

INFLUENCE DU SEVRAGE PRÉCOCE SUR LA SENSIBILITÉ DES LAPEREaux À UNE INFECTION EXPÉRIMENTALE PAR UNE SOUCHE D'*ESCHERICHIA COLI* ENTÉROPATHOGÈNE O103:H2.

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Cécile, Laure COUDERT
Née, le 15 octobre 1980 à MAURIAC (Cantal)

Directeur de thèse : Mlle le Docteur Séverine BOULLIER

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mlle Séverine BOULLIER
M. Jean-Luc GUERIN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Toulouse, 2004

NOM : COUDERT

PRENOM : Cécile

TITRE : Influence du sevrage précoce sur la sensibilité des lapereaux à une infection expérimentale par une souche d'*Escherichia coli* entéropathogène O103:H2.

RESUME :

La période du péri-sevrage en production cunicole est particulièrement difficile à gérer pour les éleveurs qui doivent concilier les impératifs de gestion et une sensibilité accrue des lapereaux aux infections notamment digestives. Notre travail a pour but d'étudier les effets d'un sevrage précoce sur la sensibilité digestive des lapereaux en utilisant un modèle d'infection par une souche de colibacilles entéropathogènes : la souche E22 O103 : H2. Deux lots de lapereaux naïfs, sevrés respectivement à 21 et 35 jours, sont infectés à 28 jours. Un suivi clinique, bactériologique et sérologique a été réalisé pendant 8 semaines. Les résultats ont montré que l'allaitement retarde l'apparition des signes cliniques en limitant la colonisation digestive des bactéries. Cet effet protecteur disparaît dès le sevrage. Des études sont en cours pour comprendre les mécanismes et les facteurs impliqués dans cette protection.

MOTS-CLES : LAPIN, *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATHOGENE (EPEC), SEVRAGE, LAIT

TITLE : Role of an early weaning on digestive sensitivity of young rabbits to experimental infection by an enteropathogenic *E.coli* strain O103:H2.

ABSTRACT :

In rabbit breeding units, the pre and post weaning period is very difficult to manage for the stockbreeders who must conciliate economical imperatives and an increased sensitivity notably to digestive infections. Our work aims to study the early weaning's effects on the sensitivity of the young rabbits using the infection model by a pathogenic strain of enteropathogenic *E.coli* the E22 O103 : H2 strain. Two groups of young rabbits, weaned respectively at 21 and 35 days, are infected at 28 days. During 8 weeks, a clinical, bacterial and serologic follow-up was done regularly. It shows that the maternal milk intake offers a temporary protection against the development of the clinical signs. This protective effect disappears just after the weaning. New studies are undergoing in the laboratory to understand the mechanisms involved in the protection.

KEY WORDS : RABBIT, ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* (EPEC), WEANING, MILK

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

| | | |
|-----------------------------|------|------------------|
| Directeur | : M. | P. DESNOYERS |
| Directeurs honoraires..... | : M. | R. FLORIO |
| | M. | J. FERNEY |
| | M. | G. VAN HAVERBEKE |
| Professeurs honoraires..... | : M. | A. BRIZARD |
| | M. | L. FALIU |
| | M. | C. LABIE |
| | M. | C. PAVAU |
| | M. | F. LESCURE |
| | M. | A. RICO |
| | M. | A. CAZIEUX |
| | Mme | V. BURGAT |
| | M. | D. GRIESS |
| | M. | J. CHANTAL |
| | M. | J.-F. GUELFY |
| | M. | M. EECKHOUTTE |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

| | |
|----|--|
| M. | CABANIE Paul, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i> |
| M. | DARRE Roland, <i>Productions animales</i> |
| M. | DORCHIES Philippe, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i> |
| M. | TOUTAIN Pierre-Louis, <i>Physiologie et Thérapeutique</i> |

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

| | |
|----|--|
| M. | AUTEFAGE André, <i>Pathologie chirurgicale</i> |
| M. | BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i> |
| M. | BRAUN Jean-Pierre, <i>Physique et Chimie biologiques et médicales</i> |
| M. | DELVERDIER Maxence, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i> |
| M. | EUZEBY Jean, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i> |
| M. | FRANC Michel, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i> |
| M. | MARTINEAU Guy-Pierre, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i> |
| M. | MILON Alain, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i> |
| M. | PETIT Claude, <i>Pharmacie et Toxicologie</i> |
| M. | REGNIER Alain, <i>Physiopathologie oculaire</i> |
| M. | SAUTET Jean, <i>Anatomie</i> |
| M. | SHELCHER François, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i> |

PROFESSEURS 2^e CLASSE

| | |
|-----|---|
| Mme | BENARD Geneviève, <i>Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale</i> |
| M. | BERTHELOT Xavier, <i>Pathologie de la Reproduction</i> |
| M. | CONCORDET Didier, <i>Mathématiques, Statistiques, Modélisation</i> |
| M. | CORPET Denis, <i>Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires</i> |
| M. | DUCOS Alain, <i>Zootechne</i> |
| M. | DUCOS DE LAHITTE Jacques, <i>Parasitologie et Maladies parasitaires</i> |
| M. | ENJALBERT Francis, <i>Alimentation</i> |
| M. | GUERRE Philippe, <i>Pharmacie et Toxicologie</i> |
| Mme | KOLF-CLAUW Martine, <i>Pharmacie - Toxicologie</i> |
| M. | LEFEBVRE Hervé, <i>Physiologie et Thérapeutique</i> |
| M. | LIGNEREUX Yves, <i>Anatomie</i> |
| M. | PICAVET Dominique, <i>Pathologie infectieuse</i> |

PROFESSEUR ASSOCIE

| | |
|----|---|
| M. | HENROTEAUX Marc, <i>Médecine des carnivores</i> |
|----|---|

INGENIEUR DE RECHERCHES

| | |
|----|---|
| M. | TAMZALI Youssef, <i>Responsable Clinique équine</i> |
|----|---|

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

| | |
|-----|--|
| Mme | MICHAUD Françoise, <i>Professeur d'Anglais</i> |
| M. | SEVERAC Benoît, <i>Professeur d'Anglais</i> |

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MAREnda Marc, *Pathologie de la reproduction*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
N. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER ;
Professeur des Universités et Praticien hospitalier de Virologie
Qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.
Mes vifs remerciements et mes hommages respectueux.

A notre jury de thèse

Mademoiselle le Docteur Séverine BOULLIER ;
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour l'Immunologie
générale et médicale
Qui a permis la réalisation de ce travail.
Mille mercis pour ses conseils avisés et sa disponibilité.

Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN ;
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour les Productions
animales
Qui nous fait l'honneur et le plaisir de participer à notre jury de thèse.
Sincères remerciements.

Sincères remerciements à toute l'équipe de l'UMR 1225 INRA-ENVT et en particulier à Christian pour sa patience et pour avoir partagé avec moi son savoir faire, ainsi qu'à l'équipe UR52 de l'INRA d'Auzeville et surtout à Mélanie pour sa très grande implication dans ce projet et sa disponibilité. Bon courage pour la suite.

Merci à Julien, Catherine, les ostéopathes du dessus et Anne, la cyber base de saint Julien, qui ont rendu possible la rédaction de cette thèse par leur générosité et leur gentillesse.

De gros bisous à tous mes amis : Maud, ma grande sœur Isa, Elodie, Tiphaine, Michou, Mathilde, Alex et Micky, Adeline ... Qui ont fait de ces cinq années des moments inoubliables (heureux, douloureux ou inavouables). Nos innombrables préchauff' resteront gravées dans ma mémoire ! Bonne chance à tous dans vos nouvelles vies, j'espère en faire parti pendant encore longtemps.

A tout ceux dont j'ai croisé le chemin et qui font de moi ce que je suis aujourd'hui.....

A Panova, ma petite et svelte toutoune, fidèle à mes côtés en toutes circonstances.

A toute ma famille, spécialement à mes grands-parents, pour tout l'amour qu'ils m'ont toujours communiqué. Ou qu'ils soient j'espère qu'ils sont fiers de moi.

A ma petite sœur Laure pour m'avoir supportée depuis vingt ans déjà ! Beaucoup de bonheur pour l'avenir.

Et enfin à mes parents pour leur soutien inébranlable, leur amour inconditionnel et leur confiance. Je les embrasse très fort et leur dédie cette thèse comme symbole de mon affection et de ma reconnaissance pour les sacrifices consentis.

Table des matières

| | |
|--|----|
| REMERCIEMENTS..... | 5 |
| LISTE DES FIGURES..... | 13 |
| LISTE DES ANNEXES..... | 14 |
| INTRODUCTION..... | 15 |
| I Physiologie digestive et immunologie des lagomorphes..... | 17 |
| 1°) Bases anatomiques et physiologiques digestives..... | 17 |
| a) Quelques notions d'anatomie..... | 17 |
| b) Transit digestif et caecotrophie..... | 17 |
| 2°) Aspects spécifiques d'espèces des organes digestifs lymphoïdes..... | 19 |
| a) Distribution anatomique..... | 19 |
| b) Structure et développement..... | 19 |
| 3°) Le système immunitaire mucosal des lagomorphes..... | 20 |
| a) Développement du répertoire d'anticorps..... | 20 |
| b) Transport des antigènes et fonctions des cellules présentatrices de l'antigène dans les tissus mucosaux..... | 21 |
| c) Production et transport des immunoglobulines..... | 22 |
| 4°) Sevrage et physiologie digestive..... | 24 |
| a) Comportement alimentaire des lapereaux..... | 24 |
| b) Composants bioactifs du lait maternel..... | 24 |
| c) Sevrage et évolution de la microflore intestinale..... | 25 |
| d) Sevrage et physiologie de la digestion..... | 26 |
| II <i>Escherichia coli</i> et colibacillose..... | 27 |
| 1°) Epidémiologie..... | 27 |
| 2°) Manifestations cliniques et autopsiques..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3°) Pathogénicité des EPEC..... | 28 |
| III Objectifs et principe du protocole..... | 29 |
| MATERIEL ET METHODES..... | 31 |
| I Animaux et logement..... | 33 |
| II Alimentation..... | 34 |
| III Inoculation..... | 34 |
| IV Mesures..... | 35 |
| 1°) Etat sanitaire..... | 35 |
| 2°) Pesée individuelle et mesure d'ingestion..... | 35 |
| 3°) Récolte de fécès et bactériologie..... | 35 |
| 4°) Analyse sanguine et test ELISA..... | 36 |
| 5°) Autopsie..... | 37 |
| 6°) Analyses statistiques..... | 38 |
| RESULTATS..... | 39 |
| I Contrôle des animaux avant expérimentation..... | 41 |
| II Contamination incontrôlée des lots I42 et NI..... | 41 |
| III Etat sanitaire et analyse de survie..... | 43 |
| 1°) Etude de la morbidité..... | 43 |
| 2°) Analyse de survie..... | 45 |
| IV Mesure de poids individuel et d'ingestion..... | 47 |
| 1°) Mesure de poids individuel..... | 47 |
| 2°) Mesure d'ingestion..... | 49 |

| | |
|----------------------------------|----|
| V Bactériologie fécale..... | 51 |
| VI Sérologie..... | 53 |
| DISCUSSION..... | 55 |
| ANNEXES..... | 61 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 69 |

Liste des figures

Figure 1 : Influence du sevrage sur la morbidité des animaux lors d'une infection par *E.coli* O103.....42

Figure 1 bis : Influence du sevrage sur la mortalité des lapereaux lors d'une infection par *E.coli* O103.....44

Figure 2 : Evolution du gain de poids relatif des différents lots.....46

Figure 2 bis : Etude statistique des données d'ingestion et de gain de poids relatif des différents lots.....46

Figure 3 : Evolution du poids absolu des animaux des lots S21-I28 et S35-I28.....48

Figure 4 : Evolution de l'excrétion de colibacilles totaux et de la souche E22 par les lots S21-I28 et S35-I28.....50

Figure 5 : Comparaison des résultats de densité optique issus des tests ELISA des lots S21-I28 et S35-I28.....52

Liste des annexes

Annexe 1 : Répartition des cages des animaux dans le bâtiment d'élevage.....63

Annexe 2 : Composition de l'aliment des lapereaux.....64

Annexe 3 : Planning général de l'expérimentation.....65

Annexe 4 : Grille de notation des éléments de l'inspection sanitaire des lapereaux.....66

Annexe 5 : Fiche de saisie des résultats des bactériologies fécales des animaux.....67

Annexe 6 : Fiche individuelle descriptive des résultats des autopsies des lapereaux.....68

INTRODUCTION

I Physiologie digestive et immunologie des lagomorphes

1°) Bases anatomiques et physiologiques digestives

(¹)

a) Quelques notions d'anatomie

Chez un lapin adulte, le tube digestif a une longueur totale d'environ 4.5 à 5 m. Après un œsophage court, on trouve un estomac simple formant un réservoir contenant à peu près 100g d'un mélange d'aliments plus ou moins pâteux. L'intestin grêle mesure environ 3 m de longueur pour un diamètre moyen de 1cm et présente un contenu essentiellement liquide. L'intestin grêle débouche à la base du cæcum qui mesure aux alentours de 45cm de longueur et 3.5 cm de diamètre. Il contient de 100 à 120g d'une pâte homogène. A son extrémité, l'appendice cæcale voit son diamètre diminuer. Sa paroi est le siège de nombreux tissus lymphoïdes. A proximité de l'abouchement de l'intestin grêle, se trouve le départ du côlon. Le cæcum est donc un cul-de-sac branché en dérivation sur l'axe intestin grêle-côlon. Le contenu digestif y circule de la base vers la pointe en passant par le centre du cæcum, puis revient vers la base, le long de la paroi. Il transite ensuite vers le côlon mesurant environ 1.5m et subdivisé en côlon proximal, bosselé, et côlon distal parfaitement lisse.

De manière générale, il convient donc de souligner le grand développement des deux réservoirs que sont l'estomac et le caecum, contenant à eux seuls jusqu'à 80% du contenu sec total du tube digestif.

Relativement plus développé chez le jeune que chez l'adulte, le tube digestif a pratiquement atteint sa taille définitive chez un lapin dès 2,5-2,7 kg alors que l'animal ne pèse encore que 60 % au maximum de son poids adulte.

b) Transit digestif et caecotrophie

Jusqu'à l'étage du caecum, le fonctionnement du tube digestif du lapin est tout à fait comparable à celui des autres monogastriques. En revanche, le côlon possède une activité tout

à fait originale. En effet, si le contenu caecal s'engage dans le côlon en début de matinée, il est entouré par un mucus sécrété par la paroi colique mais subit peu de transformations biochimiques. On aboutit à la formation de grappes allongées appelées crottes molles ou caecotrophes. Par contre, si le contenu caecal s'engage dans le colon à un autre moment de la journée, il reçoit un traitement mécanique visant à récupérer la fraction liquide qu'il renferme et à former des crottes dites dures. Le côlon des lagomorphes a donc la capacité de fabriquer deux types de crottes : les crottes dures évacuées dans la litière et les crottes molles réingérées par le lapin dès leur émission au niveau de l'anus.

Le comportement de caecotrophie débute chez le jeune dès l'âge de trois semaines lorsqu'ils commencent à ingérer des aliments solides en plus du lait maternel. Il présente un intérêt nutritionnel non négligeable puisque les caecotrophes sont constituées pour moitié des résidus alimentaires non totalement digérés et des restes des sécrétions digestives, et pour l'autre moitié par les corps des bactéries qui se sont développées dans le caecum. Il s'agit donc d'un apport important en protéines de haute qualité biologique et de vitamines hydrosolubles. La composition des caecotrophes est relativement indépendante de la nature du régime alimentaire mais nécessite toutefois un apport de lest minimum assurant un transit digestif convenable. Elle est par contre très sensible à l'intégrité de la flore digestive de l'animal.

2°) Aspects spécifiques d'espèce des organes

lymphoïdes digestifs

a) Distribution anatomique ⁽²⁾

Chez les lagomorphes, les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) présentent une répartition tout à fait originale en trois sites distincts.

L'appendice, situé à l'extrémité caudale du cæcum, et le sacculus rotundus, localisé au niveau de la jonction iléo-cæcale, sont spécifiques des lagomorphes.

Les plaques de Peyer, disséminées le long de l'intestin grêle sont quant à elles des structures lymphoïdes communes à tous les mammifères.

b) Structure et développement

Les plaques de Peyer se présentent sous la forme de dômes affleurant dans la lumière intestinale ⁽²⁾. Leur centre germinatif folliculaire constitué de cellules B et divisé en deux zones, claire et sombre, est recouvert par un manteau de cellules lymphoïdes T. Il est lui-même surmonté d'un épithélium spécifique constitué de cellules M (cf infra). Les plaques de Peyer ont les mêmes structures et fonctions que dans les autres espèces. Les seules différences résident dans le nombre de plaques de Peyer le long de l'intestin et dans le nombre de follicules à l'intérieur de chacune d'elles.

L'appendice est composé de plusieurs centaines de follicules lymphoïdes dont l'organisation est similaire à celle des plaques de Peyer.

A la naissance, l'appendice ne mesure que 2.5cm de long et ne présente aucune organisation cellulaire. A l'âge de 6 semaines, il mesure 9cm et commence à développer une architecture en follicules avec une répartition régionale des cellules B. A partir de 9 semaines s'opèrent de profonds changements qui aboutissent rapidement à la conformation et la distribution cellulaire de l'appendice de l'adulte. Comme nous le détaillerons plus tard, ces modifications structurelles au cours du développement ont récemment été mises en relation avec le rôle de l'appendice dans la maturation du système immunitaire.

Le sacculus rotundus présente la même évolution morphologique que l'appendice.

3°) Le système immunitaire mucosal des lagomorphes

Le système immunitaire mucosal est responsable de la réponse immunitaire contre les bactéries, virus, protozoaires ou autres agents pathogènes qui infectent les animaux par voie intestinale, respiratoire ou génitale. Chez le jeune ou l'adulte, cette réponse immunitaire met dans un premier temps en jeu les cellules B et T qui résident dans les tissus lymphoïdes organisés au niveau de ces sites mucosaux comme les plaques de Peyer. Mais sa fonction ne se limite pas à la seule protection ; il intervient aussi dans la constitution d'un répertoire diversifié d'anticorps.

a) Développement du répertoire d'anticorps

Le développement des cellules B chez les lagomorphes est différent de celui des autres espèces de mammifères. Chez l'homme, la souris, le rat, le réarrangement, au sein de la moelle osseuse, des gènes codant pour les différentes chaînes constituant les anticorps contribuent à la création d'un répertoire d'anticorps. Chez le lapin, même si ces réarrangements existent, ils utilisent un nombre restreint de gènes et autorisent le développement d'un répertoire d'anticorps ayant des spécificités pour un panel limité d'antigènes originaux rencontrés dans l'environnement (³). L'organisme du lapin a développé un système similaire à celui rencontré chez le poulet à savoir la conversion et l'hypermutation de gènes qui ont lieu très tôt au niveau de la Bourse de Fabricius. Chez les lagomorphes, un processus similaire débute à six semaines d'âge dans l'appendice. Chez le jeune cette structure présente de grandes similitudes au niveau de la morphologie et de la distribution des cellules lymphoïdes avec la Bourse de Fabricius des volailles. Chez les volailles, la diversification est un processus qui prend fin 12 à 15 jours après la naissance lorsque la Bourse de Fabricius commence à involuer. Chez le lapin, l'activité est maximale entre la 4^{ème} et la 8^{ème} semaine d'âge. En revanche comme nous l'avons vu précédemment l'appendice n'involue pas mais subit des changements morphologiques et cellulaires. Les nouvelles fonctions de l'appendice pourraient alors inclure la réponse spécifique d'antigène des cellules B au sein du centre germinatif, amenant à la production des cellules B sécrétrices d'immunoglobulines A. Le sacculus rotundus semble avoir la même fonction que l'appendice dans la diversification du répertoire d'anticorps. Ainsi l'ablation à la naissance de

l'appendice, du sacculus rotundus et des plaques de Peyer, conduit-elle à l'obtention d'animaux immunologiquement déficient même s'ils possèdent un taux d'anticorps circulant normal. Ceux-ci ne peuvent en effet reconnaître qu'un nombre limité d'antigènes.

Suite au sous-développement à la naissance des organes lymphoïdes périphériques, les lagomorphes possèdent peu d'anticorps à ce moment de leur vie. La production d'immunoglobulines n'est détectée qu'à une semaine d'âge au niveau de l'appendice et à quatre semaines d'âge au niveau de la rate (⁴). Les lapins naissent donc avec un système humoral qui n'est pas pleinement fonctionnel et qui se développe dans les premières semaines de vie notamment au niveau de l'appendice. Ils sont par conséquent très dépendant de la protection conférée par les anticorps présents dans le colostrum et le lait maternels.

b) Transport des antigènes et fonctions des cellules présentatrices de l'antigène dans les tissus mucosaux

La transcytose des antigènes est un pré-requis indispensable à l'établissement d'une réponse immunitaire mucosale efficace. Au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin, l'antigène est transporté depuis la lumière de l'intestin vers les tissus lymphoïdes par des épithéliums associés à des follicules spécialisés constitués de cellules M. Celles-ci ont une structure très proche chez tous les Mammifères (⁵). Ces cellules ont pour caractéristiques de posséder à leur surface basolatérale de nombreux microplis (microfold en anglais) ainsi qu'un grand nombre de vésicules vraisemblablement impliquées dans des mécanismes de transport actif. Elles sont par ailleurs en relation étroite avec des cellules lymphoïdes dont l'importance du développement des micro organites tels que l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique granuleux, révèle une activité intense.

Le taux d'antigènes captés par les cellules M est en partie dépendant de la capacité de ceux ci à adhérer à leur surface. Les cellules M expriment des récepteurs de surface pour les polysaccharides bactériens ainsi que des récepteurs spécifiques des immunoglobulines A sécrétoires. Les particules d'antigène qui se localisent à la surface apicale des cellules M sont

internalisées au niveau de puits couverts ou non et sont transportées dans des vésicules vers les cellules présentatrices de l'antigène. Celles-ci ingèrent et dégradent les antigènes transcytosés et les disséminent à travers les régions folliculaires et inter folliculaires afin de stimuler la réponse immunitaire des cellules B et T muco-sales.

c) Production et transport des immunoglobulines

En 1963, les scientifiques mettent en évidence la prédominance des immunoglobulines A dans les sécrétions intestinales⁽⁶⁾. Peu de temps après, il est démontré que ces dernières ont une structure différente de leurs homologues présentes dans le sérum⁽⁷⁾. En effet, dans les sécrétions, les immunoglobulines A sont organisées en dimère et associées à deux chaînes polypeptidiques ; l'ensemble portant le nom d'immunoglobuline A sécrétoire^(8,9).

La première chaîne polypeptidique décrite porte le nom de composant sécrétoire. Il s'agit en fait de la partie extracellulaire clivée d'une protéine transmembranaire exprimée à la surface basolatérale des cellules épithéliales et servant de récepteur polyimmunoglobuline. Le composant sécrétoire joue donc un rôle dans le transport des immunoglobulines A mais permet également de stabiliser les molécules d'anticorps et de masquer les sites de clivage pour les protéases. Ceci a pour effet de rendre les dimères d'immunoglobulines A particulièrement adaptés à l'environnement mucosal.

La deuxième chaîne polypeptidique associée aux dimères d'immunoglobulines A est appelée chaîne J et intervient dans la polymérisation des immunoglobulines.

La fonction des immunoglobulines A réside en grande partie dans leur capacité à s'accrocher aux antigènes et à prévenir la colonisation et l'invasion bactérienne ou virale des surfaces muco-sales. La plupart des immunoglobulines A sont dirigées contre les composés de surface des bactéries, ce qui est cohérent avec leur rôle dans la reconnaissance et l'agrégation des microorganismes intacts à la surface des muqueuses. Elles ont également la caractéristique de ne pas ou peu induire de réponse inflammatoire ou cytotoxique pouvant causer de manière chronique des dommages aux surfaces muco-sales⁽⁸⁾.

Il a été démontré par des méthodes d'immunofluorescence⁽¹⁰⁾ que les plaques de Peyer représentent une source importante de cellules lymphoïdes qui peuvent potentiellement se disséminer dans tout le corps, proliférer et se différencier en cellules productrices d'immunoglobulines A. Cette capacité des lymphocytes à coloniser d'autres sites muco-saux

(conjonctive, respiratoire, glande mammaire ...) constitue le système immunitaire mucosal commun (¹¹). Les rongeurs et les lagomorphes possèdent par ailleurs un système original appelé pompe hépatique (⁹) par lequel les immunoglobulines A du sérum se retrouvent dans la lumière intestinale. Elles sont éliminées par transport actif depuis le sérum vers la bile par l'intermédiaire des hépatocytes qui disposent de récepteurs polyimmunoglobulines. Le contenu intestinal se trouve ainsi enrichi en immunoglobulines A dérivées du sérum qui ont une structure identique aux immunoglobulines A sécrétoires. Les scientifiques tentent d'exploiter ces diverses propriétés afin de faciliter le monitoring des réponses sécrétoires spécifiques à immunoglobulines A. Celui est en effet gêné par le fait que le recueil d'échantillons de sécrétions de l'intestin grêle requiert des méthodes invasives qui ne sont pas réalisables en routine. Il a ainsi été démontré qu'il existe des corrélations fortes entre les réponses humorales spécifiques à différents sites mucosaux ainsi que dans le sérum, mais que ces relations sont dépendantes du type et de la dose d'antigène utilisé (¹¹). L'étude des immunoglobulines A du sérum est par exemple considérée comme un bon marqueur de la réponse immunitaire digestive. Il s'agit d'une voie très intéressante à développer mais dont l'interprétation nécessite beaucoup de prudence.

4°) Sevrage et physiologie digestive

a) Comportement alimentaire des lapereaux (1)

Chez le lapereau nouveau-né, la tétée a lieu une seule fois par jour et ne dure que 2 ou 3 minutes. A partir de trois semaines, les lapereaux commencent à accéder à l'aliment maternel et à l'eau de boisson. Le sevrage a alors lieu rapidement, le lapereau passant d'un seul repas lacté par jour à une multitude de repas solides et liquides répartis sur la journée.

Ce changement brutal de comportement alimentaire a évidemment de grandes répercussions sur la physiologie du tube digestif des jeunes animaux.

b) Composants bioactifs du lait maternel (12)

Traditionnellement, le lait est considéré comme un ensemble de nutriments essentiels (vitamines, minéraux, acides aminés essentiels et acides gras) apportés sous forme de protéines, de lactose et de colloïdes riches en graisse. Cependant, il est actuellement reconnu que le lait constitue également un cocktail remarquable de molécules bioactives dont la présence offre une large variété de fonctions physiologique, protectrice et nutritive.

Les exemples de composés actifs présents dans le lait maternel sont nombreux. De multiples études leur sont consacrées chez l'homme et les rongeurs mais très peu à l'heure actuelle chez le lapin.

Par exemple dans le lait maternel humain, il a été découvert une quantité importante de facteurs de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor). Cette abondance exceptionnelle dans le colostrum et le lait lors d'accouchements prématurés conduit à l'hypothèse que ce facteur favorise le développement des cellules intestinales par extrapolation de sa capacité à stimuler la différenciation des hépatocytes in vitro. De même, l'anhydrase carbonique VI a été identifiée dans le lait humain et de rat. Sa présence avait auparavant été décrite dans la salive, et sa capacité à stimuler la différenciation et la maturation des cellules épithéliales orales est acquise. Les auteurs pensent donc que sa présence pourrait avoir le même effet potentialisateur sur le développement intestinal des nouveaux-nés.

La plupart des recherches sur les effets protecteurs du lait se sont longtemps focalisées sur la fraction protéique de celui-ci. Mais d'autres composants sont maintenant étudiés afin d'exploiter leurs contributions dans les propriétés bénéfiques du lait. La fraction lipidique du lait de vache contient elle aussi beaucoup de molécules bioactives et les conséquences du métabolisme de ces substances ont été étudiées pendant de nombreuses années. Leurs propriétés ont été jugées variablement positives ou négatives selon le statut sanitaire et métabolique du sujet. Les composés lipidiques les plus abondants sont les acides gras reconnus pour leurs propriétés antiathérogéniques et anticarcinogéniques mais aussi critiqués pour leurs effets proathérosclérosiques.

Les nombreuses propriétés antibactériennes du lait sont également au centre des investigations des scientifiques. Une protection spécifique ciblée est assurée par les anticorps sécrétés dans le lait (immunoglobulines A, G, M). Une protection non spécifique à large spectre est conférée par divers mécanismes : action bactéricide (lactoferrine, peroxydase,..), action bactériostatique (lactoferrine, lysozyme, ..), lyse des microorganismes (lysozyme), action antivirale (lactoferrine, produits de la digestion des lipides,..), activité antiprotozoaire (acides gras libres produits de la dégradation des lipides) et inhibition par compétition de l'adhésion des microorganismes à la muqueuse intestinale (kappa-caséine, adhéline,..).

c) Sevrage et évolution de la microflore intestinale

Une des plus fascinantes propriétés du lait est sa capacité à nourrir sélectivement les populations bactériennes bénéfiques du tube digestif. Le développement de la flore digestive commence dès la naissance de l'animal. La composition de cette flore change durant la période du sevrage en raison des modifications des conditions nutritionnelles et physiologiques.

Le principe d'évolution de la microflore intestinale est le même chez tous les mammifères bien qu'il existe des différences dans la succession des étapes en fonction des espèces. Chez les rongeurs ⁽¹³⁾, des bactéries gram positif, non sporulées et des streptocoques sont les premiers à coloniser le tube digestif. Ils sont ensuite suivis par des lactobacilles et des bactéries anaérobies spiralées. Chez le porc, l'influence du sevrage précoce sur la microflore digestive a été étudiée ^(14,15). Les observations montrent que l'on retrouve plus d'*Escherichia coli* chez les animaux sevrés précocement alors que les animaux non sevrés comptent plus de bactéries type lactobacilles et streptocoques. Chez le lapin, on dispose de peu de données. Les

particularités connues de la flore intestinale des lagomorphes sont l'absence de lactobacilles au sein de la flore normale et la prédominance des colibacilles et des bactéries du genre *bacteroides* avant le sevrage.

d) Sevrage et physiologie de la digestion

Des études menées chez le porcelet (^{14,16,17,18}) ont montré que durant la période du post-sevrage immédiat les aptitudes digestives des animaux sont grandement modifiées. L'architecture des villosités intestinales est bouleversée. La hauteur des cryptes augmente alors que le poids des villosités diminue. L'activité des enzymes digestives est également transformée : l'activité des lactases diminuent alors que celles d'autres enzymes telles que les sucrases, maltases ou glucoamylases augmentent progressivement. Le contenu même du tube digestif se trouve ainsi perturbé. Durant la première semaine post sevrage, le pH du contenu stomacal ainsi que la concentration en acide lactique augmente sensiblement. Durant cette période de transition, les capacités digestives des animaux sont donc réduites et c'est ainsi que l'on note très souvent une diminution du gain de poids moyen quotidien des animaux juste après le sevrage.

Chez le lapin, les expérimentations réalisées sont encore incertaines (¹⁹). La présence d'une lipase gastrique chez le jeune semble être démontrée mais on ne connaît pas encore précisément l'évolution de son activité au moment du sevrage. Comme chez les autres mammifères, on retrouve une diminution de l'activité des lactases et une augmentation de celle des enzymes de l'intestin grêle (amyllopeptidase N, disaccharidase) au moment du sevrage. Au niveau du caecum, l'introduction d'aliments solides au sevrage provoque une augmentation des fermentations avec augmentation de la production des acides gras volatils (notamment de l'acide butyrique) et diminution du pH. Des investigations sont encore nécessaires afin d'affiner les connaissances en la matière. Des recherches sont en cours à l'INRA d'Auzeville (communication personnelle M. GALLOIS) afin de préciser l'influence du sevrage sur l'équipement enzymatique des lapereaux.

II Escherichia coli et colibacillose

1°) Epidémiologie

Escherichia coli (*E. coli*) est la cause de diarrhées chez de nombreuses espèces dont l'homme. Les souches mises en cause ont été classées en cinq catégories ou pathovars : *E. coli* entérotoxigène (ETEC), entéroinvasif (EIEC), entérohémorragique (EHEC), entéroaggrégatif (EAEC) et entéropathogène (EPEC). Le concept d'entérovirulence de certaines souches d'*E. coli* a pu être accepté grâce à la mise au point de la technique de sérotypage par Kauffman en 1947 ⁽²⁰⁾. Celle-ci a permis de différencier les souches d'*E. coli* par l'intermédiaire de l'antigène O lipopolysaccharidique et de l'antigène H flagellaire.

Certaines souches d'*E. coli* sont connues depuis longtemps pour être la cause d'entérites et notamment d'épidémies de diarrhées chez les jeunes enfants. A l'heure actuelle, les diarrhées néonatales liées aux EPEC sont plutôt rares dans les pays industrialisés ^(21,22) mais continuent de sévir dans les pays en voie de développement. Des études, menées en 2003 au Brésil ⁽²³⁾ et entre 1996 et 2000 en Thaïlande ⁽²⁴⁾, confirment la forte prévalence des EPEC.

En médecine vétérinaire, les scientifiques ont noté depuis le début des années 1980 une augmentation de la fréquence des maladies entériques dans les élevages cynicoles industriels. Dans la plupart des cas, ces épizooties sont associées à une prolifération d'EPEC au niveau iléocaecal. En Europe, des études de terrain montrent que le sérotype O103 est impliqué dans la majorité des cas de diarrhées chez les lapereaux sevrés ^(25,26). La quasi-totalité des souches d'*E. coli* O103 entéropathogènes ne dégradent pas le sucre rhamnose ⁽²⁷⁾, elles sont dites rhamnose-négative.

2°) Manifestations cliniques et autopsiques

La pathologie intestinale est une dominante de l'élevage cynicole notamment sur le plan économique. Les diarrhées néonatales et de l'adulte sont rares chez le lapin, la période sensible se situant surtout après le sevrage (de 4 à 10 semaines) ⁽²¹⁾.

La colibacillose a une évolution souvent aiguë en trois ou quatre jours. Les animaux présentent une dépression, une anorexie, une diarrhée liquide avec plus ou moins de

mucus voire du sang ⁽²⁸⁾. La mort précède parfois la diarrhée. Les colibacilles sont systématiquement retrouvés en nombre élevé dans les selles chez les animaux atteints de diarrhée alors que le lapin sain héberge très peu de colibacilles (10^2 - 10^3 par gramme de fèces) contrairement à toutes les autres espèces animales ⁽²⁹⁾.

A l'autopsie, les lésions sont principalement localisées au niveau du caecum ⁽²⁹⁾. Il présente le plus souvent un gonflement, des pétéchies au niveau de la muqueuse et un contenu brun plus ou moins hémorragique, très liquide et nauséabond. On observe parfois une congestion de l'intestin grêle et des hémorragies au niveau du côlon proximal.

3°) Pathogénicité des EPEC

Les EPEC sont caractérisés par un mode d'interaction spécifique avec leurs cellules cibles, les entérocytes. Cette interaction est divisée en plusieurs étapes ⁽³⁰⁾. Plusieurs adhésines spécifiques ⁽³¹⁾ permettent tout d'abord une liaison réversible de la bactérie à la cellule. Ces adhésines agissent comme des lectines qui reconnaissent les extrémités carbohydrates des glycolipides ou glycoprotéines à la surface des cellules eucaryotes. Elles autorisent donc la colonisation du biotope entérique et contrecarrent les défenses non spécifiques de l'hôte (péristaltisme, effet barrière de la flore résidente). Un contact étroit nécessite ensuite l'expression d'une protéine appelée intimin et de son récepteur Tir (Translocated Intimin Receptor) ⁽³²⁾. La bactérie envoie alors un signal à la cellule, probablement sous la forme de protéines qui lui sont transmises par l'intermédiaire d'un système sécrétoire de type III ⁽³³⁾ et par un « appareil d'injection » formé par des protéines Esp (EPEC-secreted protein). Toutes les protéines impliquées dans la deuxième et la troisième étape sont déterminées par des gènes localisés dans un îlot de pathogénicité inséré dans le chromosome. Cet îlot est appelé locus d'effacement de l'entérocyte (LEE).

Phénotypiquement et *in vivo*, le résultat de cette interaction est une lésion microscopique connue sous le nom d'« attachement/effacement » des microvillosités de l'entérocyte ⁽³⁴⁾. Ces dernières disparaissent en effet suite à la réorganisation du cytosquelette et il ne reste plus qu'un plateau sur lequel la bactérie est étroitement fixée. La cascade d'événements conduisant à la mort de la cellule cible est encore mal connue.

III Objectifs et principe du protocole

Nous avons exposé précédemment que la sensibilité des lapereaux aux entéropathies est exacerbée lors du péri sevrage. Il s'agit en effet d'une période de grands changements alimentaires impliquant une adaptation des structures digestives. De plus, elle constitue le « maillon faible » de la vie du système immunitaire des lapereaux puisqu'elle représente un intervalle durant lequel l'immunité mucosale est en pleine élaboration alors que la protection passive conférée par le lait maternel s'affaiblit.

Afin d'évaluer l'impact des changements structurels, fonctionnels et immunitaires au niveau digestif liés au sevrage, une infection expérimentale sera réalisée sur des lapereaux sevrés précocement ou non.

La souche infectante est *Escherichia coli* E22 O103 : H2 utilisée, d'une part, en raison de son implication importante dans les entéropathies du lapin, et d'autre part, parce qu'elle est étudiée et rendue disponible par l'UMR 1225 IHAP de l'ENVT. L'inoculation aura lieu dans un premier temps à 28 jours sur des animaux préalablement sevrés à 21 jours et d'autres qui le seront à 35 jours. A cette date, les différences de maturation digestive entre les deux groupes seront optimum. Dans un deuxième temps, une autre série d'inoculation sera effectuée à 42 jours et concernera des animaux sevrés à 21 jours et à 35 jours. La protection conférée par le lait ne jouera plus alors qu'un rôle limité. Au total, on compte donc 4 lots expérimentaux et deux lots témoins qui feront tous l'objet d'un suivi précis avec contrôle de la morbidité, de la mortalité, du poids individuel, des niveaux d'ingestion, des taux d'excrétion et du statut immunitaire.

MATERIEL ET METHODES

I Animaux et logement

Cette expérimentation a lieu dans les bâtiments d'élevage et d'étude de l'INRA d'Auzeville. 26 mères potentielles (souche PS Hyplus 19, Grimaud) parmi les lapines présentes sur le site sont inséminées le 6 février 2004 (père de souche PS Hyplus 39, Grimaud). Les mises bas ont lieu le 8 mars 2004. Afin de s'assurer de l'absence de contact des lapines avec la souche étudiée, un prélèvement de fécès et une prise de sang sont réalisés (cf infra). La répartition des lapines dans les lots en fonction de leur poids et de leur rang de lactation est réalisée après palpation abdominale.

A J0, date de la mise bas, les portées sont homogénéisées à 10 lapereaux si possible (adoption contrôlée). On obtient donc les six lots prévus :

Sevrage à 21 jours sans inoculation (S21-NI) : 4 portées

Sevrage à 35 jours sans inoculation (S35-NI) : 4 portées

Sevrage à 21 jours et inoculation à 28 jours (S21-I28) : 5 portées

Sevrage à 35 jours et inoculation à 28 jours (S35-I28) : 5 portées

Sevrage à 21 jours et inoculation à 42 jours (S21-I42) : 4 portées

Sevrage à 35 jours et inoculation à 42 jours (S35-I42) : 4 portées

A partir de 14 jours, les lapines sont séparées des lapereaux afin de pouvoir contrôler leur alimentation respective. Ainsi, tous les matins jusqu'au sevrage (21 jours ou 35 jours), les lapines sont placées avec leur petit dans les cages de naissance durant le temps de l'allaitement. A J18, un bouclage individuel est pratiqué. A J21, une nouvelle homogénéisation des portées est effectuée en éliminant le lapereau le plus léger. Chaque portée compte alors 9 lapereaux. A J36, les portées n'ayant pas été inoculé à J28 sont divisées en deux afin d'éviter une surpopulation dans les cages. Après élimination du lapereau le plus léger, les animaux sont répartis en deux lots homogènes, le premier reste dans la cage de naissance alors que le deuxième est placé dans une nouvelle cage d'ingestion.

Comme il est possible de le voir en annexe 1, le bâtiment est séparé en secteur contaminé ou non par une barrière sanitaire. Le personnel et le matériel affectés à une zone ne doivent pas franchir cette limite physique. Les manipulateurs sont par ailleurs munis de blouses, sur bottes et gants jetables.

II Alimentation

Les mères allaitantes reçoivent à volonté un aliment standard pour reproductrices.

Il est mis à la disposition des lapereaux, dès l'âge de 14 jours, un aliment spécifique dont la composition est précisée en annexe 2.

III Inoculation

L'inoculation est pratiquée par l'administration per os, au moyen d'une seringue et d'une canule, de la solution contenant les bactéries. Afin de pouvoir observer les lapereaux sur une durée raisonnable, il a été décidé d'utiliser un inoculum d'*Escherichia coli* E22 O103 : H2 contenant environ 5.10^4 bactéries ce qui correspond à la dose létale 50 de cette souche. 2 jours avant l'inoculation, un milieu de culture spécifique renfermant du rhamnose (cf infra) estensemencé avec la souche désirée et mis à l'étuve pendant 24 heures. Une colonie est alors prélevée et placée dans un milieu de culture LB (sigma) de nouveau mis à l'étuve pendant 18 heures. D'après les données sur la croissance exponentielle des bactéries, on obtient ainsi une solution contenant 10^9 bactéries par mL. Il suffit alors de réaliser une dilution pour parvenir à une solution d'environ 5.10^4 bactéries par mL.

Les lots témoins sont inoculés avec une souche non pathogène d'*Escherichia coli* appelée BM21 préparée selon le même procédé. Ils sont ainsi soumis au même stress que les autres lots. A J28, les lots S21-I28 et S35-I28 sont inoculés avec 1mL de solution contenant la souche pathogène, et les lots I42 et non infectés avec 1mL de solution contenant la souche non pathogène. A J42, les S21-I42 et S35-I42 sont inoculés avec 1mL de solution contenant la souche pathogène, et les lots non infectés avec 1mL de solution contenant la souche non pathogène.

IV Mesures

Un récapitulatif du planning général est présenté en annexe 3.

1°) Etat sanitaire

A partir de la naissance, un contrôle de l'état sanitaire des femelles et des lapereaux sera effectué deux fois par semaine selon la grille de notation présentée en annexe 4. A compter de la première inoculation, à J28, ces contrôles seront effectués quotidiennement.

Cet examen met l'accent sur l'état général des animaux et les éventuelles manifestations digestives observées.

2°) Pesée individuelle et mesure d'ingestion

A partir de J21 jusqu'à J63, la consommation d'aliment par les lapereaux sera mesurée les lundis et jeudis. Des pesées individuelles des lapereaux seront réalisées ces mêmes jours. La semaine suivant l'inoculation, ces mesures seront réalisées quotidiennement sur l'ensemble des animaux. Dans le cas de mortalité d'un lapereau, la quantité d'aliment ingérée sera mesurée afin d'ajuster les mesures au nombre de lapereaux présents sous la mère.

3°) Récolte de fèces et bactériologie

Le prélèvement de fèces est réalisé directement sur la grille située sous la cage au moyen d'une pince jetable. Le manipulateur prélève au hasard environ 10 grammes de crottes. La collecte de contrôle aura lieu à J21 pour les lapereaux inoculés à J28 et à J28 pour les autres. Par la suite, des collectes seront effectuées tous les lundis et jeudis dans les lots inoculés et le lundi uniquement dans les autres lots.

Les fèces sont analysées à l'UMR 1225 de l'ENVT. Elles sont diluées au dixième dans de l'eau physiologique (4 grammes dans 36 mL d'eau physiologique). Dans le cas de fèces très sèches, l'utilisation de billes de verre et du vortex facilite le délitement. A l'inverse dans

le cas d'un prélèvement caecal post-mortem, souvent très liquide, on prélève 2 mL de celui-ci dilué dans 18 mL de liquide physiologique. Le mélange obtenu est alors filtré au travers d'une gaze afin d'éliminer les débris de grande taille. A partir de cette dilution à 10^{-1} , on réalise des dilutions à 10^{-3} , 10^{-5} et 10^{-7} en prélevant successivement 90 μ L de la dilution précédente et en la plaçant dans 9mL d'eau physiologique. Un milieu spécifique EMB (Sigma) est ensuite ensemencé avec 1mL de chaque dilution puis mis à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Le lendemain, on peut réaliser le comptage des colonies ayant poussées. Les colonies de colibacilles sont de couleur bleu sombre et ont une forme en fuseau dans l'épaisseur de la gélose ou en rond lorsqu'elles affleurent à la surface. Afin de différencier la souche pathogène E22 des autres colibacilles, 10 colonies choisies au hasard pour chaque prélèvement sont repiquées sur un milieu sélectif contenant du rhamnose (Sigma) et placé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Les colonies qui dégradent le rhamnose sont dites rhamnose + et font virer la gélose de la couleur rosée au jaune. Il ne peut pas s'agir de la souche E22 qui est rhamnose – et qui laisse donc la couleur de la gélose inchangée. Dans les cas litigieux, la présence de colonies pathogènes E22 O103 sera confirmée par un test d'agglutination avec des anticorps spécifiques anti-LPS O103 (marqueur de surface) (Sigma). Ces derniers permettent l'agglutination des bactéries visible à l'œil nu sous la forme de petits amas blancs.

Les résultats des bactériologies fécales hebdomadaires ou post-mortem sont consignés dans des fiches dont le modèle est présenté en annexe 5.

4°) Analyse sanguine et test ELISA

Le prélèvement de sang sur les mères se fait par ponction et recueil du sang sur tube sec de l'artère auriculaire centrale. Cette méthode apparaît difficilement réalisable techniquement sur un nombre important de lapereaux aussi jeunes. Il a donc été décidé d'utiliser la technique du buvard en cours de validation à l'ENVT. Celle-ci consiste en l'imprégnation par le sang d'un papier buvard après ponction de l'artère auriculaire centrale. Les buvards sont ensuite laissés à sécher à l'air libre et peuvent être analysés après plusieurs semaines.

Afin de recueillir le plus précisément possible une quantité égale de sang pour chaque buvard, ceux-ci sont poinçonnés avec une perforuse de bureau. 10 rondelles sont ainsi mises à éluer dans un tampon TBS Tween (Sigma) pendant toute une nuit à 4°C.

Le sang total ou l'exsudat obtenu à partir du papier buvard font alors l'objet d'un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) détectant la présence d'anticorps dans l'échantillon par fixation sur l'antigène spécifique. Il est à noter que chaque étape de cette technique est suivie d'un cycle de trois lavages réalisés automatiquement avec du tampon TBS Tween par un appareil Dynatech MRW. Une plaque ELISA (Sigma) est préparée en laissant les antigènes LPS O103 (laboratoire ENVT) s'adsorbés au support pendant 24 heures (antigène dilué au 1/1000^e dans du tampon Carb-Bicarb). Les sites non spécifiques hypothétiquement présents sont bloqués par un tampon (Régilait et BSA à 1%, Sigma) laissé en contact 30 minutes à 37°C. Puis les antigènes sont mis en présence de l'échantillon à tester dilué au 1/200^e dans du tampon TBS Tween. La révélation du test passe par plusieurs étapes. On utilise des anticorps de chèvre (Sigma) se fixant spécifiquement sur la partie constante des immunoglobulines A de lapin. Ces anticorps sont dilués au 1/1000^e dans du tampon BSA Régilait et laissés sur la plaque 30 minutes à 37°C. Puis des anticorps de lapin couplés à une enzyme phosphatase alcaline (Sigma) se liant à leur tour aux anticorps de chèvre sont employés de la même manière. Il suffit alors d'ajouter le substrat de l'enzyme (sigma 104 et lectine) qui, une fois dégradé par celle-ci, devient jaune, pour vérifier la présence initiale des anticorps. Un lecteur de densité optique permet d'obtenir des résultats sous forme semi-quantitative.

5°) Autopsies

Tous les animaux morts lors de l'expérimentation font l'objet d'une autopsie et sont enregistrés sur une fiche nominative telle que celle présentée en annexe 6. Si l'animal est mort depuis moins de 4 heures, le contenu caecal est prélevé et une analyse bactériologique est réalisée.

Les lapins à l'agonie sont euthanasiés par injection intracardiaque de Doléthal[®] (environ 1 mL en fonction de la taille de l'animal) après anesthésie par injection intramusculaire d'Imalgène[®] (0.2 à 0.4 mL en fonction de la taille de l'animal). Une autopsie est systématiquement réalisée sur ces animaux.

6°) Analyses statistiques

Les données ont été analysées par des tests statistiques simples : analyse de survie et test du Khi-2 pour les données de survie, analyse de variance pour les données d'ingestion et de gain de poids relatif, tests non paramétriques de Kruskal-Wallis pour les données de bactériologie fécale. Le seuil de signification statistique retenu est de 5%.

RESULTATS

I Contrôle des animaux avant expérimentation

Pour chacune des lapines, un prélèvement de fécès et un prélèvement sanguin ont été réalisés avant le début de l'expérimentation.

L'examen bactériologique des fécès montre que les animaux n'excrètent pas de colibacilles pathogènes avant l'inoculation expérimentale. Ils ne sont donc pas infectés.

La sérologie sanguine révèle que les animaux ne possèdent pas d'anticorps dirigés contre la souche infectante utilisée. Ils n'ont donc jamais été en contact avec cette dernière.

II Contamination incontrôlée des lots I42 et NI

A J37, la bactériologie de contrôle révèle qu'une des cages du lot I42 excréterait du colibacille pathogène alors qu'elle n'a pas encore été inoculée expérimentalement. L'hypothèse d'une erreur d'identification est malheureusement infirmée lors du prélèvement suivant qui, non seulement confirme l'infection de cette cage, mais montre que plusieurs autres cages sont également concernées. Ces cages se trouvent aléatoirement réparties dans les lots I42 et NI. Il est alors décidé, afin de tenter de poursuivre l'expérimentation, d'euthanasier les animaux appartenant aux cages présentant un fort taux d'excrétion de colibacilles pathogènes. Cette démarche n'a pas suffi à enrayer l'extension de l'infection puisque de nouvelles cages infectées seront détectées au cours de prélèvements ultérieurs.

Les données relatives aux lots infectés à J42 ne pourront donc pas être exploitées dans cette étude. Cette partie de l'expérimentation fera l'objet d'un nouveau protocole en cours d'élaboration. De plus, les résultats concernant les animaux des lots témoins ont été retirés des études graphiques et statistiques à partir du moment où ils ont été considérés comme contaminés (bactériologie fécale et séroagglutination positives).

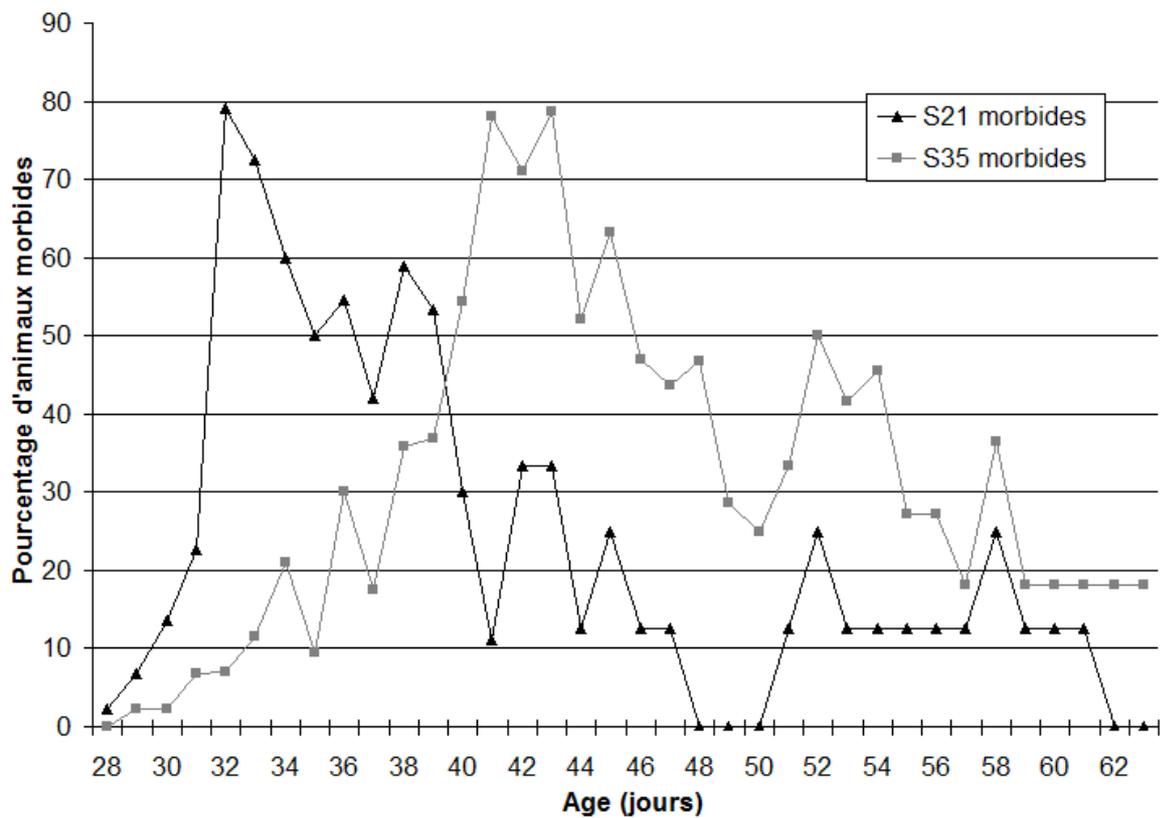


Figure 1 : Influence du sevrage sur la morbidité des animaux lors d'une infection par *E.coli* O103

Les animaux dits morbides sont ceux qui ont présentés des symptômes digestifs type diarrhée ou ballonnement. Le pourcentage d'animaux morbides est calculé par rapport au nombre d'animaux encore vivants.

III Etat sanitaire et analyse de survie

1°) Etude de la morbidité

Le suivi quotidien de l'état sanitaire des animaux permet de rendre compte des répercussions cliniques de la colibacillose sur chacun des lots.

Comme le montre la figure 1, les manifestations cliniques recensées dans les lots S21-I28 et S35-I28 suivent une évolution similaire mais décalée dans le temps. En effet, le pic de pourcentage d'animaux morbides a dans les deux cas la même proportion, à savoir environ 80% des animaux. En revanche il se situe à 32 jours pour le lot S21 contre 41 jours pour le lot S35.

Quelque soit la date du sevrage, on observe après le pic des symptômes, une décroissance du nombre d'animaux morbides. Les animaux qui survivent ne souffrent presque plus de troubles digestifs.

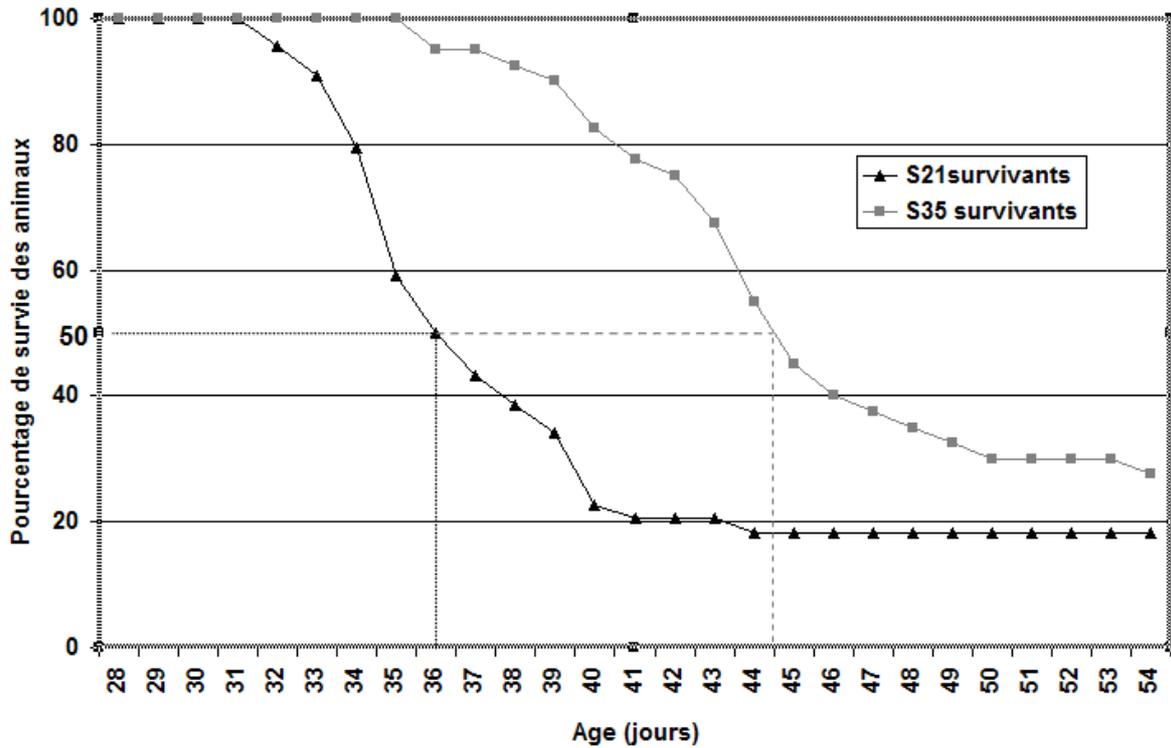


Figure 1 bis : Influence du sevrage sur la mortalité des lapereaux lors d'une infection par *E.coli* O103

Seuls les animaux dont la mort est liée à l'infection par la souche E22 (clinique, autopsie et bactériologie en adéquation) ont été comptabilisés. Les autres ont été exclus de l'étude de la mortalité. On évite ainsi que les données concernant la colibacillose ne soient faussées par d'autres pathologies éventuellement influencées par le sevrage des animaux.

2°) Analyse de survie

Afin d'analyser l'influence du sevrage précoce sur la mortalité due à l'infection par la souche O103, un enregistrement précis de la mortalité journalière est réalisé.

La courbe de survie, figure 1 bis, révèle de nouveau une évolution en parallèle de la mortalité dans les deux lots étudiés. Le taux de 50% de survie est atteint au 36^{ème} jour (8 jours après infection) pour le lot S21-I28, et entre le 44^{ème} et le 45^{ème} jour pour le lot S35-I28 (soit environ 16 jours après infection et 9 jours après le sevrage). A la fin de l'expérimentation, le taux de survie est de 18.18% pour le lot S21 et de 27.5% pour le lot S35.

Une étude statistique type « analyse de survie », portant sur la globalité des courbes, montre qu'il existe des différences significatives entre les deux courbes ($p < 0.01$). On procède alors à un test du χ^2 jour par jour. Celui ci montre qu'il n'y a pas de différence significative au début de l'expérimentation entre le 28^{ème} et le 33^{ème} jour. On obtient ensuite des différences très significatives, avec $p < 0.01$, entre le 34^{ème} et le 45^{ème} jour inclus, et avec $p < 0.05$ pour les 46 et 47^{ème} jours. A partir du 48^{ème} jour et jusqu'à la fin de l'expérimentation au 63^{ème} jour, il n'y a pas d'écart significatif de la mortalité entre les deux lots.

L'analyse des données de morbidité et de mortalité montre très nettement que l'action pathogène d'*E.coli* E22 est différée dans le temps et ne débute qu'après le sevrage pour le lot S35. Par contre, il n'y a pas, in fine, de différences de mortalité liées à l'âge des animaux au sevrage.

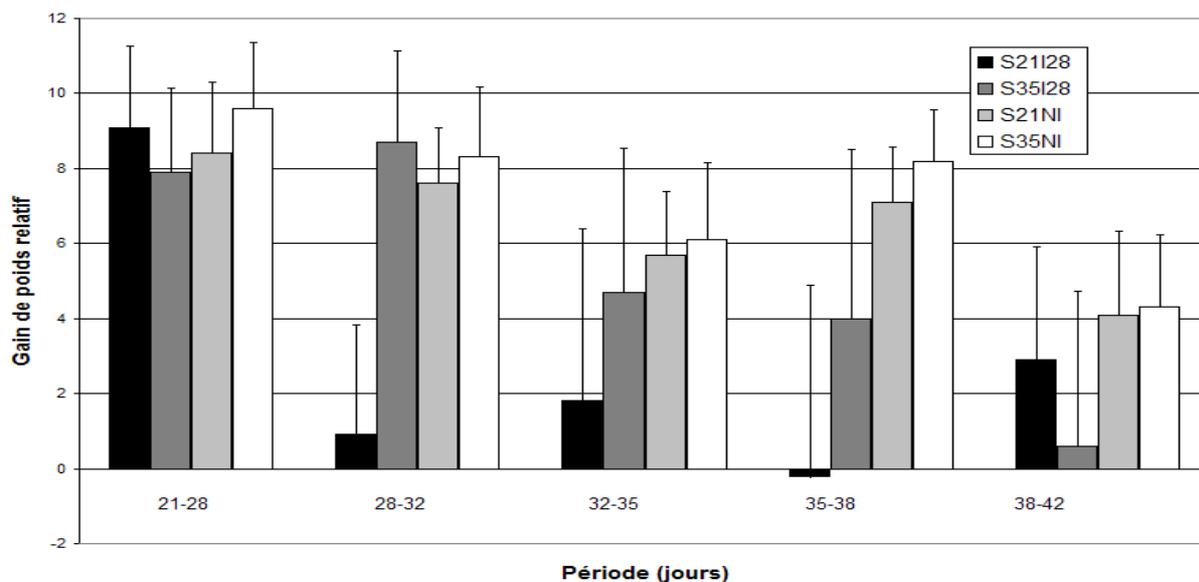


Figure 2 : Evolution du gain de poids relatif des différents lots

Les poids sont relevés 1 fois par jour le matin. Les valeurs du matin concernant les animaux morts dans la journée ont été retirées de l'étude.

| | Période | S21-I28 | S35-I28 | S21-NI | S35-NI | P inoc. | P sevr. | P inter. |
|------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|----------|
| Ingestion en g/j/lapin | 21-28 | 27 | 9 | 25 | 14 | n.s. | *** | 0.09 |
| | 28-32 | 37 | 33 | 62 | 41 | *** | ** | * |
| | 32-35 | 25 | 41 | 71 | 55 | *** | n.s. | *** |
| | 35-38 | 38 | 56 | 92 | 92 | *** | n.s. | n.s. |
| | 38-42 | 53 | 48 | 103 | 103 | *** | n.s. | n.s. |

| | Période | S21-I28 | S35-I28 | S21-NI | S35-NI | P inoc. | P sevr. | P inter. |
|------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|----------|
| Gain de poids relatif* | 21-28 | 9.1 | 7.9 | 8.4 | 9.6 | n.s. | n.s. | 0.06 |
| | 28-32 | 0.9 | 8.7 | 7.6 | 8.3 | *** | *** | *** |
| | 32-35 | 1.8 | 4.7 | 5.7 | 6.1 | ** | 0.08 | n.s. |
| | 35-38 | -0.2 | 4.0 | 7.1 | 8.2 | *** | ** | 0.09 |
| | 38-42 | 2.9 | 0.6 | 4.1 | 4.3 | ** | n.s. | n.s. |

*GMQ période*100/poids début de période

Figure 2 bis : Etude statistique des données d'ingestion et de gain de poids relatif des différents lots

*L'analyse de variance porte sur différents facteurs. Le facteur inoculation compare les lots infectés avec les lots non infectés indépendamment de la date du sevrage. Le facteur sevrage compare de la même manière les lots sevrés à 28 jours avec ceux sevrés à 35 jours. Le facteur interaction, qui nous intéresse plus particulièrement ici, prend en compte l'interaction des deux précédents facteurs. Lorsqu'il est significatif, il signe une sensibilité particulière à l'infection des animaux sevrés à un temps donné. Les * indiquent la valeur seuil de p :*

=p<0,05 ; **=p<0,01 ; *=p<0,001 ; n.s.=non significatif.*

IV Mesure de poids individuel et d'ingestion

Afin de juger de l'évolution de la croissance des lapereaux, un suivi du poids individuel et de l'ingestion d'aliment est réalisé. Ces paramètres sont particulièrement sensibles à toute perturbation de l'état général des animaux et leur diminution précède souvent les signes cliniques de la maladie.

Ces mesures sont regroupées par période pour faciliter leur traitement : J21-J28 (avant infection), J28-J32, J32-J35, J35-J38, J38-J42. Elles font l'objet d'une étude statistique du type analyse de variance.

1°) Mesure de poids individuel

Les données sur les poids individuels sont tout d'abord étudiées, avec les figures 2 et 2 bis, sous la forme du gain de poids relatif des animaux ($\text{gain moyen quotidien} \times 100 / \text{poids au début de la période}$) afin de niveler les différences de poids absolu existant entre les animaux au départ.

Avant l'infection, tous les lots ont une croissance relativement homogène sans différence significative.

Durant la période juste après l'inoculation de J28 à J32, le lot S21-I28 présente une chute de sa croissance par rapport aux autres lots. Les statistiques montrent que cette différence est liée à l'interaction d'une infection par *E.coli* E22 et un sevrage précoce à 21 jours.

Après J32, il n'existe pas de preuve statistique d'une influence du sevrage précoce sur l'évolution de la croissance des lapereaux lors d'une infection. Les différences constatées après cette date sont uniquement liées au facteur inoculation ou au facteur sevrage indépendamment l'un de l'autre. Entre J32 et J42, les lots infectés quelque soit la date du sevrage ont un gain poids relatif inférieur aux lots non infectés. Entre J35 et J38, on note également que les lots sevrés précocement, infectés ou pas, ont une croissance moindre que les lots sevrés tardivement.

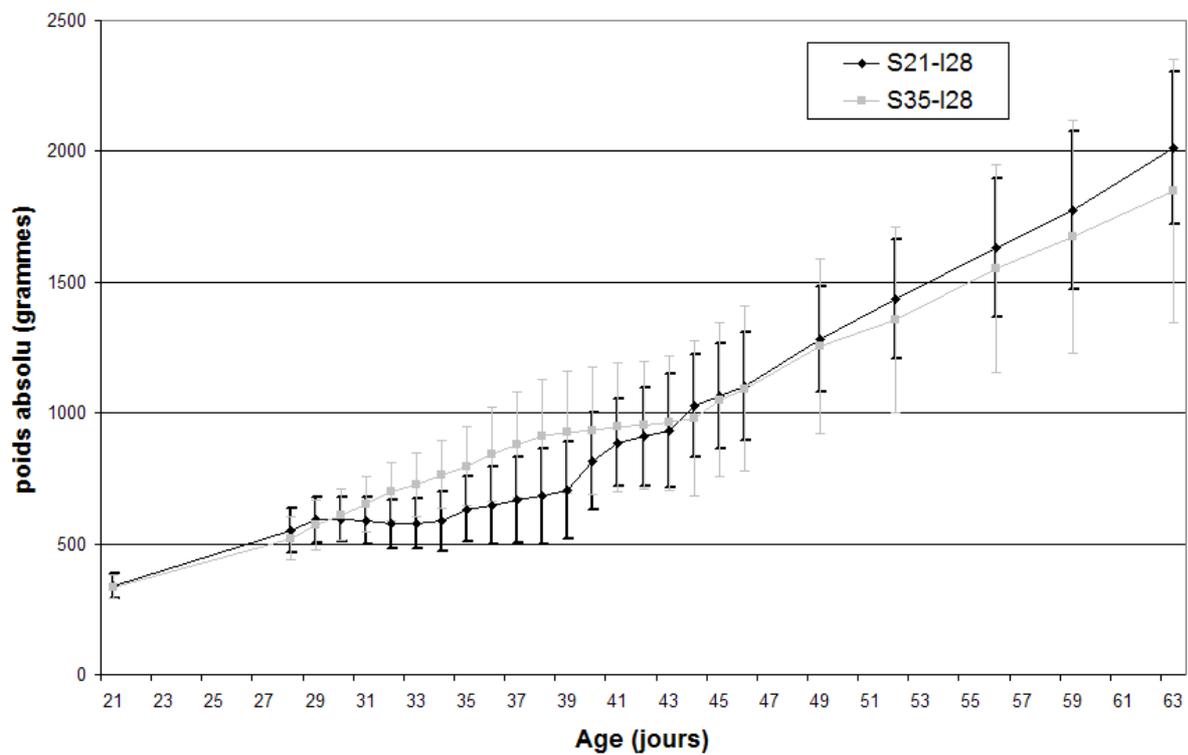


Figure 3 : Evolution du poids absolu des animaux des lots S21-I28 et S35-I28

Les poids sont relevés 1 fois par jour le matin. Une moyenne est réalisée pour chaque lot. Les valeurs du matin concernant les animaux morts dans la journée ont été retirées de l'étude.

La figure 3, récapitulant l'évolution du poids absolu des lapereaux des lots S21-I28 et S35-I28 confirme les observations précédentes. On retrouve en effet un décrochage dans la courbe du lot S21 à 31 jours et une légère inflexion dans celle du lot S35 à 41 jours. Il est également important de noter qu'au terme de l'expérimentation, les animaux survivants du lot S21 présente un poids équivalent à ceux du lot S35.

2°) Mesure d'ingestion

Les données d'ingestion des lapereaux font l'objet d'une étude statistique type analyse de variance présentée en figure 2 bis.

Avant l'inoculation à J28, les lots sevrés précocement, infectés ou pas, consomment logiquement plus d'aliment que les lots non sevrés.

Entre J28 et J32, on se trouve dans le même cas de figure. On note toutefois en plus que les animaux du lot S21-I28 consomment significativement moins d'aliment que leurs homologues non infectés. Le sevrage précoce influence donc la courbe d'ingestion lors d'une infection.

Entre J32 et J35, il n'y a plus de différence liée au facteur sevrage seul. Par contre on constate une influence du facteur inoculation, les lots infectés ayant un taux d'ingestion inférieur à celui des lots non infectés. De plus, il existe une influence de l'interaction entre âge au sevrage et inoculation qui marque de nouveau une sensibilité plus grande à la colibacillose des animaux sevrés précocement.

Après J35, les lots témoins ont un taux d'ingestion supérieur aux lots infectés. Seul le facteur inoculation intervient de manière significative.

Le sevrage précoce influence donc l'évolution du poids et de l'ingestion des lapereaux lors des premiers jours d'une infection par *E.coli*. Après le 32^{ème} jour pour le poids des animaux et le 35^{ème} pour l'ingestion, la date du sevrage n'est plus un facteur déterminant pour les animaux survivants à l'infection.

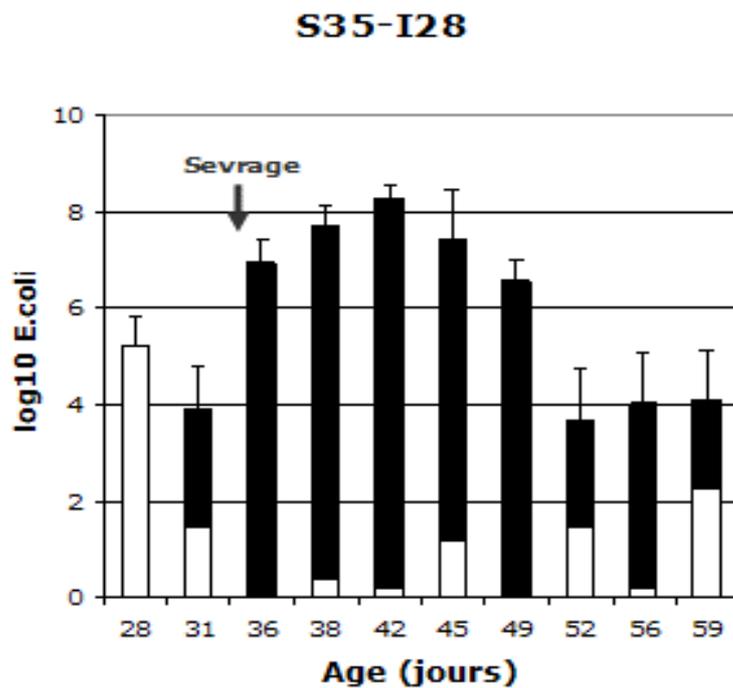
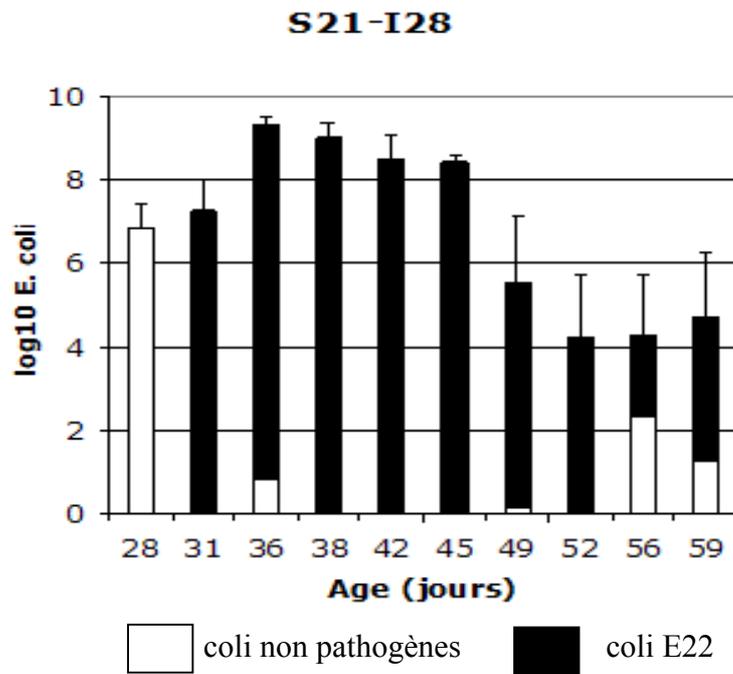


Figure 4 : Evolution de l'excrétion de colibacilles totaux et de la souche E22 par les lots S21-I28 et S35-I28

La hauteur des barres correspond au nombre de colibacilles totaux exprimé en log 10. La subdivision à l'intérieur de ces barres est quant à elle proportionnelle au pourcentage de clones pathogènes ou non.

V Bactériologie fécale

La bactériologie fécale permet de quantifier la souche O103 : H2 par rapport à la population d'*E.coli* totale dans les fécès. La figure 4 expose l'excrétion de colibacilles totaux des lots S21-I28 et S35-I28. Les analyses statistiques du type test non paramétrique ont été effectuées sur les données d'excrétion d'*E.coli* E22.

A 28 jours, avant inoculation, les prélèvements montrent que les lapereaux excrètent un faible taux de colibacilles non pathogènes et n'excrètent pas la souche E22.

A 31 jours, les lapins du lot S21-I28 excrètent plus de colibacilles totaux mais aussi plus de colibacilles pathogènes que ceux du lot S35-I28. Il existe une différence significative entre les deux lots. A 36 jours, le lot S35-I28 excrète à son tour une quantité importante de colibacilles pathogènes et il n'y a alors plus d'écart statistiquement significatif. A 38 jours, on obtient de nouveau une différence significative, les animaux du lot S21-I28 excrétant plus d'*E.coli* E22 que ceux du lot S35-I28.

A partir du 42^{ème} jour et jusqu' au 59^{ème} jour, l'évolution de l'excrétion de colibacilles pathogènes dans les deux lots est progressivement décroissante et sans différence significative.

La prise de lait maternel semble donc sensiblement diminuer la multiplication et l'excrétion digestive du colibacille pathogène.

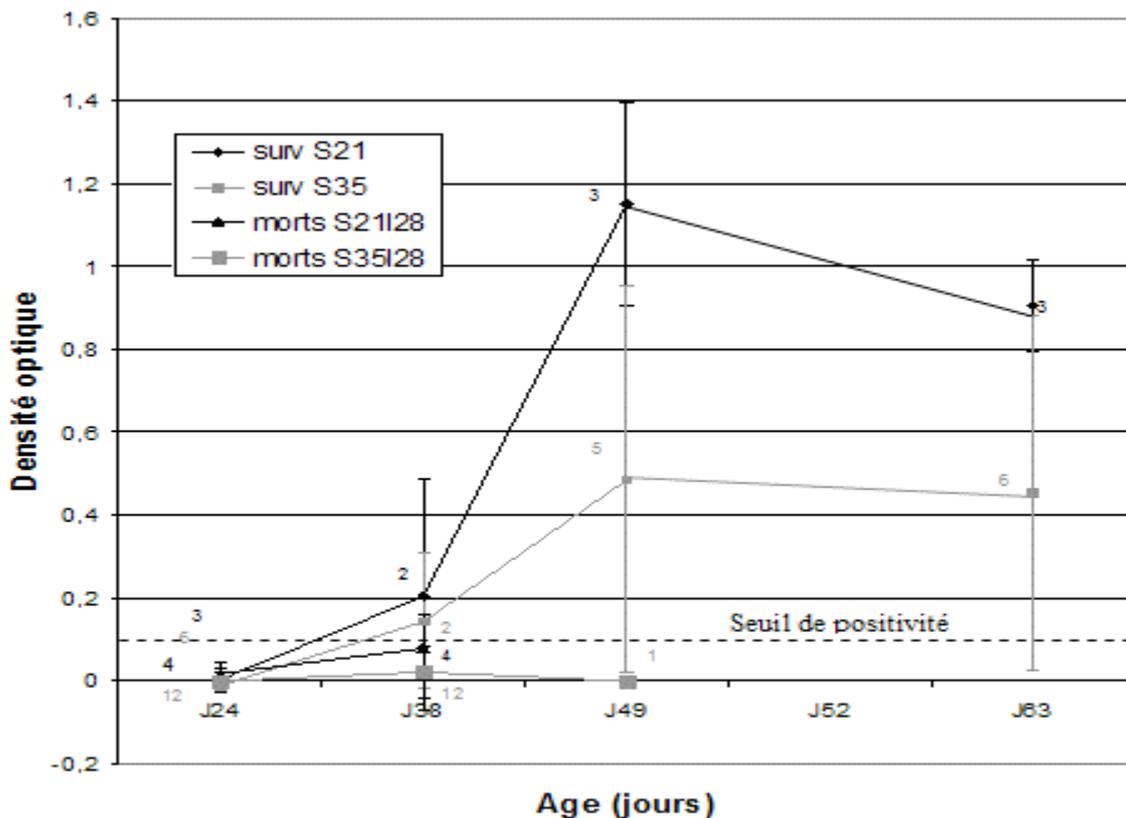


Figure 5 : Comparaison des résultats de densité optique issus des tests ELISA des lots S21-I28 et S35-I28.

*Les résultats semi quantitatifs du test ELISA sont exprimés en ordonnées en densité optique. Ils ont été divisés en 4 catégories : les survivants sevrés à 28 jours ou à 35 jours et les animaux morts sevrés à 28 jours ou à 35 jours. Le seuil de positivité utilisé dans cette étude a été calculé de la manière suivante : densité optique la plus élevée à j24 + 2*écart type des densité optique à j24. Les chiffres placés en regard des points de la courbe indiquent le nombre de valeurs utilisées pour calculer la moyenne et l'écart type correspondants.*

VI Sérologie

Afin d'essayer de quantifier les immunoglobulines A sériques dirigées contre les colibacilles, des prises de sang ont été réalisés à différents temps. Ces prélèvements concernent tous les animaux avant l'inoculation, puis seulement 2 lapins choisis au hasard par cages. Le faible nombre de prélèvements recueillis pour chaque point ne permet pas de réaliser d'études statistiques et impose une interprétation prudente.

Aucune différence interprétable en relation avec l'âge des animaux au sevrage n'est visible. En revanche, on constate des différences dans l'évolution de la densité optique en fonction du devenir des animaux. Après l'inoculation, quelque soit le lot considéré, les animaux qui survivent ont en moyenne une densité optique supérieur au seuil de positivité. A l'inverse les animaux qui succombent à la colibacillose ont une densité optique inférieur à ce même seuil. Ainsi, à 38 jours, 3 des 5 animaux qui survivront ont une sérologique positive (soit 60%). Les animaux qui vont succomber ont quant à eux majoritairement une sérologie négative (13 sur 18 soit 72%). A 49 et 63 jours, la majorité des animaux qui survivent possèdent une sérologie positive, respectivement 7/8 et 8/9. Nous n'avons alors plus de données concernant les animaux morts de colibacillose

DISCUSSION

Les résultats de l'expérimentation nous amènent à conclure que le lait maternel confère une protection temporaire qui s'estompe rapidement après le sevrage. Nous avons en effet constaté que l'évolution de la morbidité, de la mortalité et du poids des deux lots était parallèle avec un décalage d'environ 10 jours entre les 2 lots. Le pic de manifestations cliniques se situe en effet 3-4 jours post-infection pour le lot sevré à 21 jours, et 13-14 jours post-infection pour le lot sevré à 35 jours, soit 6-7 jours après le sevrage pour ce lot. De plus, les résultats bactériologiques tendent à démontrer que cette protection est liée à une réduction de la population bactérienne dans l'intestin lors de la prise concomitante de lait maternel.

Malheureusement des problèmes de gestion sanitaire ayant entraîné une infection des lots témoins, il ne nous est pas possible de compléter ses observations par l'étude d'une infection tardive à 42 jours. La contamination des lots non infectés par l'intermédiaire des manipulateurs ou du matériel paraît peu probable au vu des précautions sanitaires employées et du caractère aléatoire de l'infection des cages. De même, les systèmes de distribution de l'eau et d'évacuation des déjections qui circulent des zones non infectées vers les zones infectées peuvent difficilement être mis en cause. En revanche la présence de nombreux insectes volants coprophages, dès le début de l'expérimentation, pourrait expliquer l'essaimage de l'agent pathogène dans le bâtiment d'élevage. L'imperfection de l'évacuation des fécès a par ailleurs favorisé leur développement. La prise en compte de ce facteur de contamination paraît donc non négligeable et mérite d'être retenu en vue de prochaines expérimentations. Il conviendra alors d'utiliser des insecticides appropriés dès l'entrée des animaux dans le bâtiment et d'étudier plus précisément le problème de l'évacuation des déjections.

Les premières conclusions obtenues dans cette étude permettent toutefois de formuler un certain nombre d'hypothèse sur les propriétés du lait mis en jeu dans cette protection contre une infection bactérienne.

La première hypothèse mise en avant est qu'il existe une ou des molécules présentes dans le lait et inhibant la colonisation du tube digestif par les bactéries. La composition exacte du lait et du colostrum est encore mal connue, en particulier chez le lapin. Ils contiennent des molécules immunomodulatrices, des lymphocytes, des cytokines, des lactoferrines et des interleukines, mais aussi des molécules à propriétés antimicrobiennes, immunoglobulines A, oligosaccharides, lactadhérine, facteurs bifidiques et bien d'autres encore...⁽³⁵⁾. Nous allons développer ici quelques unes de ces propriétés.

Plusieurs équipes ont étudiées le rôle des lactadhérines, glycoprotéines entrant dans la composition des globules gras du lait. Chez l'homme, il a ainsi été démontré qu'il existe une corrélation entre le taux de lactadhérines dans le lait maternel et les manifestations cliniques liés à une infection par un rotavirus (³⁶). Ces glycoprotéines se comporteraient comme un compétiteur homologue pour les récepteurs de l'hôte envers les agents pathogènes. D'autres études s'intéressent aux lactoferrines, glycoprotéines résistantes aux protéases et que l'on trouve dans le lait mais aussi dans d'autres sécrétions mucosales. Leurs mécanismes d'action afin de limiter l'invasion bactérienne ont fait l'objet d'investigations chez l'homme et les bovins et elles apparaissent comme des médiateurs indispensables à la dégradation du système sécrétoire de type III utilisé par les EPEC (^{37,38}) et d'autres bactéries gram-négatif (³⁹) lors de la phase d'adhésion/effacement.

Il est également important d'évoquer la piste des acides gras à chaîne moyenne. Ils constituent la grande majorité des lipides présents dans le lait de lapine (⁴⁰), avec notamment les acides caprylique (C8 :0) et caprique (C10 :0). Ceux-ci sont peu présents dans les rations industrielles qui contiennent une grande proportion d'acides gras à longue chaîne. Or il a été démontré, *in vitro* et *in vivo* chez le porc, que les acides gras à chaîne moyenne ont une activité antimicrobienne (^{41,42,43}). Chez l'homme, des études ont prouvé leur propriété antiviral et antibactérienne s'appliquant à toutes les surfaces mucosales (⁴⁴). Chez le poulet, on a montré que, même à faible concentration, ils diminuaient l'invasion de la muqueuse intestinale par les salmonelles en diminuant l'expression d'un gène régulateur de facteurs d'adhésion (⁴⁵).

La seconde hypothèse envisagée concerne l'influence du biotope digestif qui se trouve bouleversé au moment du sevrage (^{13,14,46}). Une action directe du lait sur la composition de la microflore digestive est établie. Les groupes de bactéries qui prédominent avant le sevrage, comme les bifidobactéries et les lactobacilles, voient leur population diminuer après le sevrage. Outre l'effet protecteur de barrière physique qu'elle offre à l'épithélium intestinal, des recherches ont montré que la flore intestinale participe au développement du système immunitaire mucosal digestif (¹³) par divers mécanismes (développement des cellules productrices d'immunoglobulines A et des lymphocytes épithéliaux, développement des plaques de Peyer, induction et maintenance d'une tolérance orale à l'ingestion de pathogènes...). Les scientifiques se sont intéressés aux bactéries filamenteuses segmentées qui sont des bactéries autochtones, sporulées, strictement anaérobies (^{47,48}). Ces dernières stimulent de manière significative le système immunitaire mucosal avec une production accrue d'immunoglobulines A et il a été prouvé qu'elles inhibent chez le lapin la colonisation

de la muqueuse digestive par les REPEC O103 ⁽⁴⁹⁾. Une étude, portant sur l'infection de souris par des bactéries entéropathogènes du type *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* ⁽⁵⁰⁾, révèle que la supplémentation en bifidobactéries protège les animaux de manière significative. Les auteurs posent l'hypothèse de la sécrétion de molécules immunomodulatrices agissant au niveau des plaques de Peyer. De la même manière, une expérimentation sur les effets protecteurs de *Lactobacillus casei* contre une infection de jeunes lapins par une souche d'*E.coli* productrice de shiga-toxin ⁽⁵¹⁾ conclut à la diminution des symptômes cliniques et de la colonisation du tractus digestif. Il s'avère également que les animaux supplémentés produisent plus d'immunoglobulines A spécifiquement dirigés contre les toxines (notamment dans le colon) ce qui oriente vers une action promotrice de l'immunité locale des *L.casei*.

Le développement tardif du système immunitaire des lagomorphes et sa très grande dépendance envers les tissus lymphoïdes associés à l'intestin conduit à formuler une dernière hypothèse. Nous rappelons que certaines formations lymphoïdes du tube digestif (appendix vermiforme, sacculus rotundus) fonctionnent comme des organes lymphoïdes primaires jusqu'à environ 8 semaines d'âge chez le lapin. On peut donc supposer que les animaux sevrés précocement possèdent un système immunitaire encore peu développé donc peu apte à les protéger contre les pathogènes de l'environnement. La réalisation de sérologie et de tests ELISA afin de quantifier la production d'immunoglobulines A tentait de répondre à ces interrogations. Un certain nombre de limites oblige une interprétation prudente des résultats obtenus. Tout d'abord, l'établissement d'une cinétique exhaustive a été très difficile puisque, après inoculation, il n'a matériellement pas été possible de prélever tous les animaux. Les animaux testés ont été choisis au hasard sans pouvoir bien sûr présumer de leur espérance de vie. De plus, on ne dispose pas à l'heure actuelle de références précises sur la correspondance entre la densité optique obtenue et la concentration réelle en anticorps recherché. On ne peut donc, de manière certaine, que distinguer les animaux séronégatifs des animaux séropositifs. Enfin, cette méthode s'intéresse uniquement aux anticorps présents dans le compartiment sanguin alors qu'il n'a pas encore été établi de manière certaine qu'il y ait une proportionnalité stricte entre la population en immunoglobulines des différents sites mucosaux. On ne peut par conséquent qu'extrapoler les résultats observés à l'échelle systémique, à ce qui se passe au niveau local dans le tractus digestif.

Malgré les limites énoncées précédemment, le prélèvement de sang sur buvard reste une technique relativement rapide et facile, mais surtout peu invasive, permettant de tester un

nombre élevé de jeunes animaux. Ainsi les sérologies réalisées nous ont confirmé avant inoculation que les animaux n'avaient pas été en contact préalablement avec le pathogène. Après l'inoculation, elles n'ont pas mis en évidence de différence de production d'immunoglobulines A liée à l'âge des animaux au sevrage. Nous avons, par contre, pu noter que les animaux qui survivent à l'infection semblent développer une réponse immunitaire humorale plus forte que les autres. Il ne nous est pas possible de dire a contrario si cette réponse humorale est bel et bien responsable de la survie des animaux concernés. Des études complémentaires afin d'affiner l'utilisation du prélèvement de sang sur buvard couplé au test ELISA devraient apporter des résultats intéressants sur l'évolution de la réponse humorale des animaux au cours de l'infection.

La mise à jour des propriétés protectrices du lait maternel va nécessiter encore de nombreuses investigations. Celles-ci sont motivées par les très nombreuses applications, tant en médecine préventive humaine que vétérinaire, que permettrait l'isolement de molécules naturelles capables de protéger les jeunes organismes contre les entéropathies. Les équipes de l'UR 52 de l'INRA SRC de Toulouse associées à celles de l'UMR 1225 de l'ENVT ont décidé d'explorer la piste des acides gras à chaîne moyenne. Une nouvelle expérimentation qui débutera en Février 2005 aura pour but d'étudier l'influence d'une supplémentation en triglycérides à chaîne moyenne sur la résistance des lapereaux aux agents entéropathogènes.

ANNEXES

Avant J36

| |
|----------|
| - |
| - |
| - |
| - |
| - |
| Barrière |
| - |
| - |
| - |
| - |
| - |
| - |
| - |
| S21 |

| | |
|-----------|--------|
| S21I28 | S35I28 |
| sanitaire | n°1 |
| - | - |
| - | - |
| - | S35 |
| S21 | S35 |
| S21 | S35 |
| S21 | |
| S35 | |
| S35 | |

| | |
|----------|---------------|
| S35I28 | S21I28 |
| - | - |
| - | - |
| Barrière | sanitaire n°1 |
| - | - |
| - | - |
| - | - |
| - | - |
| S35 | S21 |

Cages individuelles

| | |
|---------|-----------|
| Lapines | Lapereaux |
|---------|-----------|

Cages collectives

Après J36

| |
|----------|
| - |
| - |
| - |
| - |
| - |
| Barrière |
| - |
| - |
| - |
| - |
| - |
| Barrière |
| - |
| S35NI-3' |
| S21NI-3' |
| S35NI-4 |
| - |

| | |
|-----------|-----------|
| S21I28 | S35I28 |
| sanitaire | n°1 |
| S21I42-7' | S21I42-5' |
| S35I42-7' | S35I42-5' |
| S21I42-8 | S21I42-6 |
| S35I42-8 | S35I42-6 |
| - | - |
| sanitaire | n°2 |
| - | - |
| S35NI-1' | - |
| S21NI-1' | |
| - | |
| - | |

| | |
|-----------|---------------|
| S35I28 | S21I28 |
| - | - |
| - | - |
| Barrière | sanitaire n°1 |
| S35I42-1 | S21I42-1 |
| S35I42-2' | S21I42-2' |
| S35I42-3 | S21I42-3 |
| S35I42-4' | S21I42-4' |
| - | - |
| - | - |
| Barrière | Sanitaire n°2 |
| - | - |
| S35NI-5 | S21NI-5 |
| S35NI-6' | S21NI-6' |
| S35NI-7 | S21NI-7 |
| S35NI-8' | S21NI-8' |

Annexe 1 : Répartition des cages des animaux dans le bâtiment d'élevage

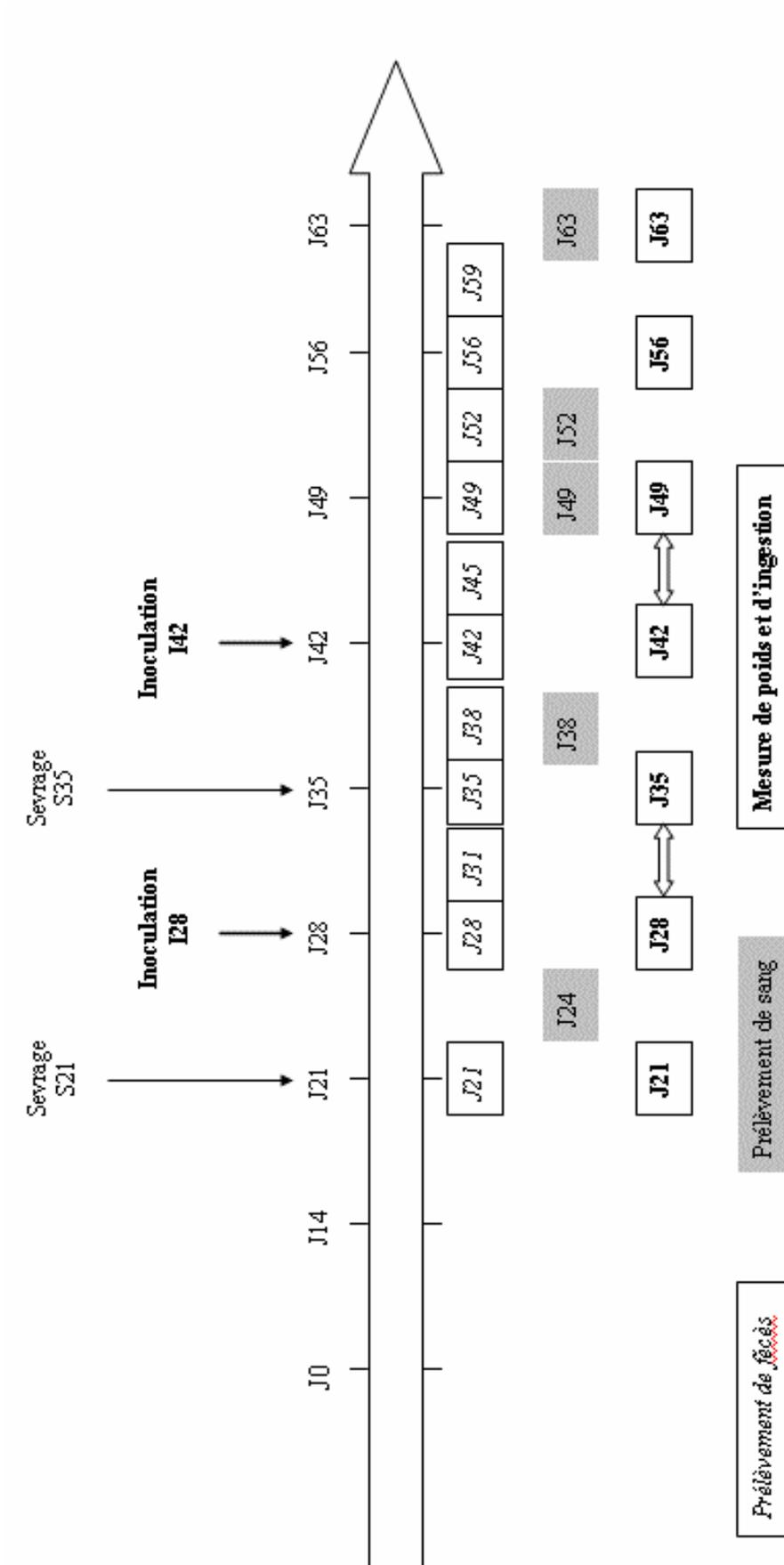
Composition (%)

| | |
|-----------------------------|------|
| Pulpes de betteraves | 13,0 |
| Luzerne 17 LP | 25,0 |
| Tourteau de soja 48 Brésil | 5,0 |
| Blé 11,2% de MAT | 11,0 |
| Graines de soja extrudées | 4,0 |
| Tourteau de tournesol 30/25 | 13,8 |
| Son fin de blé | 20,0 |
| Sucre | 5,0 |
| Sel | 0,6 |
| CMV lapin AL132 | 0,5 |
| CMV lapin CL21L | 0,5 |
| Méthionine DL 99% | 0,1 |
| Huile de tournesol | 1,0 |
| Carbonate de calcium | 0,5 |

Composition chimique théorique de l'aliment expérimental (% de MB)

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Amidon (enzymatique) | 11,7 |
| MAT | 17,7 |
| Matières grasses brutes | 4,0 |
| NDF | 32,3 |
| ADF | 18,4 |
| ADL | 4,0 |
| Cellulose VS (ADF-ADL) | 14,5 |
| Hémicelluloses VS (NDF-ADF) | 13,9 |
| Energie digestible ED (Kcal/kg brut) | 2481,3 |
| Protéines digestibles PD | 13,4 |
| PD/ED (g/Mcal) | 53,9 |

Annexe 2 : Composition de l'aliment des lapereaux



Annexe 3 : Planning général de l'expérimentation

| Code | Symptômes |
|-------------|---|
| Pr | Prostration |
| Pp | Poil piqué |
| R | Problèmes respiratoires, coryza, toux |
| B+ | Ballonnement important |
| L | « bruit d'eau » au niveau de l'estomac ou du caecum lors de la palpation |
| P | Parésie caecale (contenu compact ou dur à la palpation) |
| DF | Diarrhée faible, souillure faible et peu colorée (clair à jaune clair) |
| DD | Diarrhée débutante, faible souillure colorée (brun, marron) |
| DN | Diarrhée nette, forte souillure colorée (brun, marron) |
| DS | Diarrhée sèche, souillure colorée mais sèche |
| M | Présence de mucus |
| A | Autres : mammites, maux de pattes, oedèmes, patte cassée, ... A préciser sur la grille |
| OK | Aucun (bon état sanitaire) |

Annexe 4 : Grille de notation des éléments de l'inspection sanitaire des lapereaux

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Lebas F., Coudert P., De Rochambeau H., Thébault R.G. (1996). Le lapin. Elevage et pathologie. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. pp 21-28
- 2- Pastoret P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A. (1998). Handbook of vertebrate immunology
- 3- Crane M.A., Kingzette M., Knight K.L. (1996). Evidence for limited B lymphopoiesis in adult rabbits. *Journal of experimental medicine* 183, 2119-2127.
- 4- Knight K.L, Winstead C.R. (1997). B lymphocyte development in the rabbit. *International review of immunology* 15, 129-163.
- 5- Owen R.L., Jones A.L (1974). Epithelial cell specialization within human peyer's patches : an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66 (2), 189-203.
- 6- Chodirker W.B., Tomasi T.B. (1963). Gamma-globulins. Quantitative relationships in human serum and nonvascular fluids. *Science* 142, 1080-1081.
- 7- Newcomb R.W., Normansell D., Stanworth D.R., (1968). A structural study of exocrine IgA globulin. *Journal of immunology* 101, 905-914.
- 8- Kagnoff M.F. (1993). Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 105, 1275-1280.
- 9- Bouvet J.P, Vincent A.F. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infection and immunity*.67, 2687-2691.
- 10- Craig S.W., Cebra J.J (1971). Peyer's patches : an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *The journal of experimental medicine*. 134,188-200.
- 11- Externest D., Meckelein B., Schmidt M.A, Frey A. (July 2000). Correlations between antibody immune responses at different mucosal effector sites are controlled by antigen type and dosage. *Infection and immunity* 68 (7), 3830-3839.
- 12- German J.B.,Dillard C.J., Ward R.E. (Nov 2002). Bioactive components in milk. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5 (6), 653-658.
- 13- Umesaki Y., Setoyama H. (2000). Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes and infection* 2, 1343-1351.
- 14- Barrow P.A, Fuller R., Newport M.J. (Dec. 1977). Changes in the microflora and physiology of the anterior intestinal tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to the pathogenesis of diarrhea. *Infection and immunity* 18 (3), 586-595.

- 15- Franklin M.A., Mathew A.G., Vickers J.R., Clift R.A. (Nov. 2002). Characterization of the microbial population and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *Journal of animal science* 80 (11), 2904-2910.
- 16- Kelly D., Smyth J.A and Mac Cracken K.J. (1991). Digestive development of early-weaned pig 1- Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *British journal of nutrition* 65, 169-180.
- 17- Kelly D., Smyth J.A and Mac Cracken K.J. (1991). Digestive development of early-weaned pig 2- Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *British journal of nutrition* 65, 181-188.
- 18- Efird R.C., Armstrong W.D., Herman D.L. (1982). The development of digestive capacity in young pigs : effects of age and weaning system. *Journal of animal science* 55 (6), 1380-1387.
- 19- Gidenne T., Fortun-Lamothe L. (2002). Feeding strategy for young rabbits around weaning : a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal science* 75, 169-184.
- 20- Kauffman F. (1947). The serology of the coli group. *Journal of immunology* 57, 71-100
- 21- From the national institute of allergy and infectious diseases (June 1983). Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. *The journal of infectious diseases* 147 (6), 1108-1118.
- 22- Jallat C., Livrelli V., Darfeuille-Michaud A., Rich C. and Joly B. (Aug 1993). *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France : high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *Journal of clinical Microbiology*. 31 (8), 2031-2037.
- 23- Regua-Mangia A.H., Gomes T.A.T., Vieira M.A.M, Andrade J.R.C., Irino K., Teixeira L.M. (Feb 2004). Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of infection* 48 (issue 2), 161-167.
- 24- Ratchtrachenchai O.A., Subpasu S., Hayashi H., Ba-Thein W. (March 2004). Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *Journal of medical microbiology* 53, 237-243.
- 25- Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Mourino M., Juarez A., and Jansen W.H. (Dec. 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.

- 26- Peeters J.E., Geeroms R., Orskov F. (June 1988). Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infection and immunity* 56 (6), 1442-1448.
- 27- Camguilhem R., Milon A. (Apr. 1989). Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits : clues to diagnosis of pathogenic strains. *Journal of clinical microbiology* 27 (4), 743-747.
- 28- Peeters J.E., Geeroms R., Glorieux B. (1984). Experimental *Escherichia coli* enteropathy in weanling rabbits : clinical manifestations and pathological findings. *Journal of comparative pathology* 94, 521-528.
- 29- Lebas F., Coudert P., De Rochambeau H., Thébault R.G. (1996). Le lapin. Elevage et pathologie. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. pp 107-124.
- 30- Vallance B.A., Finlay B.B. (Aug. 2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 b(16), 8799-8806.
- 31- Milon A., Esslinger J., Camguilhem R. (Aug. 1990). Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. *Infection and immunity* 58 (8), 2690-2695.
- 32- Marches O., Nougayrede J.P., Boullier S., Mainil J., Charlier G. et al. (Apr. 2000). Role of Tir and Intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103 : H2. *Infection and immunity* 68 (4), 2171-2182.
- 33- China B., Goffaux F. (1999). Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Veterinary research* 30, 181-202.
- 34- Heczko U., Abe A., Finlay B.B. (2000). In vivo interactions of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103 with its host : an electron microscopic and histopathologic study. *Infection and immunity* 2, 5-16.
- 35- Kelly D., Coutts A.G.P. (2000). Development of digestive and immunological function in neonates : role of early nutrition. *Livestock Production Science* 66, 161-167.
- 36- Newsburg D.S., Peterson J.A., Ruiz-Palacios G.M., Matson D.O. et al. (April 1998). Role of human milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *The lancet* 351, 1160-1164.
- 37- Ochoa T.J., Noguera-Obenza M., Ebel F., Guzman C.A., Gomez H.F., Cleary T.G. (sept 2003). Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 71 (9), 5149-5155.

- 38- Teraguchi S., Shin K., Fukuwatari Y., Shimamura S. (Mar. 1996). Glycans of bovine lactoferrin function as receptors for the type 1 fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 64, 1075-1077.
- 39- Gomez H.F, Ochoa T.J., Carlin L.G, Cleary T.G. (Jan.2003). Human lactoferrin impairs virulence of *shigella flexneri*. *The journal of infectious diseases* 187, 87-95.
- 40- Pascual J.J., Cervera C., Blas E., Fernández-Carmona J., 1999. Effect of high fat diets on the performance, milk yield and milk composition of multiparous rabbit does. *Animal Science*, 68 : 151-162.
- 41- Kabara J.J., Swieczkowski D.M., Conley A.J. and Truant J.P. (July 1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2 (1), 23-28.
- 42- Dierick N.A., Decuypere J.A., Molly K., Van Beek E., Vanderbeke E. (2002). The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livestock production science* 75,129-142.
- 43- Dierick N.A., Decuypere J.A., Molly K., Van Beek E., Vanderbeke E. (2002). The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effect on the luminal gut flora and growth performance. *Livestock production science* 76, 1-16.
- 44- Isaacs C.E., Litov R.E. and Thormar H. (1995). Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *Nutritional biochemistry* 6,362-366.
- 45- Van Immerseel F., De Buck J., Boyen F, Bohez I., Pasmans F. et al. (June 2004). Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hila* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Applied environmental microbiology* 70 (6),3582-3587.
- 46- Falk G., Hooper L.V, Midtvedt T., Gordon J.I. (Dec. 1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem : what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and molecular biology reviews* 62, 1157-1170.
- 47- Talham G.L., Jiang H., Bos N.A., Cebra J.J. (Apr. 1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infection and immunity* 67 (4), 1992-2000.

- 48- Umesaki Y., Setoyama H., Matsumoto S., Imaoka A., Itoh K. (July 1999). Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infection and immunity* 67 (7), 3504-3511.
- 49- Heczko U., Abe A., Finlay B.B. (2000). Segmented filamentous bacteria prevent colonization of enteropathogenic *Escherichia coli* O103 in rabbits. *The journal of infectious diseases* 181, 1027-33.
- 50- Silva A.M., Bambirra E.A., Oliveira A.L., Souza P.P., Gomes D.A., Vieira E.C. and Nicoli J.R. (1999). Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of applied microbiology* 86, 331-336.
- 51- Ogawa M., Shimizu K., Nomoto K., Takahashi M., Watanuki M. et al. (Feb. 2001). Protective effect of *Lactobacillus casei* strain shirota on shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 infection in infant rabbits. *Infection and immunity* 69 (2), 1101-1108.

