notamment la souche E2348 / 69 fréquemment étudiée (Milon *et al.*, 1999).

En médecine vétérinaire, les souches O103 et O15 isolées de lapins respectivement en France et en Belgique sont représentatives de la classe EPEC. Leur étude s'avère primordiale car elles partagent avec les souches humaines de nombreuses homologues qui en font le meilleur modèle expérimental (Boedecker *et al.*, 1986 ; Moon *et al.*, 1983 ; Sansonetti, 1985).

L'aptitude à créer des lésions A/E est codée par des gènes chromosomiques regroupés au sein d'un "îlot de virulence" nommé "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE) (Mc Daniel *et al.*, 1995).

En étudiant la souche EPEC humaine E2348/69, on remarque au centre du LEE le locus *eae* (E. coli Attachement Effacement) qui code pour une protéine membranaire de 94 kDa appelée intimine (Jerse *et al.*, 1990) et dont l'expression serait régulée par un plasmide de haut poids moléculaire nommé plasmide EAF (Jerse *et al.*, 1991b). Cette protéine est impliquée dans le

contact étroit entre la bactérie et la cellule par son interaction avec un récepteur transloqué Tir (Translocated Intimin Receptor) (Kenny *et al.*, 1997). La combinaison de cette intimine et de Tir mène donc à la destruction des microvillosités et la formation d'un piédestal formé de fibres d' ~~aine~~, mis en évidence par le test FAS.

Au sein du LEE, trois autres séquences génétiques apparaissent primordiales dans la genèse de ces lésions A/E ; il s'agit des gènes codant EspA (25kDa), EspB (37 kDa) et EspD (39 kDa) pour EPEC Secreted Proteins (Donnenberg *et al.*, 1993 ; Leroy *et al.*, 1994). Esp ABD et Tir sont sécrétées par un système de type III codé par des gènes appelés *esc/sep* (Kenny et Finlay, 1995).

Ces données génétiques sont capitales car les souches EPEC humaines et EPEC O103 du lapin partagent de grandes similitudes, notamment un Tir identique même si les intimines sont différentes (Milon et De Rycke, 1999).

Notons également que le gène *eae* a été retrouvé chez des souches non pathogènes appartenant aux sérogroupes O128 et O132 (Leroy *et al.*, 1994)

II) LA COLIBACILLOSE DU LAPIN

Deux types de souches incriminées dans les diarrhées du lapin sont considérées comme induisant un syndrome naturel à EPEC like et représentent un excellent modèle expérimental d'études des EPEC humaines (Moon *et al.*, 1983) ; ce sont la souche RDEC-1 (O15 :H-) et les souches O103 :H2.

A) SOUCHE RDEC-1 : 1^{ère} mise en évidence d'une étiologie EPEC

En 1977, Cantey et Blake isolent chez des lapins atteints de diarrhée une souche colibacillaire O15 : H⁻ qu'ils appellent RDEC-1 (Rabbit Diarrhoea *E. coli*). De plus, ils réussissent à reproduire la diarrhée en inoculant une faible quantité de cette souche. Le rôle pathogène d' *E. coli* dans le développement des diarrhées et sa forte virulence sont avérés. Cette souche n'est ni invasive ni entérotoxigène mais induit des lésions d'attachement/effacement en colonisant l'iléon, le caecum et le colon (Cantey *et al.*, 1981).

Les lésions sont corrélées à la présence d'adhésines fimbriaires plasmidiques nommées AF/R1 (Adhésive Factor / Rabbit 1) (Cantey *et al.*, 1989) qui garantissent la pathogénicité de cette souche (Berendson *et al.*, 1983).

L'opéron *afr*, codant pour cette adhésine, est porté par un plasmide de 86 MDa et semble jouer un rôle promoteur dans la pathogénicité puisque des mutants n'exprimant plus AF/R1 ont toutefois conservé la capacité d'adhérer aux entérocytes mais de façon plus réduite que la souche sauvage (Wolf *et al.*, 1988 ; Wolf M.K. et Boedecker E.C., 1990).

Drumm *et al.*, 1988 mentionnent les mucines comme agents protecteurs contre l'adhésion de ces souches EPEC.

La séquence d'évènements conduisant à ces lésions d'attachement/effacement a été proposé par Cantey *et al.*, 1981 et confirmé par d'autres études sur des souches similaires telles que la souche U83/39 (Peeters *et al.*, 1985) comme suit:

- 1) Forte colonisation de la lumière iléale, caecale et du colon.
- 2) Attachement aux plaques de Peyer et à la bordure microvillositaire intacte par des pili et/ou les Ag capsulaires par interaction avec le glycocalyx des microvillosités).
- 3) Attachement de la bactérie (ou des Ag capsulaires) par l'intermédiaire d'un piédestal sur les entérocytes avec perte partielle ou complète de la bordure en brosse.
- 4) Diarrhée (malabsorption).

Des études récentes plus poussées sur le caractère génétique de cette virulence ont révélé la présence du locus chromosomique *eae* incriminé dans ces lésions de type A/E (Jerse *et al.*, 1991a) et même de la totalité de l'îlot de virulence prénommé "LEE" identifié sur les souches humaines EPEC E2348/69.

Toutefois, si en Belgique et en Hollande, les souches O15 :H- sont prédominantes, elles ne sont que très rarement représentées en France, où l'on retrouve majoritairement le groupe des *E. coli* O103 (Camguilhem et Milon, 1989).

B) *E. coli* O103 :H2 :K- : Confirmation et virulence d'une EPEC chez le lapin

B-1) Confirmation de la pathogénicité :

Des travaux menés dès 1979 par Renault *et al.* à partir de lapins diarrhéiques avaient permis d'isoler des colibacilles entéropathogènes appartenant au sérotype O103 et de confirmer, par épreuve sur anse intestinale de lapins, leur pouvoir pathogène.

Toutefois, cette multiplication bactérienne, mise en évidence lors de ces travaux, fut considérée pendant longtemps comme une conséquence et un marqueur potentiel de désordres digestifs car, par la suite, les infections expérimentales, *per os*, par des souches colibacillaires identifiées isolées de lapins diarrhéiques furent vouées à l'échec.

En 1982, Licois *et al.* induisent expérimentalement une diarrhée sévère, de mortalité variable pouvant atteindre 100%, en administrant *per os* une souche colibacillaire O103 à la dose de 10^4 par animal et sans artifice supplémentaire sur des lapereaux âgés de 6 semaines et indemnes de coccidiose.

En 1983, l'équipe menée par Renault reproduit également un syndrome diarrhéique à partir de la même souche administrée à forte dose (10^{10} à 10^{12} par animal) avec une mortalité variant de 22 à 66%.

En 1985, Camguilhem isole plusieurs souches appartenant toutes au sérotype O103 à partir de lapins diarrhéiques présentant des troubles digestifs graves et une mortalité supérieure à 50%. Il reproduit expérimentalement la diarrhée et la mortalité en administrant *per os* une souche d'*E. coli* de sérotype O103 sur des lapins de 39 jours. Il confirme ainsi le pouvoir entéropathogène de ces souches et leur rôle déterminant dans le développement d'entérites sévères du lapin sevré.

D'autres études ont par la suite confirmé la pathogénicité de certaines souches d' *E. coli* O103, comme les souches GV ou B10 et leur intérêt comme modèle d'étude de la virulence des EPEC humaines (Camguilhem *et al.*, 1986 ; Reynaud *et al.*, 1991).

De plus aucun signe de maladie n'est obtenu lorsque l'on administre par les mêmes voies et aux mêmes concentrations une souche colibacillaire saprophyte du lapin (Renault *et al.*, 1983).

B-2) Incidence en élevage :

La réalisation d'enquêtes épidémiologiques en France et en Espagne a révélé la nette prédominance du sérovar colibacillaire O103 : H2 : K⁻ isolé sur 30 à 50% de lapins diarrhéiques (Camguilhem et Milon, 1989 ; Blanco *et al.*, 1996 ; Peeters *et al.*, 1988 ; Blanco *et al.*, 1994).

D'autres sérogroupes de pathogénicité moins prononcée sont parfois isolés, tels que les sérogroupes O2, O128, O132, O85. Rappelons encore que le groupe O15 est épidémiologiquement négligeable en France.

Toutes ces souches affectent des lapins sevrés mais les sérogroupes O128 et O132 peuvent être isolés sur des lapereaux à l'allaitement (Okerman et Devriese, 1985). Toutefois, c'est le séro groupe O109 : H2 : K⁻ qui touche principalement les lapereaux entre 2 à 12 jours encore au nid (Peeters *et al.*, 1984b) suggérant à l'auteur que les souches O109 et O103 agissent selon des mécanismes distincts.

Cette sensibilité du lapin face à la souche O103 a été étudiée par Licois *et al.*, 1992, en révélant que les animaux peuvent être atteints quel que soit leur âge (diminution de poids observée) mais que la mortalité est accrue sur des animaux plus jeunes, entre 4 – 5 semaines, donc plus sensibles ; chez les lapins de plus de 6 semaines, la mortalité est rare. Dans tous les cas, l'implantation est précoce, dès le 4^{ème} jour post-infection, et à des taux atteignant 10⁶ à 10⁹ / g de fèces.

Peeters *et al.*, 1988 prouvent lors de reproduction expérimentale de la maladie, la différence de tropisme des souches O103 suivant l'âge des lapereaux.

Outre le séro groupe, le biotypage se révèle un critère pertinent pour juger de la virulence d'une souche (Okerman et Devriese, 1985). Ce biotypage repose sur l'aptitude d'une souche à fermenter les sucres.

Les souches O103 : H2 : K⁻ hautement pathogènes pour le lapin sevré sont Rhamnose négatif (Camguilhem et Milon, 1989) ; en revanche, les souches appartenant au sérotype O103 mais non pathogènes fermentent le rhamnose ce qui souligne la forte corrélation entre le biovar et la pathogénicité de la souche O103.

Toutes les souches O103 isolées en France sont mobiles (Peeters *et al.*, 1988).

B-3) Tableau clinique et lésionnel

Les animaux amaigris présentent une diarrhée aqueuse et souvent hémorragique souillant l'arrière-train accompagnée d'une mortalité significative (20 à 30%).

Les lésions sont caractérisées par une typhlite sévère ainsi qu'une congestion de la partie terminale de l'intestin grêle et du colon. La paroi du cæcum est œdématiée et la séreuse présente des piquetés hémorragiques.

Le contenu cæcal est très liquide, parfois hémorragique (Renault *et al.*, 1983 ; Camguilhem, 1985 ; Camguilhem *et al.*, 1986 ; Camguilhem et Milon, 1989) (figures 4 et 5).

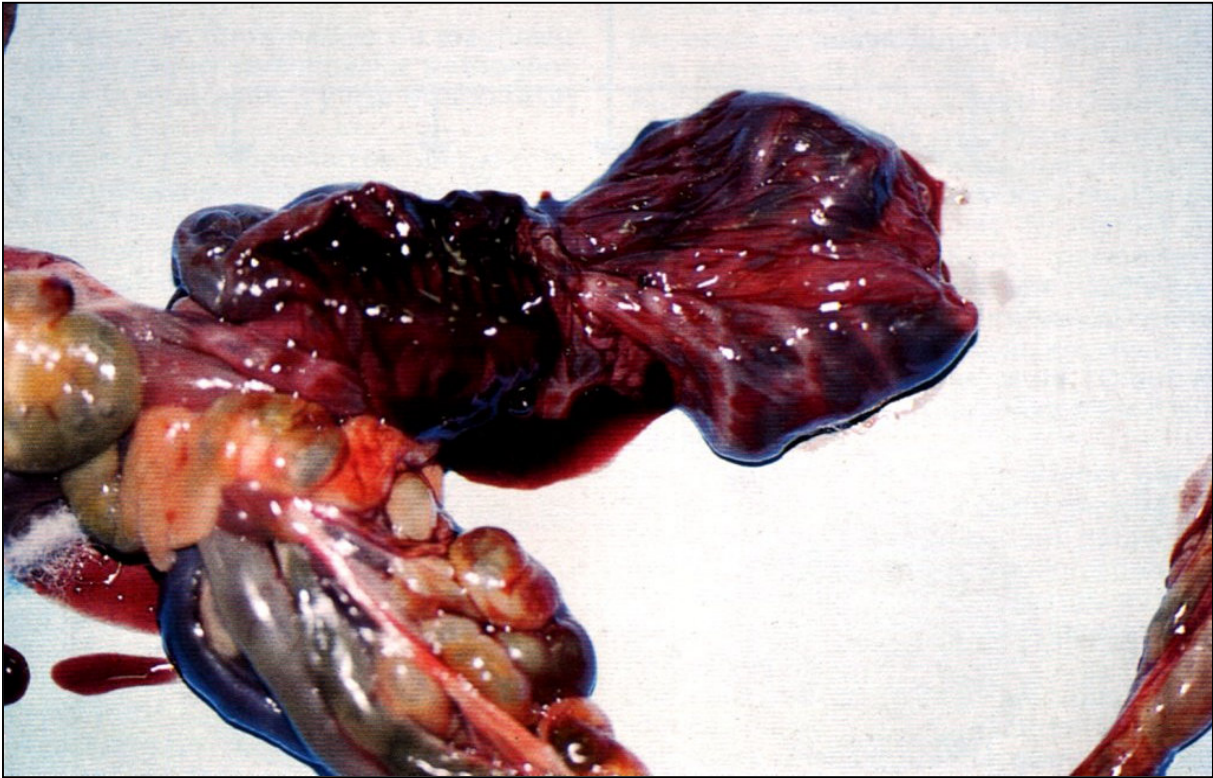
Ce tableau lésionnel s'accompagne d'une multiplication excessive de la flore colibacillaire et d'une alcalinisation du contenu cæcal (pH > 6,5) parallèlement à une diminution des AGV (réduits de 50%) (Renault *et al.*, 1983 ; Camguilhem *et al.*, 1986). L'effet inhibiteur de ces AGV face à la flore colibacillaire est alors altéré et n'entrave plus leur prolifération.

L'histologie révèle un grand nombre de bactéries adhérant à l'apex des villosités au niveau de l'iléum et des foyers de destruction des cellules épithéliales.

Les replis muqueux révèlent de nombreux amas bactériens, témoins de la forte multiplication *in situ*. Les destructions épithéliales sont associées à des foyers hémorragiques et nécrotiques (Camguilhem *et al.*, 1986).

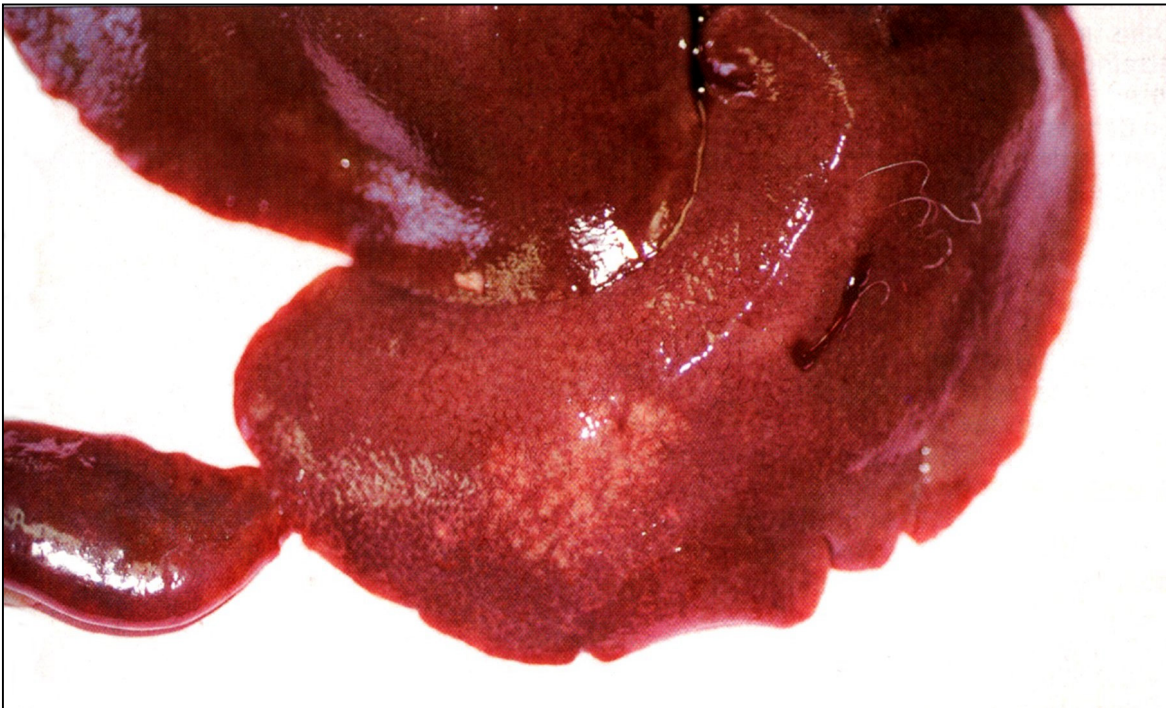
L'auteur souligne la corrélation positive entre la population d'*E. coli in situ* et la gravité des lésions.

Ces souches considérées comme non invasives (selon le Sereny Test), non productrices d'entérotoxines et adhérant aux entérocytes s'apparentent donc, comme la souche RDEC -1, aux EPEC (Licois *et al.*, 1991) en formant des lésions d'attachement/effacement.



©Boucher Samuel et Noaille Loïc, Editions France Agricole, 2^{ème} édition, 2002

Figure 4 : lésions de colibacillose avec typhlite hémorragique



©Boucher Samuel et Noaille Loïc, Editions France Agricole, 2^{ème} édition, 2002

Figure 5 : Lésions de colibacillose avec foyers nécrotiques hépatiques

B-4) Facteurs de virulence et déterminisme génétique :

Le schéma pathogénique pour la souche O103 est proche mais distinct de celui de la souche RDEC-1 : l'adhésion initiale aux plaques de Peyer n'a pas été observée par Reynaud et Federighi, 1991 lors de l'étude de la souche GV, appartenant au séro groupe O103.

Les différentes étapes s' enchaînent comme suit (Camguilhen *et al.*, 1986):

- 1) Adhésion des bactéries à la surface microvillositaire et colonisation (pili).
- 2) Multiplication bactérienne (dissémination par le mucus dans l'iléon, le cæcum et le colon).
- 3) Induction de lésions d'attachement/effacement avec un contact plus étroit entre bactérie et cellule et destruction de l'épithélium accompagnée d'une inflammation importante (la muqueuse est infiltrée par des granulocytes et des cellules mononucléées).
- 4) Diarrhée « inflammatoire ».

En 1990 (b), Milon *et al.* démontrent que la souche sauvage B10 de séro groupe O103 adhère aux entérocytes du lapin de 6 semaines et de 8 jours ainsi que sur les cellules HeLa. Cette propriété implique une adhésine de 32 kDa de structure fimbriaire, mais pas exclusivement puisque des souches non pathogènes expriment aussi cette adhésine.

Cette adhésine, différente de AF/R1 (19kDa), inexistante chez RDEC-1 (Esslinger *et al.*, 1989 ; Milon *et al.*, 1990b) est nommée AF/R2 (Adhesine Factor / Rabbit 2).

En 1996, Pillien *et al.* sélectionnent un mutant de la souche sauvage B10 (séro groupe O103) n'exprimant plus AF/R2 en introduisant le transposon *TnphoA*. Ils observent alors une colonisation intestinale altérée et une diminution significative de la pathogénicité soulignant ainsi l'implication de AF/R2 dans l'expression de la virulence de souche B10.

AF/R2 est codée par un opéron chromosomique *afr2* et de nombreuses similitudes la rapprochent de la famille des adhésines *E. coli* K88 ou F4 (Fiederling *et al.*, 1997). Son expression *in vitro* serait régulée par un ou plusieurs composants de la Bacto-peptone (Esslinger *et al.*, 1994).

Ainsi, même si ces souches colibacillaires humaines ou du lapin présentent des propriétés d'attachement/effacement similaires, elles n'en diffèrent pas moins notamment par les adhésines impliquées dans la phase de colonisation du tube digestif (Browne-Robins *et al.*, 1994).

La virulence des souches O103 allie la présence sur leur chromosome d'au moins deux systèmes génétiques : l'opéron *af/r2* et le Locus of Enterocyte Effacement (LEE) (Milon *et al.*, 1999).

Le LEE des souches O103, identique à celui des souches humaines, contient le locus *eae*, le système *sep* et les gènes *espABD*. L'intervention du LEE dans la pathogénicité des souches O103 a été prouvée en étudiant sur une banque de mutants de la souche sauvage B10 les modifications d'effet cytopathique (ECP) sur les cellules HeLa (De Rycke *et al.*, 1997).

Un transposon inséré dans le LEE entraîne une perte totale de virulence lorsque celui-ci est localisé en région *sep*, tous les mutants présentant un défaut de sécrétion des protéines EspA, B et D.

Toutes les protéines Esp sont requises pour entraîner un ECP mais ce dernier est indépendant du système intimine / Tir (Nougayrède *et al.*, 1999).

Des essais de délétion du *eae* et de fabrication de mutants mènent également à une perte de virulence de souches humaines (Donnenberg et Kaper, 1991 ; Donnenberg *et al.*, 1990a).

Ces résultats offrent des pistes vaccinales intéressantes et encourageantes en développant des mutants spécifiques susceptibles d'enrayer les épidémies colibacillaires (Sansonetti, 1990; Milon *et al.*, 1990).

III) APPLICATION A LA VACCINATION

Les particularités digestives et de la flore intestinale du lapin doivent suggérer une extrême vigilance dans le choix et l'usage des antibiotiques.

De plus, si certaines molécules (colistine, néomycine, fluméquine, enrofloxacin) permettent une relative mais temporaire maîtrise de la maladie, les traitements se révèlent le plus souvent longs et peu probants face aux souches très pathogènes.

D'autre part, les aspects économiques, pour des raisons évidentes, s'opposent à de telles pratiques et la sélection de souches résistantes doit toujours inciter à la prudence.

Les tentatives de prévention en agissant sur l'alimentation (acidification de l'eau de boisson, augmentation du taux cellulosique) n'ont eu aucun succès (Camguilhem *et al.*, 1986).

Reynaud *et al.*, 1992, ont tenté, sans succès, d'utiliser un bactériophage lytique de O103 comme thérapie et prévention.

Ces considérations alliées aux connaissances génétiques actuelles ont conduit les scientifiques à considérer la vaccination comme unique mesure prophylactique envisageable.

A) VACCINATION DES MERES AVEC UN VACCIN TUE

Milon et Camguilhem (1989) ont testé un protocole vaccinal des mères par voie intradermique ou par voie orale pendant la gestation et la lactation.

Malgré une réponse immunitaire complète et correcte des mères (production d'anticorps sériques et fécaux et dans le lait de classe IgA) et une transmission correcte de ces anticorps aux lapereaux, aucune protection n'a été obtenue ; les lapereaux ainsi sevrés succombent à l'infection expérimentale.

De plus, la vaccination des mères et le transfert d'anticorps par le lait, qui n'a aucun effet protecteur, abolit la protection des lapereaux sevrés vaccinés, par une probable inhibition de la stimulation antigénique locale (Milon et Camguilhem, 1989).

B) VACCINATION DES LAPERAUX PAR VOIE INTRADERMIQUE

Camguilhem (1987) a tenté une protection par injection d'un vaccin à agents inactivés par le formol.

Le protocole se compose de deux injections à 22 jours et 39 jours d'âge du lapereau suivi d'une épreuve expérimentale avec la souche sauvage, 7 jours après le rappel.

Tous les animaux vaccinés ont présenté un taux d'anticorps anti-O103 persistant mais non protecteur. Ces animaux n'ont pas résisté à l'épreuve virulente.

L'essai est donc un échec et confirme le rôle non protecteur des anticorps sériques.

La protection contre cette maladie ne semble donc pas relever du mécanisme de l'immunité générale, mais impose à s'orienter vers une stimulation des réponses immunitaires locales, au niveau digestif, directement au site d'infection.

Les travaux s'orientent alors vers l'administration d'un vaccin par voie orale directement aux lapereaux.

C) VACCINATION DES LAPEREAUX PER OS

C-1) Protocoles expérimentaux utilisant la souche B10

Protocole de base : administration pendant 10 jours après le sevrage

La souche vaccinale est la souche B10 (de séro groupe O103, Rhamnose négatif) inactivée par le formol.

Camguilhem et Milon (1990, 1991) ont réalisé des épreuves vaccinales à partir de souches B10 cultivées sur deux milieux différents (en Bouillon Trypticase Soja ou BTS et en gélose Minca).

Ces souches vaccinales, à dose de 2 à 4.10^9 bactéries, sont administrées par sonde œsophagienne quotidiennement pendant 10 jours post-sevrage.

Les résultats sont positifs puisqu'une protection est obtenue pour les deux souches vaccinales ; toutefois, le vaccin issu du milieu BTS offre une protection complète tandis qu'elle n'est que partielle pour celui cultivé sur gélose Minca.

Les différences de protection peuvent s'expliquer par la différence d'expression des adhésines dans chaque milieu de culture, facteurs majeurs dans l'immunité anti-colibacillaire O103 (Milon *et al.*, 1990a). En effet, le milieu BTS permet une faible expression de l'adhésine alors que celle-ci n'est pas exprimée en gélose Minca.

C-2) Administration pendant 4 ou 6 jours :

Au vu des contraintes d'élevage, Milon et al. ont testé les vaccins cultivés en BTS sur une administration de 4 ou 6 jours mais n'ont obtenu que des protections incomplètes.

L'optimisation de la synthèse des adhésines O103 en bouillon Penassay a permis d'obtenir une souche vaccinale performante puisqu'une protection totale a été obtenue après seulement 4 jours d'administration et la souche sauvage n'est plus isolée dans les selles 13 jours après l'infection.

Ce protocole vaccinal (4 jours d'administration avec un vaccin préparé en bouillon Pennassay) a révélé sur le terrain une protection correcte des animaux pendant seulement 4 semaines (Camguilhem *et al.*, 1991). Cette vaccination ne protège donc pas les animaux pendant la globalité de leur vie économique.

Pour combler ce vide, un rappel vaccinal per os est donc conseillé 3 semaines après le sevrage.

D) VACCINATION PAR DES SOUCHES VIVANTES :

Ce protocole vaccinal par voie orale d'une souche B10 cultivée sur bouillon Penassay semble prometteur pour enrayer la maladie. Toutefois, la nécessité d'une administration répétée, peu compatible sur le terrain et certains échecs lors d'application « terrain » (Colmaire M., 1995) ont amené Milon et al. à se pencher sur l'étude de souches vaccinales vivantes capables de persister dans le tube digestif des animaux et d'y assurer une stimulation immunitaire permanente : une seule administration au sevrage serait suffisante pour protéger les animaux durant toute leur vie économique.

Les premiers essais utilisèrent deux souches sauvages non pathogènes et ayant certaines divergences par rapport aux souches O103, rhamnose négatif.

- ↪ La souche C127 (O103, rhamnose positif) possède le même LPS mais ne produit pas l'adhésine AF/R2.
- ↪ La souche C6 (O128, rhamnose positif) produit la même adhésine mais un LPS totalement différent.

Le protocole vaccinal consiste à vacciner des animaux tout juste sevrés, c' est-à-dire à 32 jours d' âge, soit avec la souche C 127 à la dose de $5 \cdot 10^9$ soit avec la souche C6 à la dose de $5 \cdot 10^5$. 7 jours après, la souche sauvage B10 à la dose de $2 \cdot 10^4$ est administrée *per os*.

Les deux souches entraînent une réponse immunitaire rapide (cinétique des IgA).

Le suivi bactériologique confirme que les deux souches ont réussi à coloniser le tube digestif.

Si la souche B10 reste détectable mais en moindre quantité avec la vaccination par C127, elle n' est jamais retrouvée avec la souche C6. Cette dernière a induit un véritable "effet barrière" vis-à-vis de la souche sauvage qui restera le moteur d' action des futurs essais vaccinaux. Tran Cong *et al.* (1992) suggèrent que les colicines produites par la souche C6 seraient responsables de cette "résistance à la colonisation" et approfondiront sans succès son usage comme "thérapie écologique".

Toutefois ce type de vaccin, en raison d' une pathogénicité résiduelle, n' est pas envisageable sur le terrain.

Ces résultats encourageants dans l' usage de vaccins vivants associés à la connaissance croissante des facteurs de virulence et la maîtrise toujours grandissante des outils génétiques ont mené différentes équipes à travailler sur l' élaboration de souches recombinantes stables et non virulentes donc applicables à la vaccination.

Le travail qui suit a pour objectif de tester une souche mutée vivante dans un protocole vaccinal administré par voie orale et de vérifier son efficacité et son innocuité.

Le mutant obtenu par transposition *TnphoA* de la souche sauvage B10 de séro groupe O103:H2:K- est nommé CA1/ B10.

Il y sera décrit les différentes observations cliniques, bactériologiques et immunologiques réalisées tout au long de l' épreuve vaccinale ainsi que les résultats s' ouvrant vers de nouveaux protocoles simples à réaliser sur le terrain et efficaces.

DEUXIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES:

I/ MATERIEL :

A) Les lapins :

Trente six lapereaux NZW (souche INRA 1077, domaine expérimental de Langlade), sevrés à 28 jours, ont été utilisés pour ce travail. Ils étaient déjà tatoués et ont été, à leur arrivée, vaccinés contre la myxomatose (vaccin Dermyxovax, Rhône-Mérieux). Cette vaccination a entraîné une réaction plus ou moins importante au niveau de l'oreille mais n'a eu de répercussion ni sur la santé des animaux ni sur l'épreuve vaccinale.

À leur arrivée, les animaux ont été répartis, au hasard, dans des cages par lot de trois jusqu'au début de l'épreuve; à J0, un allotement a alors été réalisé (voir II/méthodes). Les lapins ont reçu, ainsi qu'au long de toute la manipulation, une nourriture supplémentée en Robénidine (anti-coccidien) *ad libitum* et de l'eau. Aucun apport en antibiotique sous quelque forme que se soit n'a été réalisé.

B) Les souches bactériennes :

B-1) Souche sauvage :

Il s'agit de la souche *Escherichia coli* B10 de sérotype O103 :H2 :K⁻. Elle présente le biovar " rhamnose négatif " et se révèle sensible à la Kanamycine.

C'est une EPEC-like qui présente une haute pathogénicité pour le lapin sevré.

Elle possède sur son chromosome le Locus of Enterocyte Effacement (LEE) caractéristique des EPEC. Ce locus contient notamment le gène de l'intimine (*eae*), de son récepteur transloqué (Tir) et des protéines Esp A, Esp B et Esp D qui forment l'appareil de translocation de Tir (De Rycke *et al.*, 1997). Enfin le LEE contient le système de sécrétion de type III codé par *esc/sep* qui permet la sécrétion des trois protéines Esp et de Tir.

Elle est également AF/R2 positive, fimbriae spécifique responsable d' une adhésion diffuse aux microvillosités intestinales de lapin et aux cellules HeLa (Pillien *et al.*, 1996).

Ces propriétés lui confèrent un ECP *in vitro* sur cellules Hela caractérisé par l'accumulation de fibres de stress et des plaques d'adhésion focales, accompagné d'un arrêt de la multiplication cellulaire et qui est lié au système de sécrétion Esc/ sep et aux protéines Esp A, B et D (Nougayrède *et al.*, 1999). Cet ECP est intimine/Tir indépendant.

B-2) Souche mutée :

a) Caractéristiques :

Il s'agit de CA1/B10 (figure 6) qui est un mutant de la souche B10, dont l'Effet Cytopathique (ECP) est inhibé par insertion unique du transposon *TnphoA* à l'intérieur du Locus of Enterocyte Effacement (LEE), au niveau du complexe de gènes *sep*, qui code pour le système de sécrétion des protéines Esp (De Rycke *et al.*, 1997) et de Tir. Ces protéines (Esp A,B et D) sont toujours synthétisées mais ne sont plus excrétées.

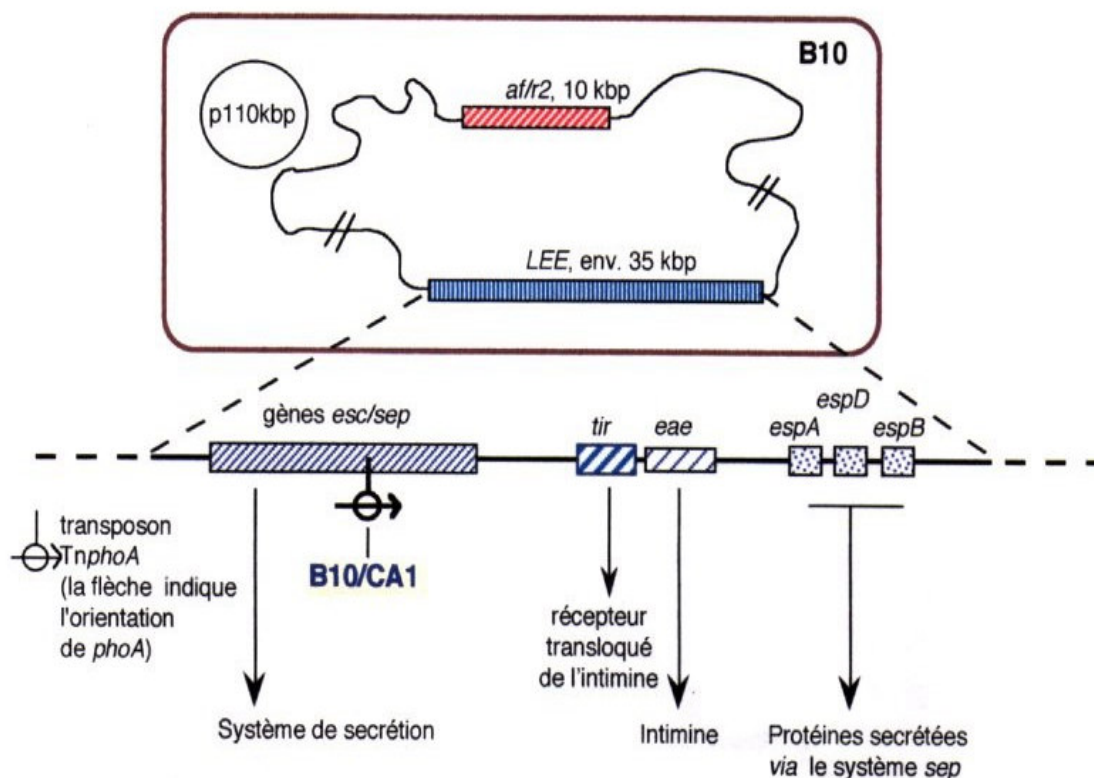


Figure 6 : Représentation schématique des gènes de virulence des *E. coli* O103

Kbp : kilobases. *Af/r2*: opéron codant l'adhésine AF/R2. LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*.

Les gènes *esc/sep* (pour "secretion of EPEC proteins"), *eae* (pour « enterocyte attachment/effacement), *tir* (« translocated intimin receptor ») et *esp* (« EPEC secreted proteins ») sont décrits dans le texte. Le site unique d'insertion du transposon *TnphoA* dans le mutant ECP négatif CA1/B10 est mentionné.

CA1/B10, comme la souche sauvage, est Rhamnose négatif mais Kanamycine résistante, faculté liée à la présence du transposon. Ceci permettra de différencier par la suite la souche mutée de la souche sauvage. Le mutant a également conservé la propriété d'adhésion aux cellules intestinales puisqu'il est aussi AF/R2 positif (tableau 3).

Tableau 3: comparaison phénotypique de la souche sauvage B10 et du mutant CA1/B10:

	B10	CA1/B10
AF/R2	+	+
Rhamnose	-	-
Kanamycine	-	+
E.C.P.	+	-

b) Obtention du mutant :

La méthode est décrite par Pillien *et al.*, 1996.

Le transposon *TnphoA*, dérivé du transposon *Tn5* portant à une extrémité le gène de la Phosphatase Alcaline, est porté par un " plasmide suicide " qui est introduit, par conjugaison, dans la souche sauvage. Le plasmide va alors disparaître progressivement au cours des divisions bactériennes tandis que seul le transposon pourra persister s'il se place sur le chromosome. Ainsi, toutes les bactéries de la souche sauvage montrant une résistance à la Kanamycine ont donc intégré le transposon en un ou plusieurs exemplaires.

Ces transpositions se faisant de façon aléatoire, il faut ensuite effectuer un tri parmi tous les mutants transposés obtenus en sélectionnant un critère intéressant. En ce qui concerne le mutant CA1/B10, le mutant a été sélectionné sur le phénotype " effet cytopathique ". CA1 possède en effet, comme la souche sauvage, la faculté d'adhésion aux cellules intestinales mais sans entraîner d'ECP. Cette propriété s'explique par le fait que le transposon se trouve sur une région du LEE (figure 6), nécessaire à l' expression de la virulence.

CA1/B10 a été sélectionné après tri sélectif dans une banque de 5000 mutants ; quatre autres mutants, tous possédant une insertion unique du transposon dans le LEE, ont été obtenus au cours de cette phase. Le caractère unique de l'insertion a été vérifiée par hybridation ADN/ADN en utilisant comme sonde le fragment Hind III de *TnphoA* marqué par la digoxigénine.

Au cours de l'expérimentation *in vivo*, la stabilité du transposon a également été vérifiée sur quelques souches prélevées au cours de l'épreuve afin de confirmer par hybridation/Southern blot que le *TnphoA* était toujours unique et inséré à la même place.

C) Matériel de laboratoire :

C-1) pour les cultures bactériennes :

Le milieu de Mac-Conkey est intéressant puisqu'il est sélectif pour *E. coli*. Celui-ci a été utilisé sous forme solide, coulé dans des boîtes de Pétri après inoculation avec les prélèvements de fèces.

Des géloses supplémentées en Rhamnose ou en Kanamycine ont également été utilisées pour le repiquage en matrice de colonies issues du milieu Mac-Conkey, afin de différencier la souche mutante de la souche sauvage ou des souches de la flore normale des lapins.

- milieu au rouge de phénol supplémenté à 1% de rhamnose :

Le rhamnose est préparé au préalable sous hotte à flux laminaire, où il est filtré et mélangé à de l'eau physiologique dans les proportions 4g pour 40 ml d'eau physiologique afin d'obtenir, au final, 10% de rhamnose dans le mélange (le rhamnose se conserve à +4°C).

Puis on prend 2 ml que l'on ajoute à 18 ml de milieu au rouge phénol (liquéfiée à une température d'environ 56°C). Le tout est alors versé dans des boîtes de Pétri.

Ce milieu permet de déterminer si la colonie prélevée est bien rhamnose positif ; l'utilisation du rhamnose par les bactéries génère des catabolites acides qui vont décolorer le Rouge de Phénol et laisser apparaître des colonies jaunes.

Le caractère Rhamnose négatif est peu répandu chez *E. coli* et caractéristique des EPEC hautement pathogènes pour le lapin (Camguilhem et Milon, 1989).

- milieu supplémenté en kanamycine :

La kanamycine est achetée en poudre, reconstituée avec de l'eau distillée et filtrée stérilement (filtre de pores de 0,22 µ) avant utilisation ; elle se conserve plusieurs jours à +4°C.

On place 90 µl de Kanamycine dans 18 ml de gélose LA (Luria Agar) afin d'obtenir une concentration en Kanamycine de 50 µg/ml.

Ce milieu permet d'isoler et de différencier les souches sauvages des souches mutantes, puisque seules ces dernières, résistantes à la kanamycine grâce au transposon, vont pouvoir pousser sur ce milieu.

C-2) Coloration :

La coloration de Gram a été utilisée pour la mise en évidence de bactéries autres que *E. coli* et qui pouvaient être à l'origine de diarrhées, telles que *Clostridium spiroforme*.

C-3) Recherche d' ookystes coccidiens

La méthode d' enrichissement par flottation en lame de Mac Master a été utilisée pour la recherche d'ookystes coccidiens qui peuvent aussi être responsables de diarrhées.

Le sulfate de Magnésium (d = 1.28) saturé a été utilisé dans les proportions : 1 volume de fèces pour 2 volumes de sulfate de Magnésium.

La densité du sulfate étant supérieure à celles des ookystes, ceux-ci vont flotter à la surface ; la lecture se fait avec une lame de Mac Master, dont le volume est connu et qui permet alors de quantifier le nombre d'ookystes / volume de fèces.

La lecture sur toute la surface de la lame permet de dénombrer les œufs contenus dans 1 ml (n = nombre d' œufs); le résultat est obtenu par la formule suivante: $n \times 15$

C-4) Matériel utilisé pour le suivi des animaux :

Une seule balance a été utilisée pour la pesée des animaux au cours de la manipulation.

Des scalpels stériles, pinces stériles et des gants ont été nécessaires pour les autopsies et les prélèvements de fèces.

Un microscope optique et une loupe stéréoscopique (pour la numération des colonies bactériennes) ont aussi été utilisés.

II/ METHODES :

A) Protocole de vaccination :

Les trente six lapins ont été répartis en deux lots de dix-huit ; le lot I correspondant aux animaux vaccinés et le lot II au lot témoin.

Dans chaque lot, six cages, contenant chacune trois lapins, ont été formées en veillant à séparer les lapins issus d'une même portée et en essayant de former des lots homogènes en poids puisque les échantillons seront ensuite analysés par cage et non par individu.

Tous les lapins (lot I, cage 1 à 6 et lot II, cage 7 à 12) ont reçu une nourriture *ad libitum* (sous forme de granulés standard), supplémentée en Robénidine (anti-coccidien), et de l'eau aussi à volonté.

A J0 (30 jours d'âge), les animaux du lot I ont reçu par sonde oesophagienne 2.10^7 UFC de la souche vaccinale CA1/B10 dans 2 ml d'eau physiologique.

A J7, les deux lots (I et II) ont reçu par sonde oesophagienne 4.10^4 UFC, correspondant à une DL50, de la souche sauvage B10.

Un suivi clinique, bactériologique, parasitologique et immunologique régulier a ensuite été réalisé pendant un mois (figure 7).

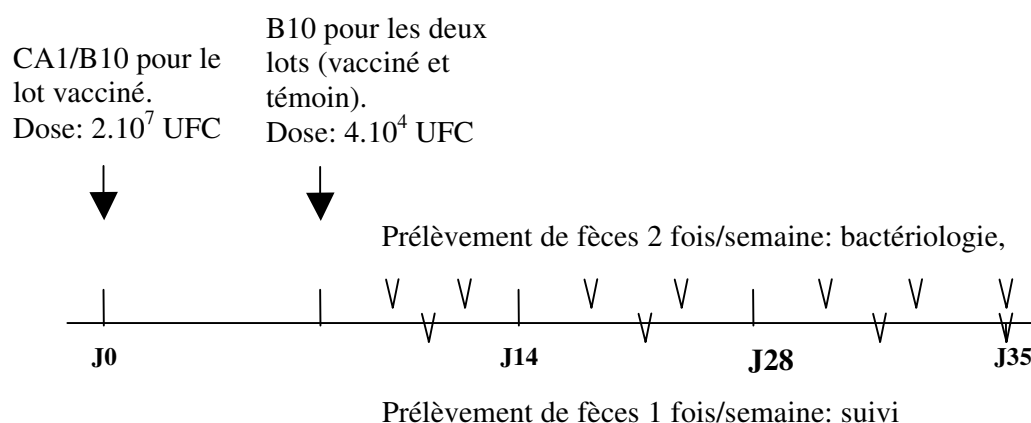


Figure 7: schématisation du protocole de vaccination et du suivi bactériologique, immunologique et parasitologique.

B) Suivi clinique :

Les animaux ont été examinés quotidiennement. Ils ont été pesés deux fois par semaine, à compter de J0 (inclus), afin de surveiller d'éventuelles pertes de poids et d'établir une courbe pondérale.

De plus, l'état des animaux était régulièrement surveillé afin de déceler toute trace de diarrhée, de mortalité et noter une éventuelle diminution de la consommation alimentaire. Une surveillance accrue s'est faite pendant la période critique entre J17 -J22.

Les résultats bactériologiques, parasitologiques et immunologiques obtenus sont à considérer pour l' ensemble d' une cage. En revanche les observations cliniques sont individuelles.

C) Suivi bactériologique:

C-1) Numération colibacillaire :

Deux fois par semaine, le matin, une analyse de l'excrétion fécale colibacillaire (par cage) a été réalisée par prélèvement de fèces frais (en évitant de prendre les caecotrophes) en vue d'une numération sur milieu Mac-Conkey.

2 g de fèces étaient ainsi placés dans 18 ml d'eau physiologique et promptement agités afin de bien dissoudre les fèces (ajout de petites billes stériles pour bien concasser tous les fragments) ; le mélange ainsi obtenu est filtré à l'aide de compresses afin de ne recueillir que la partie liquidienne. Une série de dilution est ensuite réalisée avec de l'eau physiologique pour obtenir des dilutions à 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} . 1 ml de chaque dilution est ensuite placé dans une boîte de Pétri et recouvert par 2-3 mm de milieu de Mac-Conkey (à 50°C, mélanger doucement en formant des " 8 " afin de bien homogénéiser). Lorsque le milieu s'est solidifié, on place les boîtes à l'étuve à +37°C, pendant 24 -36heures pour obtenir une croissance maximale d'*Escherichia coli*.

Cette même analyse colibacillaire a été reproduite, par ensemencement direct du contenu caecal, pour les animaux morts au cours de l'épreuve ou sacrifiés en fin de celle-ci à J35.

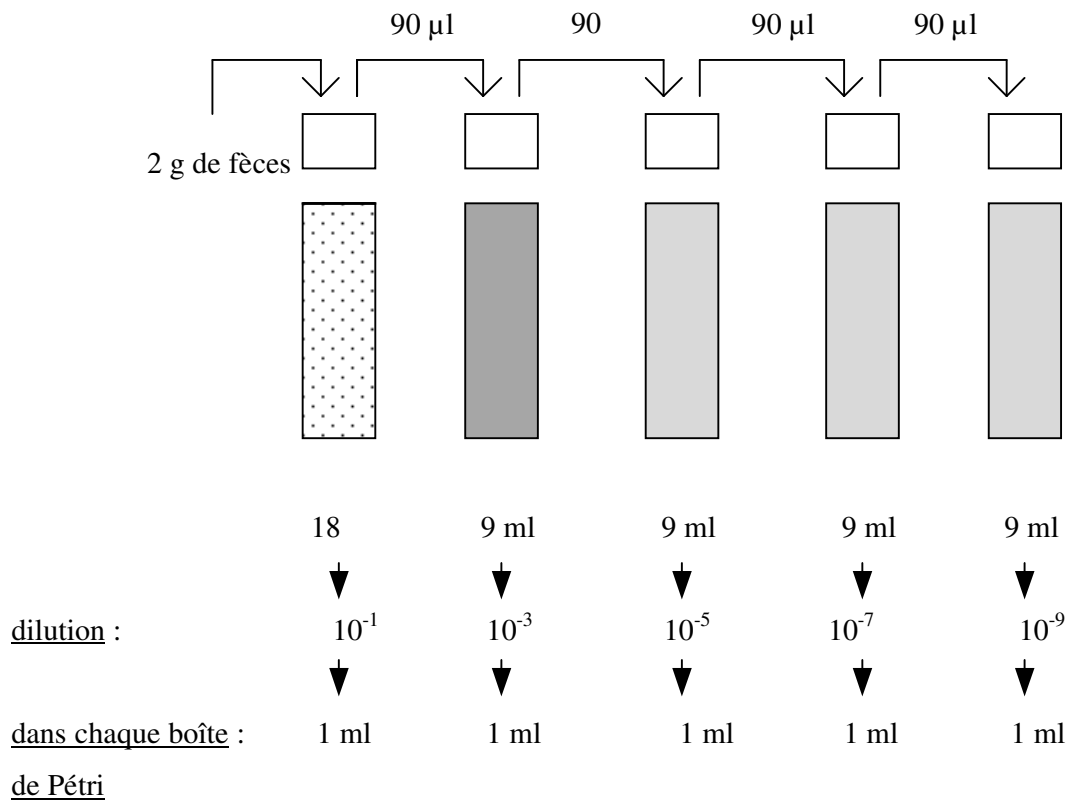


Figure 8: protocole de dilution pour la numération colibacillaire.

La morphologie des colonies colibacillaires sur milieu Mac-Conkey est typique: elles apparaissent rouge intense et de forme foliacée; ces colonies seront ainsi aisément prélevées pour subir les opérations suivantes.

C-2) Identification d'isolats colibacillaires :

Des colonies issues de ces cultures ont été isolées afin de vérifier leur appartenance au séro groupe O103 (par agglutination rapide sur lame) et au biovar rhamnose négatif (par subculture sur un milieu supplémenté en Rhamnose, permettant ainsi de différencier la flore intestinale physiologique des souches B10 et CA1/B10).

La résistance à la kanamycine a également été testée par repiquage sur un milieu supplémenté en antibiotique afin de différencier la souche sauvage de la souche mutante.

- Agglutination rapide sur lame :

Sur une lame, poser une goutte d'eau physiologique, ajouter un peu d'une colonie bien isolée et mélanger soigneusement. Ajouter alors une goutte de sérum anti-O103 et remuer lentement la lame pendant quelques secondes.

Le résultat s'avère positif lorsque l'on observe une agglutination bien nette (granulation fine, pas de gros grumeaux) : c'est le cas pour la souche sauvage et la souche mutante.

Le résultat négatif ne montre aucune agglutination.

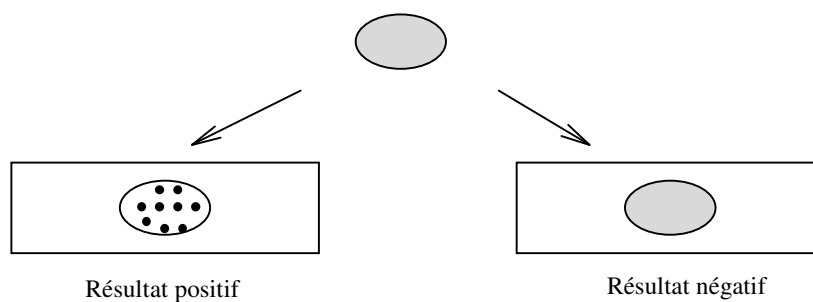


Figure 9: protocole d' agglutination rapide sur lame

Les méthodes de repiquage sont identiques pour le milieu enrichi en rhamnose ou en kanamycine. On prélève à l'aide d'un cure -dent stérile une colonie typique isolée sur milieu Mac-Conkey puis cette colonie estensemencée sur les milieux enrichis; un ensemencement suivant un quadrillage permet d'ensemencer 6 colonies isolées par prélèvement et de vérifier ainsi leurs propriétés.

L'opération se fait toujours de la gélose enrichie en rhamnose vers la gélose supplémentée en kanamycine afin de ne pas inhiber la pousse de la souche sauvage par un passage au préalable sur kanamycine.

Ce contrôle assure un diagnostic différentiel en éliminant d' autres causes possibles de diarrhées, l'accent étant porté sur la recherche de coccidies et de *Clostridium spiroforme*. Ce contrôle a été réalisé lors de chaque prélèvement de fèces.

D) Suivi parasitologique :

D-1) Recherche d' ookystes coccidiens

La technique de flottation a été utilisée, suivant les proportions 1 volume de fèces pour 2 volumes de sulfate de Magnésium. La lecture se fait grâce à une lame de Mac Master, dont le volume est connu et qui permet ainsi de dénombrer les ookystes/g de fèces.

D-2) Recherche de *Clostridium spiroforme*:

Ces bactéries anaérobies, Gram + peuvent se développer lors d' une supplémentation en antibiotique, certaines souches produisant des toxines responsables de diarrhée.

La mise en évidence repose sur la coloration de Gram, qui fait apparaître les bactéries en violet. Leur morphologie en croissant ou en spirale est caractéristique.

La lecture se fait au microscope avec l' objectif à immersion.

E) Suivi immunologique:

Il s' agit d' une méthode ELISA pour recherche d' IgA anti-LPS O103.

Ce suivi est bien sûr capital pour juger de l' effet immunogène de la souche vaccinale, en mettant en évidence la quantité d' anticorps produite. Ainsi, une fois par semaine, des fèces ont été prélevés pour rechercher des IgAs anti-LPS O103 en appliquant la méthode suivante:

- 2g de fèces sont placés dans 8ml de PBS contenant 1% d' azide de sodium, le tout est mélangé rigoureusement pour dissocier tous les éléments (dilution initiale au 1/5).

- Les échantillons subissent une centrifugation à 5000g pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et congelé à -20°C jusqu' à la fin de la manipulation, afin de procéder aux mesures en une seule fois et éviter ainsi d' éventuelles erreurs de manipulation pouvant fausser les résultats.

La mesure des IgAs s' appuie sur une méthode ELISA déjà décrite par Milon et al., 1992.

Principe:

1. Le LPS-O103 préparé par la méthode phénol/ eau à chaud est dilué au 1/1000 dans un tampon carbonate/bicarbonate, pH= 9.6 et distribué dans les puits d' une plaque à 96 puits. Le tout est mis à +4°C pendant 18 heures. Ce LPS va s' adsorber au plastique des puits.
2. Trois lavages au PBS+ Tween 20, à 0.5‰
3. Les prélèvements de fèces sont dilués au 1/20 final en PBS + Tween 20, 2‰
Fèces : 1 volume pour 3 volumes de PBS. On place 100µl dans chaque puits et on laisse incubé 30 minutes à 37°C.
4. Trois lavages
5. On ajoute les Ac de chèvre anti IgA-LP (Ac anti chaîne α = chaîne lourde spécifique des IgA) à la dilution 1/1000 en PBS + Tween 0.5‰. Les plaques sont remises à incuber à +37°C pendant 30 minutes.
6. On effectue alors trois lavages.
7. On ajoute alors des Ac anti IgG de chèvre marqués par la phosphatase alcaline à la dilution 1/1000 en PBS . Les plaques sont incubées 30 minutes à +37°C.
8. Quatre lavages sont alors réalisés.
9. Cette dernière étape est celle de la révélation, par l' ajout d' un substrat qui sera dégradé par la phosphatase alcaline. Le substrat utilisé est le pNitrophénylphosphate Disodique (pNpp) à 1 mg/ml en tampon diéthanolamine / HCl à pH9. Sa dégradation par la phosphatase alcaline libère du paranitrophénol de couleur jaune dont la concentration est évaluée par mesure de la densité optique à 405 nm (lecteur de plaques Dynatech) (figure 10).

Résultat positif



Les Ac anti LPS O103(IgAs) présents dans les fèces se fixent aux LPS O103 fixés aux parois de la plaquette; ces IgAs sont eux-mêmes marqués par les Ac anti-IgA de chèvre, eux-mêmes reconnus par des Ac porteurs d' une PAL, qui dégradera le pNpp et permettra les mesures de DO.

Résultat négatif



Ici les prélèvements de fèces suivent le même protocole mais aucun Ac anti-LPS O103 n' étar présents, rien ne se fixera et tous les éléments seront éliminés lors des nombreux lavages.

Les mesures de DO seront faibles.

Figure 10: principe de mesure de la Densité Optique(DO) par la méthode ELISA.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

I/ RESULTATS CLINIQUES:

Les résultats sont présentés dans le tableau 4 et la courbe pondérale de la figure 11.

Dans le lot témoin, qui a reçu la souche B10 virulente à la dose de 4.10^4 UFC par voie orale à J7, 11 lapereaux sur 18 ont présenté une perte de poids. 9 d' entre eux ont déclaré des diarrhées et 7 en sont morts, entre J13 et J25.

Aucun symptôme n' a été relevé dans le lot des animaux vaccinés, après administration de la même souche B10. Si aucune perte de poids n' est à signaler, notons que la période J0-J7 montre un GMQ du lot vacciné légèrement inférieur au lot témoin; ceci correspond au moment de la colonisation des animaux vaccinés par la souche CA1/B10. Cette inflexion n' a cependant eu aucune répercussion par la suite puisque le GMQ des animaux vaccinés est demeuré stable malgré l' administration de la souche B10, contrairement à celui du lot témoin.

Ainsi, dès J10, la différence entre le GMQ des deux lots tend à se réduire et dès J18, le GMQ du lot vacciné devient supérieur à celui des survivants du lot témoin.

La figure 11 retrace l' évolution des gains de poids moyens en ne tenant compte que des lapins témoins qui ont survécu à l' épreuve virulente (n=11).

Chez les animaux vaccinés, la courbe de croissance n' est quasiment pas perturbée.

Tableau 4: Résultats cliniques observés après vaccination par la souche CA1/B10 (J0, lot vacciné) et épreuve virulente par la souche B10 (J7, lots témoin et vacciné).

Lot	Perte de poids ^a	Diarrhées ^a	Mortalités ^a	GMQ (g)	
				J0-J7	J8-J31
Témoin (n=18)	11	9	7 ^b	40.6	33.9 ^c
Vacciné(n=18)	0	0	0	36.2 ^d	36.7 ^e

a: nombre d' animaux ayant présenté des épisodes de perte de poids, de diarrhée, ou morts de l' infection.

b: à J13, J14, J15, J17, J19 et J20.

c: $p < 0.01$ J8-J31 vaccinés vs J0-J7 (témoins)

d: $p < 0.02$ J0-J7 vaccinés vs J0-J7 témoins

e: J8-J31 vaccinés vs. J8-J31 témoins : non significatif

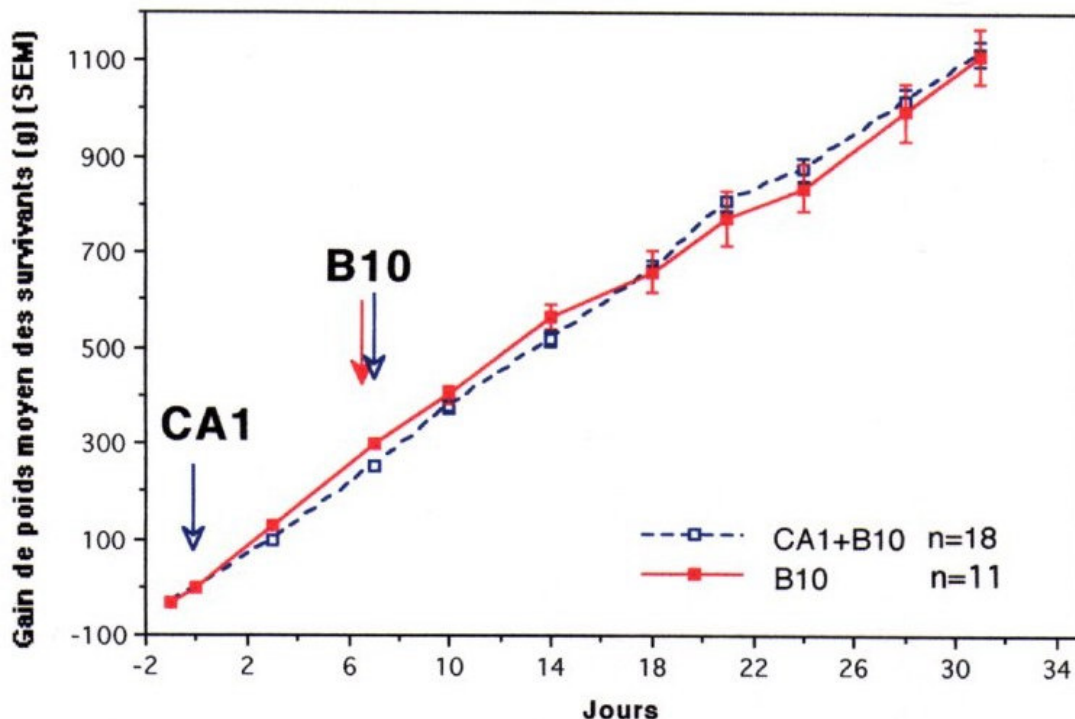


Figure 11 : Courbes pondérales des lots témoins et vaccinés au cours de l'épreuve.

II/ RESULTATS BACTÉRIOLOGIQUES:

Il est à noter qu' à J0 la population d'*Escherichia coli* (correspondant à la flore normale) était déjà, pour les deux lots, relativement élevée; ceci est à mettre en relation avec le stress occasionné par le transport, l' allotement et les vaccinations des animaux (on voit d' ailleurs nettement une baisse rapide de ces bactéries, entre J0 et J7).

- Lot témoin:

Les résultats sont présentés dans la figure 12, histogramme b.

L' administration de la souche virulente B10 à J7 a entraîné une colonisation de moyenne intensité, avec des populations atteignant 10^7 UFC/g de fèces dès trois jours après l' épreuve et pendant une dizaine de jours, la population diminuant alors lentement pour atteindre 10^2 UFC/g de fèces à J35. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques de ce lot (environ 40% de mortalité soit 7 lapins sur 18).

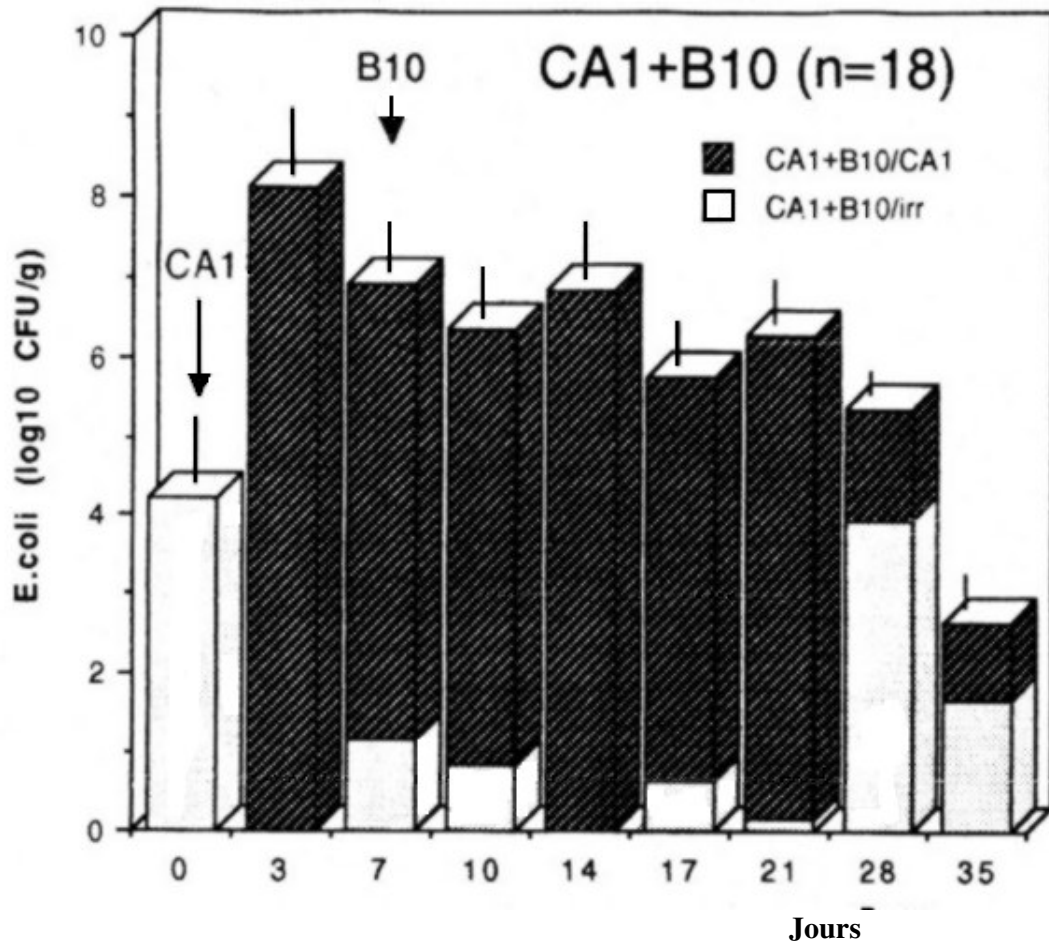


Figure 12, Histogramme a : cinétique des populations colibacillaires du lot vacciné

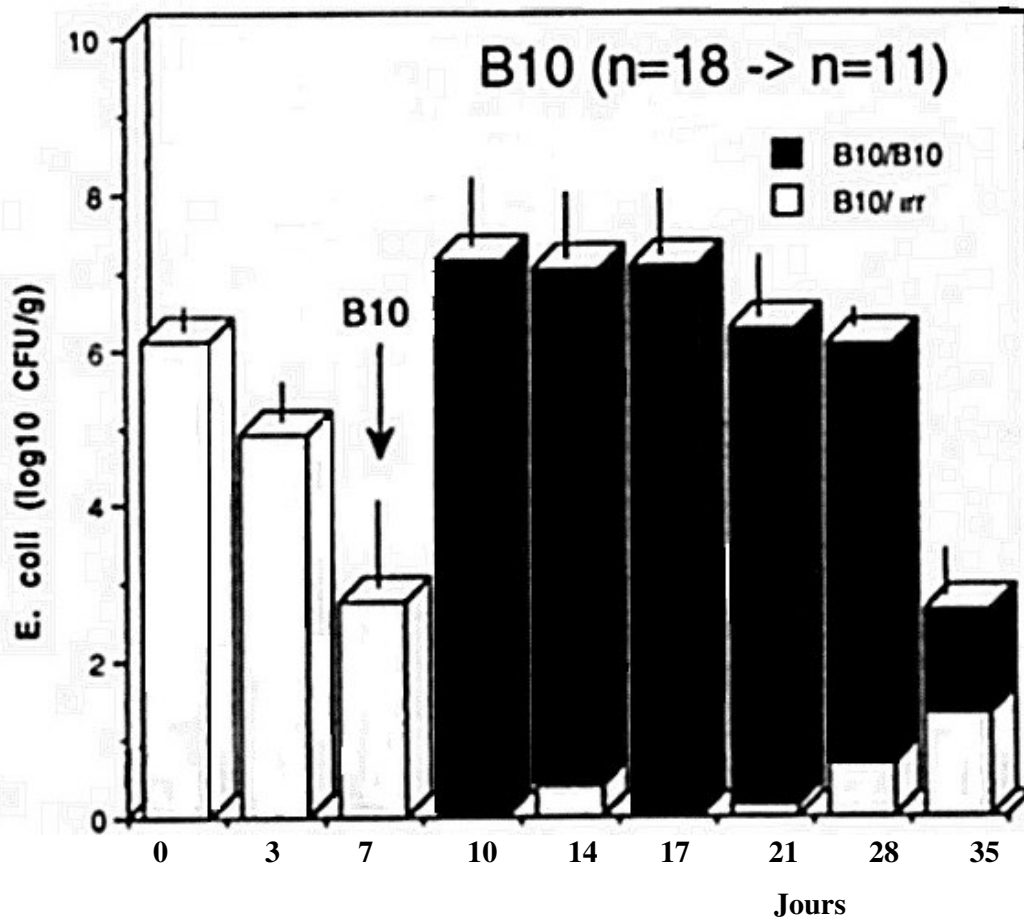


Figure 12, histogramme b : cinétique des populations colibacillaires du lot non vacciné

- Lot vacciné:

Les résultats sont présentés dans la figure 12, histogramme a

La souche CA1/B10, après administration à J0, a présenté une bonne colonisation du tractus digestif. Dès J3, on détectait la souche à des niveaux de population excédant 10^8 UFC/g de fèces. La souche est restée décelable tout au long de l' épreuve, à des taux oscillant entre 10^7 à 10^5 UFC/g de fèces (à J35, aux alentours de 10^2 UFC/g de fèces).

À J7, la souche virulente B10 a été administrée mais n' a jamais été détectée au cours de l' épreuve dans ce lot. La présence de B10/CA1 semble apparemment avoir empêché la colonisation du tube digestif par la souche sauvage B10.

Il est juste de penser que cet effet relève soit d' un phénomène compétitif, d' un effet barrière au niveau de la muqueuse intestinale soit d' une véritable immunisation. Les résultats immunologiques permettront de mieux orienter le phénomène entrant en jeu.

III/ RESULTATS PARASITOLOGIQUES:

L' état parasitologique des animaux a été régulièrement étudié, notamment en recherchant coccidies (Tableau 3) et *Clostridium spiroforme*, par un prélèvement de fèces deux fois par semaine.

Aucun *Clostridium spiroforme* n' a été mis en évidence.

Des coccidies ont pu être trouvées à différentes périodes de l' épreuve et concernant des cages différentes du lot I et II, mais le plus souvent en quantité faible donc non susceptible d' engendrer des troubles digestifs.

Tableau 5: numération de coccidies

	J18	J23	J24	J27	J31
cage 1				13 ook.	2 ook.
cage 2		70 ook.			1 ook.
cage 4					6 ook.
cage 9					131 ook. ^b
cage 11	68 ook.	1 ook.	39 ook. ^a		
cage 12		12 ook.			

ook. = ookyste(s)

a: issus du contenu caecal du lapin N° 7286.

b: dont 130 issus du lapin N° 7249.

IV/ RESULTATS IMMUNOLOGIQUES:

Les cinétiques sont représentées dans la figure 13.

Les deux souches ont induit une apparition dans les fèces d' anticorps de classe IgA sécrétoires (IgAs) anti-lipopolysaccharide O103.

Les lots témoins et vaccinés présentent une courbe conforme à une cinétique classique d' anticorps.

La cinétique du lot vacciné permet d' affirmer que les animaux ont répondu à la stimulation antigénique locale due à l' administration du mutant CA1/B10.

On remarque que CA1 semble avoir un effet inducteur, puisque le taux d' anticorps augmente dès l' administration du mutant.

Notons toutefois que les cinétiques des deux lots ne diffèrent significativement qu' à partir de J14.

Après une dose unique par voie orale, la présence prolongée du mutant CA1/B10 dans le tractus digestif semble donc permettre l' induction d' une réaction immunitaire locale anti EPEC par le biais des IgAs; ce résultat satisfait à l' objectif fixé lors de cette épreuve.

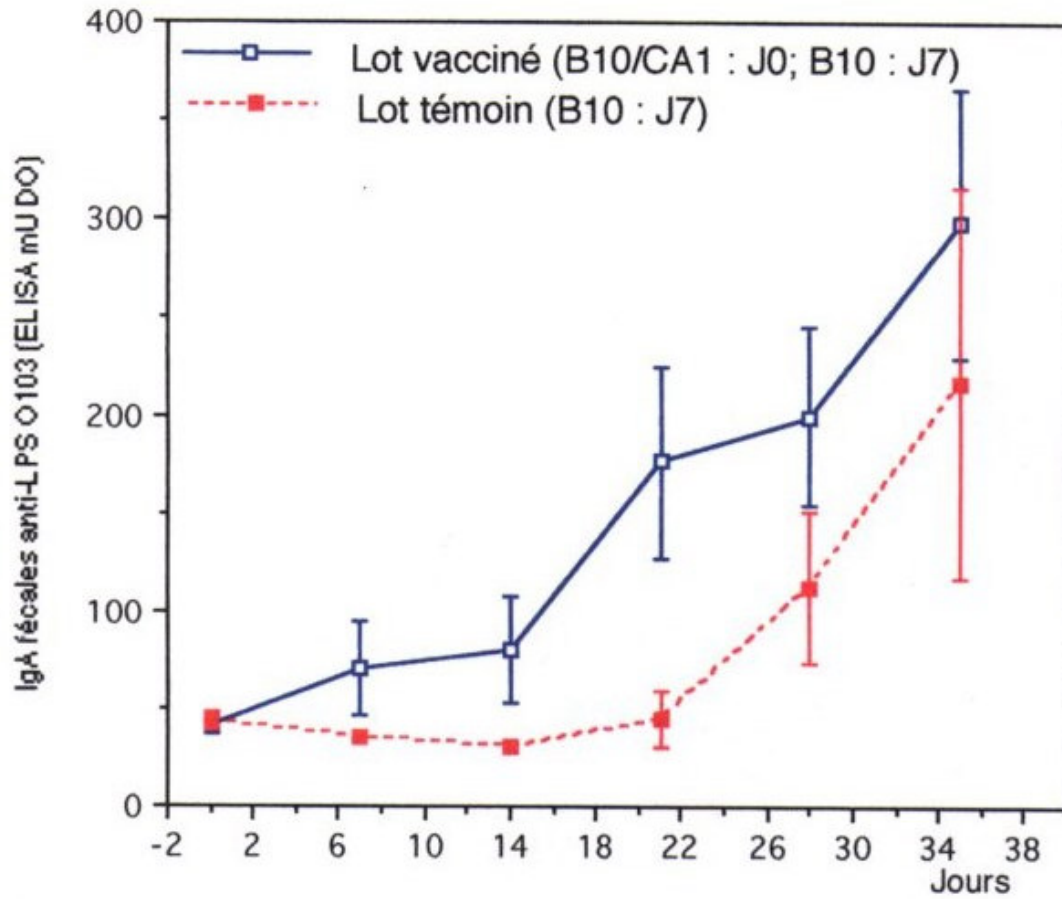


Figure 13 : cinétique d'anticorps anti-LPS O103 de classe IgA détectés dans les fèces chez les animaux des lots témoins et vaccinés

DISCUSSION

Les souches entéropathogènes d'*Escherichia coli* de sérotype O103 rhamnose négatif sont responsables d'affections graves dans les élevages cynicoles français, entraînant d'importantes pertes économiques. La résistance fréquente de ces bactéries aux traitements anti-infectieux ne laisse entrevoir comme seul moyen de contrôle que la vaccination.

Ce travail fait suite à un ensemble de recherches visant à étudier les possibilités d'immunisation du lapin contre la colibacillose O103 réalisé au sein de l'Unité associée INRA/ENVT de microbiologie moléculaire.

Dès 1982, Reynaud, Licois puis Camguilhem ont révélé la haute pathogénicité des souches O103 pour le lapin au sevrage. Les équipes ont orienté leurs recherches vers différents protocoles de vaccination. La souche B10 inactivée par le formol et administrée aux lapereaux au sevrage soit *per os* soit en intradermique, ou directement aux mères par voie orale ou intradermique au cours de la gestation puis de la lactation n'a montré aucune efficacité (Milon et Camguilhem, 1989; Camguilhem, 1986). En revanche, la vaccination *per os* des lapereaux au sevrage offre une protection complète (Camguilhem et Milon, 1991), mais le protocole est trop contraignant pour envisager une application sur le terrain. De nouveaux essais, avec une culture de la souche B10 en milieu Penassay, ont permis d'alléger nettement le protocole précédent tout en conservant une immunité optimale des lapereaux. Ces résultats mettent en avant l'importance de l'adhésine AF/R2, spécifique de la souche O103, dans le processus de stimulation antigénique local.

Parallèlement, la découverte du Locus of Enterocyte Effacement (LEE) chez les souches entéropathogènes humaines, en particulier E2348/69, a permis de mieux expliquer la virulence de ces souches et d'entrevoir de nouvelles opportunités dans le domaine vaccinal, en créant notamment des vaccins vivants atténués doués d'un meilleur pouvoir immunogène.

En 1997, De Rycke *et al.* ont démontré que le locus de virulence LEE est présent chez la souche B10 de sérotype O103. Il crée par mutagenèse cinq mutants différents portant le transposon *TnphoA*, dont CA1/B10 sur lequel ce travail se base, qui tout en conservant l'expression de l'adhésion aux cellules intestinales ne produit toutefois plus d'effet cytopathique sur ces cellules et a perdu sa virulence pour le lapin, qualité primordiale pour une souche vaccinale.

Ce présent travail a été nettement orienté par une meilleure connaissance de la pathogénicité et des gènes de virulence impliqués dans les souches O103:H2:K-.

L' objectif était de prouver l' efficacité et l' innocuité du mutant CA1/B10 lors de la vaccination orale des lapins et de valider un protocole de vaccination applicable en élevage industriel (une seule dose vaccinale administrée par voie orale).

Pour juger du pouvoir de protection du mutant, la manipulation a consisté à comparer les résultats obtenus au niveau clinique, bactériologique et immunologique entre un lot témoin et un lot vacciné, chacun contenant 18 animaux, répartis dans des cages de 3 lapins. Les lots ont été formés de manière homogène et de relative petite taille, ce qui facilite l' observation clinique et allège le nombre de manipulation en laboratoire. Les animaux ont été séparés autant que possible pour éviter des contaminations entre les deux lots. Les cages ont été régulièrement nettoyées, la nourriture et l' eau de boisson régulièrement changées.

Après l' épreuve vaccinale (J0 pour le lot vacciné) et virulente (J7 pour les lots vacciné et témoin), la manipulation repose sur un entretien et une surveillance régulière des animaux et des numérations bactériennes.

Cette manipulation s' est faite sur une durée relativement courte, de 35 jours, mais suffisante pour étudier les paramètres bactériologique et immunologique afin d' établir en fin de manipulation des courbes comparatives.

Les renseignements cliniques nous permettent de supposer que la souche vaccinale a bien protégé les lapereaux puisque tous les animaux du lot vacciné étaient tous vivants et bien portants jusqu' au terme de l' expérimentation.

Les animaux ont bien supporté l' épreuve vaccinale; seul un léger fléchissement du GMQ a été enregistré mais de façon transitoire et n' a aucunement affecté la croissance des animaux. Le système de surveillance clinique est simple: pesée et observation de diarrhées ou mortalités éventuelles.

La différence de GMQ entre les deux lots n' est pas significative mais il faut noter que ce GMQ ne concerne que les lapins survivants du lot témoin soit 11 animaux sur 18 ; on peut donc apprécier une baisse dans le lot témoin en concordance avec l' atteinte de l' état général et les mortalités observées (seulement 11 lapins sur 18 ont survécu dans le lot non vacciné).

Pour le suivi bactériologique, le procédé de prélèvement et de mise en culture est simple, facile à mettre en œuvre, vu le nombre limité d' échantillons. Les colonies de colibacilles sont facilement reconnaissables et la vérification du sérotype des souches, qui repose sur une agglutination rapide sur lame, est facile à réaliser et à interpréter.

Les résultats obtenus sont satisfaisants quant au pouvoir de colonisation de la souche mutante CA1/B10, de niveau élevé et ce pendant tout le temps de l' épreuve. L' effet protecteur de la souche vaccinale pourrait s' appuyer autant sur un effet barrière au niveau de la muqueuse intestinale, puisque la souche B10 n' est en effet jamais retrouvée dans l' lot vacciné, que sur une réelle stimulation antigénique.

Le suivi immunologique, reposant sur la mesure des Immunoglobulines A sécrétoires, technique rapide ayant déjà fait ses preuves, offre les résultats escomptés qui s' accordent avec les numérations colibacillaires de CA1/B10 pour confirmer l' effet protecteur du mutant par stimulation antigénique.

Ces résultats sont positifs et encourageants pour la mise au point d' une vaccination orale en élevage cunivole, à grande échelle. En effet, le mutant CA1/B10 a montré, au cours de cette épreuve, une forte colonisation du tube digestif des animaux après une seule dose vaccinale administrée par voie orale ce qui a suffi à protéger complètement les lapins.

L' unique dose vaccinale est aussi un atout dans les élevages cunivoles où l' effectif des animaux est important et où des manipulations répétées peuvent engendrer un stress indésirable et initiateur de troubles en particulier digestifs. C' est donc un gain de temps précieux et un meilleur respect du bien-être des animaux.

Au vu des résultats cliniques, bactériologiques et immunologiques, le mutant CA1/B10 satisfait donc aux exigences d' innocuité et d' efficacité vaccinale, recherchées dans ce protocole.

Le mutant utilisé a été testé, par Southern blot, en fin d' épreuve, sur des isolats recueillis en cours de manipulation (à J3, J10, J17, J21 et J28) pour évaluer le degré de stabilité du transposon. Celui-ci s' est révélé stable mais un risque de mutations/transpositions spontanées, pouvant altérer l' innocuité et l' efficacité du mutant, ne peut être écarté. Aucun risque ne peut être couru pour la mise sur le marché de vaccins et les études à venir devraient s' orienter vers

des mutants dont les séquences géniques responsables de la virulence seraient tout simplement délétées.

À ce jour, des mutants de ce type ont déjà prouvé leur innocuité et attendent d' être testés dans des protocoles de vaccination.

C' est le cas de la souche sauvage E22 (figure 14) de sérotype O103: H2:K(différente de B10) qui a été utilisée pour dériver de nouveaux mutants car elle est sensible à tous les antibiotiques. Des mutants de E22 ont été construits en échangeant certains gènes du LEE par des allèles mutés par insertion d' une cassette de résistance à un antibiotique (ces mutants obtenus par échange sont différents des mutants obtenus par transposition et sont en particulier beaucoup plus stables).

Les mutants suivants ont été construits à partir de E22: E22 Δ *eae* (gène *eae* muté), E22 Δ *Tir*, E22 Δ *EspA*, E22 Δ *EspB* et E22 Δ *EspD* (Δ pour "délété").

Tous ont montré une perte de virulence pour le lapin. Un double mutant E22 Δ *Tir* Δ *EspB* a été construit et testé dans un protocole vaccinal avec épreuve à J7 ou à J28: il protège très bien sans engendrer aucune clinique ni lésions histopathologiques du tube digestif malgré une bonne colonisation (données non publiées).

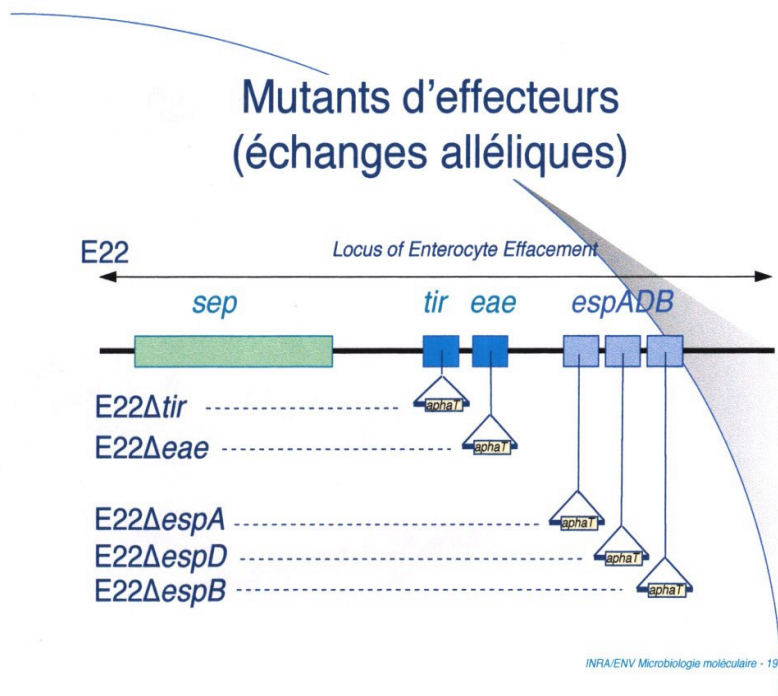


Figure 14 : Mutants d'effecteurs E22

CONCLUSION GÉNÉRALE

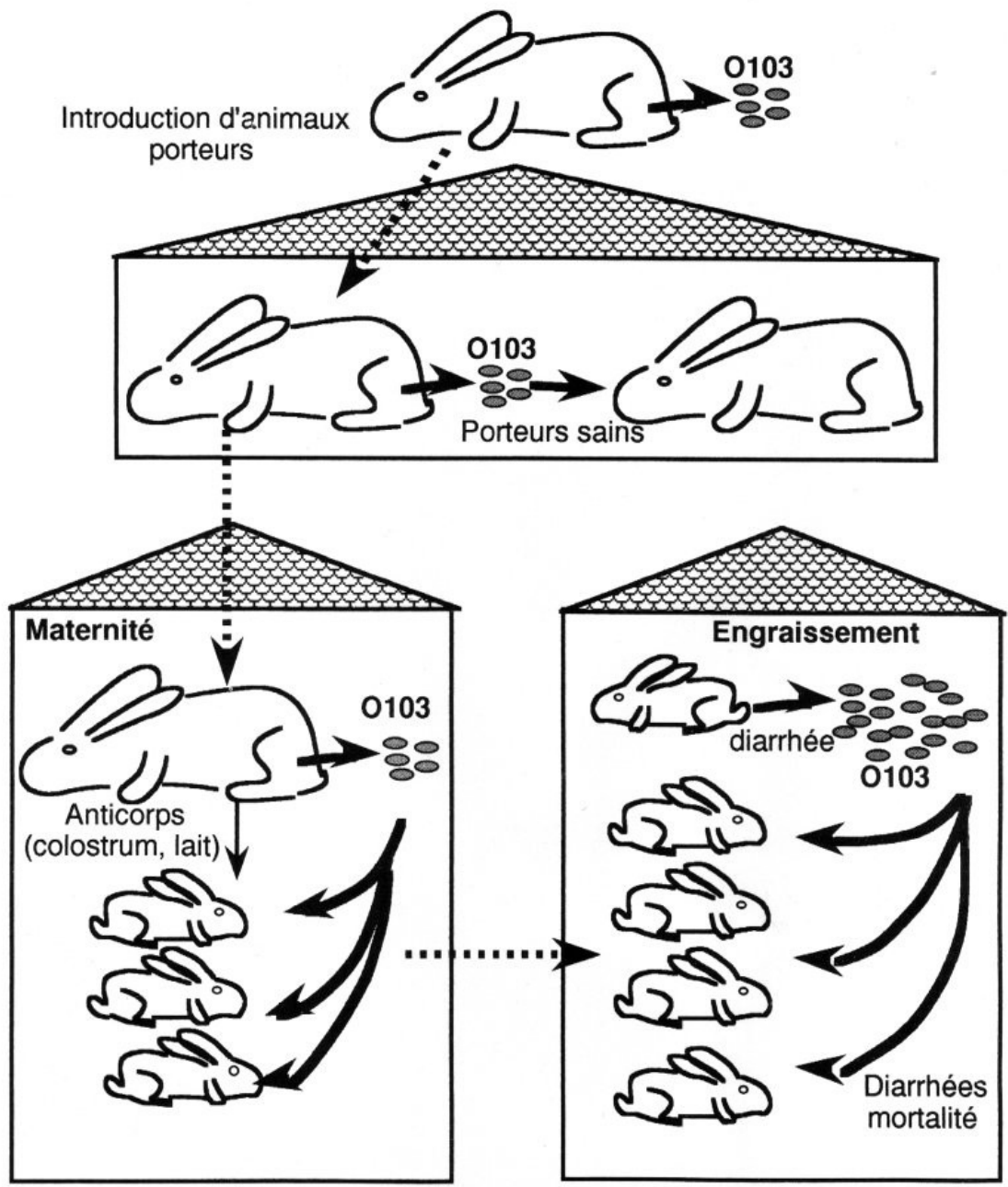


Figure 15 : hypothèses de diffusion des souches d'E. coli O103 dans les élevages (Milon A., 1993)

La colibacillose O103 repose sur un schéma de contamination à partir d' animaux porteurs sains qui doivent être dépistés et éliminés (Figure 15, Milon A., 1993).

L' excrétion fécale parfois massive de colibacilles souligne le rôle important d' un aspect strict des mesures d' hygiène.

Il est évident que si la vaccination semble un moyen prometteur pour le contrôle de la colibacillose O103 dans les élevages cynicoles avec pour objectif l' éradication de celle-ci, il ne faut en aucun cas négliger ces mesures d' hygiène. C' est grâce à leur complémentarité sur le terrain que l' assainissement des élevages pourra être amorcé.

Les avancées techniques et des connaissances permettront peu à peu d' élaborer une souche vaccinale vivante qui sera applicable sur le terrain; les travaux se poursuivent donc en ce sens.

Aujourd' hui l' élevage cynicole a évolué vers une production encore plus intensive avec une conduite en bande unique et pour plus de 90 % des élevages la pratique de l' insémination artificielle.

Ces évolutions associées à une meilleure maîtrise de l' hygiène et une surveillance plus étroite des programmes alimentaires ont sans doute contribué à réguler les pathologies à colibacilles O103.

Toutefois depuis plusieurs années la filière cynicole doit faire face à une nouvelle maladie dont l' agent pathogène n' a encore à ce jour pas été identifié mais qui génère d' importantes pertes économiques principalement en engraissement: il s' agit de l' Entérocrite Epizootique du Lapin ou EEL.

Si l' étiologie demeure encore inconnue, l' atteinte par l' entérocrite favorise le dérèglement de la flore et laisse ainsi l' opportunité à d' éventuels agents pathogènes , tels que les colibacilles O103, de proliférer.

Il semble donc important de poursuivre les travaux engagés dans ce domaine pour approfondir les connaissances de ces souches et élaborer des souches vaccinales exploitables.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALBERT M.J., ALAM K., ANSARUZZAMAN M., MONTANARO J., ISLAM M., FARUQUE S.M., HAIDER K., BETTELHEIM K., TZIPORI S., 1991. Localised adherence and attaching-effacing properties of nonenteropathogenic serotypes of *Escherichia coli*. *Infection Immunity*, **59**, 1864-1868.
2. BALDWIN T.J., KNUTTON S., SELLERS L., MANHARREZ HERNANDEZ H.A, AITKEN A. and WILLIAMS P.H., 1992. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to E. coli hemolysin. *Infection and Immunity*, **60**, 292-295.
3. BENZ I., SCHMIDT MA., 1990. Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Res. Microbiol.*, **141**, 785-786.
4. BERENDSON R., CHENEY CP., SCHAD PA., BOEDECKER EC., 1983. Species-specific binding of purified pili (AF/R1) from the *Escherichia coli* RDEC-1 to rabbit intestinal mucosa. *Gastroenterology*, **85**, 837-845.
5. BETTELHEIM KA., 1996. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: a new problem, an old group of organisms. *Inter faeces et urinam nascimur. Australian Veterinary Journal*, **73:1**, 20-26.
6. BLANCO JE., BLANCO M., BLANCO J., MORA A., BALAGUER L., MOURINO M., JUAREZ A., JANSEN WH., 1996. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of clinical Microbiology*, **34:12**, 3101-3107.
7. BLANCO JE., BLANCO M., BLANCO J., RIOJA L., DUCHA J., 1994. Serotypes, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Spain. *Veterinary Microbiology*, **38:3**, 193-201.
8. BOEDECKER EC., SCHERMAN PM., 1986. Mechanisms of *Escherichia coli* enteritis. *Front. Gastrointest. Res*, **13**, 309-330.
9. BOUCHER S. et NOUAILLE L., 2002. *Maladies des lapins*, Editions France Agricole, 2nde édition, 24-27.
10. BRAINE Agnès, 2002. Le marché cunicole français : production, échanges, consommation. Communication à la journée nationale ITAVI sur l'élevage du lapin de chair à Nantes.
11. BROWNE-ROBINS R.M., TOKHI A.M., ADAMS L.M., BENNETT-WOOD V., MOISIDIO A.V., 1994 Adherence characteristics of attaching-effacing strains of *E. coli* from rabbits. *Infect. Immun.*, **62 :5**, 1584-1592.
12. BRUGERE-PICOUX J., 1995. Affections digestives d'origine infectieuse et/ou parasitaire chez le lapin.. *Pathologie du lapin et des rongeurs domestiques. 2^{ème} édition Chaire de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour (ENVA)*, 109-132.
13. BURROWS MR., SELLWOOD R., GIBBONS RA, 1976. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 269-275.

14. CAMGUILHEM R., 1985. Isolement d' une souche *Escherichia coli* (séro groupe O103), responsable d' entérite colibacillaire du lapin en engraissement. Mise en évidence de son pouvoir pathogène. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **136**, 61-68.
15. CAMGUILHEM R., 1987, Essai de vaccination des lapins par voie intradermique contre l' entérite colibacillaire à *E. coli* O103. *Cuniculture*, N° 74, **14(2)**, 78-80.
16. CAMGUILHEM R., LEBAS F., LABIE C., 1986. Reproduction expérimentale chez le lapin en engraissement d' une diarrhée provoquée par une souche d'*Escherichia coli* de séro groupe O103. *Annales de Recherches Vétérinaires*, **17**, 409-424.
17. CAMGUILHEM R. et MILON A., 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits : clues to diagnosis of pathogenic strains. *Journal of clin. Microb.*, vol. 27, N°4, 743-747.
18. CAMGUILHEM R., MILON A., 1990. Protection of weaned rabbits against *Escherichia coli* O103 intestinal infection by oral formalin-killed vaccine. *Veterinary Microbiology*, **21:4**, 353-362.
19. CAMGUILHEM R., MILON A., 1991. Entérite du lapin à *Escherichia coli* O10. Essais de vaccination. *Productions Animales INRA*, **4:2**, 131-140.
20. CAMGUILHEM R., MILON A., ESSLINGER J., GREGORY JN., MAIRE C., CHMITELIN F., 1991. Vaccination against *Escherichia coli* O103 in rabbits: inactivated vaccine given by the oral route in a situation of permanent infection. *Cuniculture Paris*, N° **101**, 221-225.
21. CANTEY JR., BLAKE RK., 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infection Dis.*, **135**, 454-462.
22. CANTEY JR., INMAN LR., BLAKE RK., 1989. Production of diarrhea in the rabbit by a mutant of *Escherichia coli*(RDEC-1) that does not express adherence(AF/R1) pili. *J. Infect. Dis.*, **160**, 136-141.
23. CANTEY JR., LUSHBAUGH WB., INMAN LR., 1981. Attachment of bacteria to intestinal epithelial cells in diarrhea caused by *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: stages and role of capsule. *J. Infect. Dis.*, **143**, 219-230.
24. COHEN MB., HAWKINS JA., WECKBACH LS., STANECK JL., LEVINE MM., HECK JE., 1993. Colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* in travelers with and without diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 351-353.
25. COLMAIRE M. épouse Doumergue, 1995, Colibacillose O103 du lapin. Essai de vaccination par voie orale, Thèse de doctorat vétérinaire.
26. CRAY WC Jr., THOMAS LA., SCHNEIDER RA., MOON HW., 1996. Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. *Veterinary Microbiology*, **53:3-4**, 369-374.
27. CRYAN B., 1990. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis.*, **22**, 1-4.

28. DE RYCKE J., COMTET E., CHALARENG C., BOURY M., TASCA C., MILON A., 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the Locus of Enterocyte Effacement. *Infection and Immunity*, **65:7**, 2555-2563.
29. DONNENBERG MS., CALDERWOOD SB., DONOHUE-ROLFE A., KEUSCH GT., KAPER JB., 1990. Construction and analysis of *TnPhoA* mutants of Enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, **58**, 1565-1571.
30. DONNENBERG MS., DONOHUE-ROLFE A., KEUSCH GT., 1989. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J. Infect. Dis.*, **160**, 452-459.
31. DONNENBERG MS., KAPER JB., 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.*, **59**, 4310-4317.
32. DONNENBERG MS., KAPER JB., 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **60**, 3953-3961.
33. DONNENBERG MS., KAPER JB., YU J., 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *E. coli* to epithelial cells. *J. Bacteriology*, **175**, 1467-4680.
34. DROLET R., FAIRBROTHER JM., HAREL J., HELIE P., 1994. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **58:2**, 87-92.
35. DRUMM BA., ROBERTSON AM., SHERMAN PM., 1988. Inhibition of attachment of *Escherichia coli* RDEC-1 to intestinal microvillus membranes by rabbit ileal mucus and mucin in vitro. *Infect. Immun.*, **56**, 2437-2442.
36. EDELMAN R., LEVINE MM., 1983. Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **147**, 1108-1118.
37. ESCHERICH T., 1885; Die darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr. Med.*, **3**, 515-522; 547-554.
38. ESSLINGER J., BOURY M., SELEIM RS., MILON A., 1994. Regulation of expression of the adhesin AF/R2 of *Escherichia coli* O103 by bacto-peptone TM. Preliminary results. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145:2**, 125-131.
39. ESSLINGER J., MILON A., CAMGUILHEM R., 1989. Adhesion to erythrocytes and pathogenicity of *Escherichia coli* strains causing enteritis in weaned rabbits. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **140:8-9**, 829-834.
40. FIEDERLING F., BOURY M., PETIT C., MILON A., 1997. Adhesive factor/rabbit 2, a new fimbrial adhesin and a virulence factor from *Escherichia coli* O103, a serogroup enteropathogenic for rabbits. *Infection and Immunity*, **65:2**, 847-851.
41. GOUET P., FONTY G., 1973. Evolution de la flore digestive du lapin holoxénique de la naissance au sevrage. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **13**, 733-735.

42. GOUET P., FONTY G., 1979. Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **19**, 553-566.
43. GORBACH S.L., KEAN B.H., EVANS D.J., BESSUDO D., 1975. Travelers' diarrhea and toxigenic *Escherichia coli*. *N. England J. Med.*, **292**, 933-936.
44. GYLES CL., 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans, XV+666 pages, nombreuses références.
45. HOHMANN A., WILSON MR., 1975. Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to intestinal epithelium in vivo. *Infection and Immunity*, **12:4**, 866-880.
46. JANKE BH., FRANCIS DH., COLLINS JE., LIBAL MC., ZEMAN DH., JOHNSON DD., 1989. Attaching and effacing infections in calves, lambs and dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 6-11.
47. JERSE AE., GICQUELAIS KG., KAPER JB., 1991a. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **59**, 3869-3875.
48. JERSE AE., KAPER JB., 1991b. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by EAF plasmid. *Infect. Immun.*, **59**, 4302-4309.
49. JERSE AE., YU J., TALL BD., KAPER JB., 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7839-7843.
50. KENNY B., FINLAY BB., 1995. Protein secretion by enteropathogenic *E. coli* is essential for transducing signals into epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7991-7995.
51. KENNY B., De VINNEY R., STEIN M., REINSCHEID DJ., FREY E.A. and FINLAY BB., 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**, 511-520.
52. KNUTTON S., 1994. Attaching and effacing *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in domestic animals and humans, 567-586.
53. KNUTTON S., LLOYD DR., Mc NEISH AS., 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.*, **55**, 69-77.
54. KNUTTON S., BALDWIN T., WILLIAMS P.H., Mc NEISH A.S., 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*. *Infection Immunity*, **57**, 1290-1298.
55. LEROY SM., LESAGE MC., CHASLUS-DANCLA E., LAFONT JP., 1994. Presence of *eaeA* sequences in pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from weaned rabbits. *Journal of Medical Microbiology*, **40:2**, 90-94.

56. LEVINE MM., 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., **155**, 377-389.
57. LICOIS D., GUILLOT JF., COUDERT P. et RENAULT L., 1982. Diarrhée expérimentale du lapin: étude de la pathologie due à des coccidies intestinales (*E. intestinalis*) et à des *E. coli*. C.R. des IIIèmes Journées de la Recherche Cunicole, INRA-ITAVI, Paris, Communication N° 27.
58. LICOIS D., 1986. Tyzzer's disease associated with colibacteriosis in rabbits; identification of *Bacillus piliformis* but unsuccessful isolation. Recueil de médecine Vétérinaire, **162:11**, 1203-1209.
59. LICOIS D., 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli* from rabbits. Article de synthèse. Annales de Recherche Vétérinaire, **23:1**, 27-48.
60. LICOIS D., GUILLOT JF., MOULINE C., REYNAUD A., 1992. Susceptibility of the rabbit to an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* O103: effect of animals' age. Annales de Recherches Vétérinaires, **23:3**, 225-232
61. LICOIS D., REYNAUD A., FEDERIGHI M., GAILLARD-MARTINIE B., GUILLOT JF., JOLY B., 1991. Scanning and transmission electron microscopic study of adherence of *Escherichia coli* O103 enteropathogenic and/or enterohemorrhagic strain in enteric infection in rabbits. Infection and Immunity, **59:10**, 3796-3800.
62. LIOR H., GYLES CL., 1994. Classification of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in domestic animals and humans, 31-72.
63. McDANIEL TK., JARVIS KG., DONNENBERG MS. Et KAPER JB, 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci USA, **92**, 1664-1668.
64. MAINIL JG., DAUBE G., JACQUEMIN E., KAECKENBEECK A., POHL P., 1995. Typing of *Escherichia coli* isolated from the intestines of piglets in Belgium by colony hybridization with specific gene probes: enterotoxigenic, verotoxigenic or enteropathogenic isolates. Annales de Médecine Vétérinaire, **139:1**, 5-13.
65. MAINIL J., 1993. *Escherichia coli* yesterday and today: 100 years of pathology. Annales de Médecine Vétérinaire, **137:5**, 321-392.
66. MARENDA M., MILON A., BAUERFEIND R., BOURY M., 1992. Toxines Shiga-like et *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC-like) du lapin sevré. Revue de Médecine Vétérinaire, **143:4**, 333-340.
67. MATTHES S., 1969. Die darmflora gesunder und dysenteric kranker jungkaninchen. ZBL. Vet. Med., **b16**, 563-570.
68. MATTHES S., 1995. Endemic diseases of farmed rabbits. Tierärztliche-Umschau, **50:2**, 124-126, 129-130.

69. MILON A., 1993. Entérite à *Escherichia coli* du lapin : étude des facteurs de virulence des souches O103 pathogènes et applications à la vaccination. Thèse de Doctorat universitaire, 175 pp.
70. MILON A., CAMGUILHEM R., 1989. Essai de protection des lapereaux sevrés contre l'entérite à *Escherichia coli* O103: vaccination des mères avec un vaccin inactivé. Revue de Médecine Vétérinaire, **140:5**, 389-395.
71. MILON A., CAMGUILHEM R., ESSLINGER J., GREGORY JN., 1990a. Vaccination du lapereau sevré contre la colibacillose O103: rôle du LPS et de l'adhésine. Revue de Médecine Vétérinaire, **141:12**, 969-975.
72. MILON A., ESSLINGER J., CAMGUILHEM R., 1990b. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. Infection and Immunity, **58:8**, 2690-2695.
73. MILON A., ESSLINGER J., CAMGUILHEM R., 1992. Oral vaccination of weaned rabbits against enteropathogenic *Escherichia coli* -like *E. coli* O103 infection: use of heterologous strains harboring lipopolysaccharide or adhesin of pathogenic strains. Infection and Immunity, **60:7**, 2702-2709.
74. MILON A., OSWALD E., De Rycke J., 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*, Vet. Res., **30**, 203-219.
75. MOON HW., WHIPP SC., ARGENZIO RA., LEVINE MM., GIANELLA RA., 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infection and Immunity, **41:3**, 1340-1351.
76. NADEAU M., 1993. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Médecine Vétérinaire du Québec, **23:3**, 133-136.
77. NOUGAYREDE J.P., MARCHES O., BOURY M., MAINIL J., CHARLIER G., POHL P., De RYCKE J., MILON A. et OSWALD E., 1999. The long term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic *E. coli* is Esp dependent but intimin independent, Molecular Microbiology, **31(1)**, 19-30.
78. OKERMAN L., 1987. Enteric infections caused by non-enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals: occurrence and pathogenicity mechanisms. A review. Veterinary Microbiology, **14:1**, 33-46.
79. OKERMAN L., 1988. Diseases of domestic rabbits. 152 pp, 73-83.
80. OKERMAN L., DEVRIESE LA., COUSSEMENT W., LINTERMANS P., 1985. Pathogenic effects of an entero-adhesive (APEC-type) *E. coli* strain on weanling rabbits. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, **54:1**, 9-16.
81. OKERMAN L., DEVRIESE LA., 1985. Biotypes of enteropathogenic *E. coli* strains from rabbits. J. Clin. Microbiol., **22**, 955-958.
82. ØRSKOV F., ØRSKOV I., 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods Microbiol., **14**, 43-112.

83. PEETERS JE., 1993. Enteropathogenic strains of *Escherichia coli* in rabbits. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **137:5**, 361-368.
84. PEETERS JE., CHARLIER GT., RAEYMAEKERS R., 1985. Scanning and transmission electron microscopy of attaching and effacing *Escherichia coli* in weanling rabbits. *Vet. Pathol.*, **22**, 54-59.
85. PEETERS JE., GEEROMS R., ØRSKOV F., 1988. Biotype, serotype and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect. Immun.*, **56**, 1442-1448.
86. PEETERS JH., CHARLIER GJ., HALEN PH., 1984a. Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for newborn rabbits. *Infect. Immun.*, **46**, 690-696.
87. PEETERS JE., POHL P., OKERMAN L., DEVRIESE LA., 1984b. Pathogenic properties of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, **20**, 34-39.
88. PERCY DH., MUCKLE CA., HAMPSON RJ., BRASH ML., 1993. The enteritis complex in domestic rabbits: a field of study. *Canadian Veterinary Journal*, **34:2**, 98-102.
89. PILLIEN F., CHALARENG C., BOURY M., TASCA C., De RYCKE J., MILON A., 1996. Role of Adhesive Factor/Rabbit 2 in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* O103 diarrhea of weaned rabbit. *Veterinary Microbiology*, **50:1-2**, 105-115.
90. POHL P., 1993. The history and classification of the pathogenic strains of *Escherichia coli*. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **137:5**, 325-333.
91. POHL P., LINTERMANS P., KAECKENBEECK A., DE MOL P., VAN MUYLEN K., SCHOTTE M.; 1983. Existence de différents types d' *Escherichia coli* pathogènes pour l' intestin du veau. *Ann. Méd. Vét.* **127**, 37-41.
92. POHL P., LINTERMANS P., MAINIL J., KAECKENBEECK A., BERTELS A., 1987. Study of the phenotypes and virulence factors of *Escherichia coli* Att25. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **131:6**, 429-439.
93. PRESCOTT JF., 1978a. *Escherichia coli* and diarrhea in the rabbit. *Vet. Pathol.*, **15**, 237-248.
94. PRESCOTT JF., 1978b. Intestinal disorders and diarrhea in the rabbit. *Veterinary Bulletin*, **48:6**, 475-480.
95. RENAULT L., PRIM R., DREUILLE M. de, COLIN M., De DREUILLE M., 1979. Digestive disorders in fattening rabbits; Aetiological and preventive approach. *Bulletin mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*, **63:2**, 119-132.
96. RENAULT L., ROUX J., Le BOURHIS E., COUDERT P., LICOIS D., GUILLOT JF., 1983. Description d' un sérotype(O103) d'*Escherichia coli* entéropathogène chez le lapin au sevrage. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, **56**, 387-400.

97. REYNAUD A., FEDERIGHI M., 1991. Study of virulence of *Escherichia coli* O103 responsible for enteritis in rabbits. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **142:11**, 817-821.
98. RILEY L.W., LEWIS R.S., HELGERSON S.D., Mc GEE H.B., WELLS J.G., DAVIS B.R., HERBERT R.J., OLCOTT E.S., JOHNSON L.M., HARGERETT N.T., BLAKE P.A. et COHEN M.L., 1983. Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 681-685.
99. ROSE R., WHIPP SC., MOON HW., 1987. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits and lambs. *Veterinary Pathology*, **24:1**, 71-79.
100. SANFORD J.C., 1996. The domestic rabbit, 5^{ème} édition, pp. 157-158.
101. SANSONETTI PJ., 1985. *Escherichia coli* entéropathogènes: données récentes sur la virulence. *Bull. Inst. Pasteur*, **83**, 5-18.
102. SANSONETTI PJ., 1990. Atténuation de la virulence bactérienne et construction de vaccins vivants. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités*, **1**, 195-199.
103. SAVARINO S.J., FASANO A., ROBERTSON D.C. and LEVINE M.M., 1991. Enteroggregative *E. coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1450-1455.
104. SCOTLAND SM., WILLSHAW GA., SMITH HR., ROWE B., 1990. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. *Journal of Infectious Diseases*, **162:5**, 1069-1074.
105. SMITH H.W. and HALLS S., 1967. Observation by the ligated segment and oral inoculation methods on *E. coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Path. Bact.*, **93**, 499-530.
106. TESH VL., O' BRIEN AD., 1992. Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Mini-review. *Microb. Pathog.*, **12**, 245-254.
107. TRAN CONG T., MILON A., BOURY M., TASCA C., 1992. Colicines et effets de barrière écologique dans l' entérocolite *Æ. coli* O103 du lapin sevré, *Rev. Méd. Vét.*, **143**, 655-665.
108. TZIPORI S., 1985. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, **29**, 103-206.
109. TZIPORI S., GIBSON R., MONTANARO J., 1989. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infection and Immunity*, **57:4**, 1142-1150.
110. WOLF MK., ANDREWS GP., FRITZ DL., SJOGREN RW. Jr., BOEDECKER EC., 1988. Characterization of the plasmid from *Escherichia coli* RDEC-1 that mediates expression of adhesin AF/R1 and evidence that AF/R1 pili promote but are not essential for enteropathogenic disease. *Infect. Immun.*, **56**, 1846-1857.

111. WOLF MK., BOEDECKER EC., 1990. Cloning of the genes for AF/R1 pili from rabbit enteroadherent *Escherichia coli* RDEC-1 and DNA sequence of the major structural subunit. *Infect. Immun.*, **58**, 1124-1128.