

Entérite du lapin à *Escherichia coli* O103. Essais de prévention par vaccination

La production française de viande de lapin, de l'ordre de 160 000 tonnes par an, représente 2,4 % de la production agricole globale et 5 % de la valeur des productions animales, soit un niveau équivalent à celui de la production ovine.

La pathologie digestive d'origine bactérienne est un des problèmes majeurs chez les animaux à l'engrais, avec, au premier rang, les entérites dues aux colibacilles entéropathogènes, qui peuvent entraîner des taux de mortalité de plus de 30 %, et dont l'évolution n'est pas entravée par les traitements médicamenteux. La vaccination des lapereaux devrait permettre de mieux contrôler ces infections.

La cause essentielle de mortalité chez le lapereau sevré est la pathologie digestive, avec une symptomatologie évocatrice associant diarrhée et déshydratation. En élevage intensif, malgré l'utilisation systématique d'aliments supplémentés en anticoccidiens qui ont permis une quasi-disparition des coccidioses digestives, certains élevages continuent à voir leur rentabilité gravement entamée par des affections entéritiques, associées le plus souvent à une prolifération iléo-cæcale d'*Escherichia coli*.

Les particularités de la physiologie digestive des lagomorphes expliquent en partie leur grande sensibilité aux affections entéritiques. Toute perturbation de la cæcotrophie (émission quotidienne de cæcotrophes ou « fèces molles », ingérés dès leur apparition au niveau de l'anus) ou du transit intestinal a des conséquences pathologiques rapides. De nombreux facteurs d'environnement (froid, chaleur, ambiance bruyante, déficience de l'aération...) ou alimentaires (abreuvement insuffisant, aliment à taux cellulosique insuffisant, ou excédentaire en apport protéique, utilisation d'antibiotiques...) peuvent perturber la physiologie digestive du lapin, parfois par simple changement de son comportement alimentaire (arrêt de la cæcotrophie), parfois du fait de modifications plus durables du transit ou de la flore digestive normale. La stase digestive, suivie de modifications chimiques du contenu cæcal (déséquilibre des acides gras, augmentation du pH...) favorise une pullulation bactérienne anormale, avec très fréquemment un développement exagéré de la flore colibacillaire, qui s'accompagne d'une diarrhée. La flore cæcocolique normale du lapin est dominée par les anaérobies et est relativement pauvre en colibacilles : les taux cæcaux et fécaux normaux n'excèdent pas 10^3 - 10^4 *E. coli* par gramme. Dans les cas de diarrhées d'étiologie complexe, ces taux peuvent augmenter jusqu'à 10^8 - 10^9 *E. coli* par gramme, mais les souches de colibacilles isolées de tels animaux et réadministrées par voie

Résumé

La colibacillose du lapin sevré est un syndrome entéritique grave, épizootique dans les élevages rationnels, accompagné de taux de mortalité parfois supérieurs à 30 %. Elle est provoquée par des *Escherichia coli* entéropathogènes, appartenant essentiellement, en France, au sérotype O103 et à des biotypes ne fermentant pas le rhamnose. Ces germes colonisent le tube digestif des lapins grâce à une adhésine protéique de p.m. 32 000, qui leur permet de s'attacher aux entérocytes.

Les traitements anti-infectieux sont peu ou pas efficaces. Seule la vaccination par voie orale, stimulant l'immunité locale des animaux, a jusqu'à présent montré une efficacité certaine dans le contrôle de la maladie. La vaccination des mères ne permet pas d'obtenir une protection des jeunes après le sevrage. Par contre, la vaccination orale des lapereaux dès le sevrage, durant 4 jours à l'aide d'un vaccin inactivé préparé par culture d'une souche O103 dans un milieu favorable à l'expression de l'adhésine, protège 100 % des animaux contre tous les signes cliniques d'une infection expérimentale ultérieure. Cette méthode de vaccination originale est susceptible d'améliorations à mesure de l'avancée des connaissances sur la maladie et les colibacilles qui la provoquent.

orale à des lapins sains ne manifestent aucun pouvoir pathogène. La colibacillose n'est, dans ce cas, que secondaire aux facteurs étiologiques ou prédisposants cités plus hauts et une amélioration des conditions d'élevage, un meilleur équilibre alimentaire, sont en général suffisants pour lutter contre ces entérites « non spécifiques ». Par contre, une forme différente de colibacillose digestive est apparue en France depuis une dizaine d'années. Celle-ci, beaucoup plus préoccupante, frappe pendant la phase d'engraissement. Elle est due à des *E. coli* appartenant à des sérogroupes et biotypes spécifiques, entéropathogènes expérimentalement, souvent multirésistants aux antibiotiques. C'est de cette forme que nous traitons ici.

1 / L'entérite colibacillaire du lapin

1.1 / La maladie en élevage

Depuis le début des années 80, de nombreux élevages de lapin de chair ont été confrontés à des syndromes entéritiques se développant dès les jours suivant le sevrage, et provoquant des pertes de poids importantes et des taux de mortalité parfois supérieurs à 30 %. Ces syndromes, d'allure explosive, sont rebelles à toute thérapeutique antibiotique, compte tenu de l'arsenal disponible chez le lapin et de l'allure épizootique de l'affection, si bien que dans certains cas graves, l'éleveur est contraint de stopper sa production pour désinfection et vide sanitaire avant de reconstituer un nouveau cheptel de reproducteurs. Des taux élevés de colibacilles (le plus souvent supérieurs à 10^9 germes par g)

Figure 1. Lapereau infecté expérimentalement par la souche B10 (O103, rhamnose négative). Souillure du train postérieur due à la diarrhée.

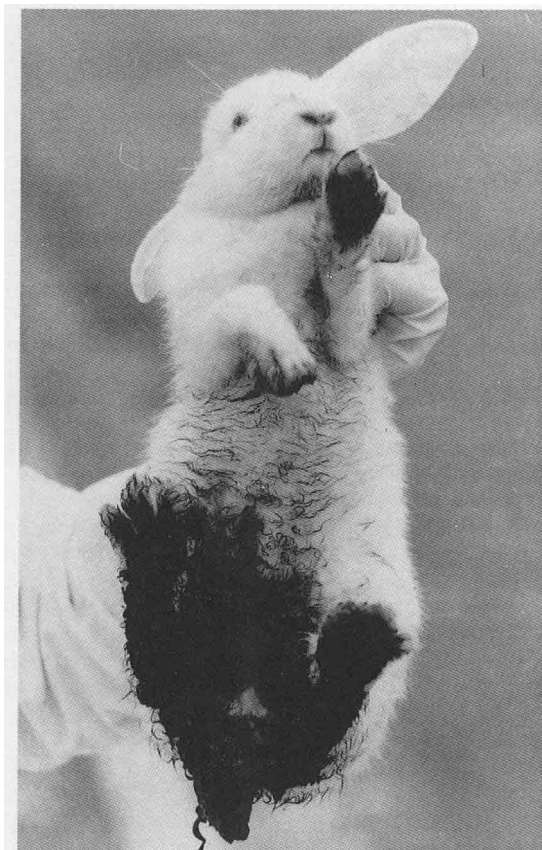
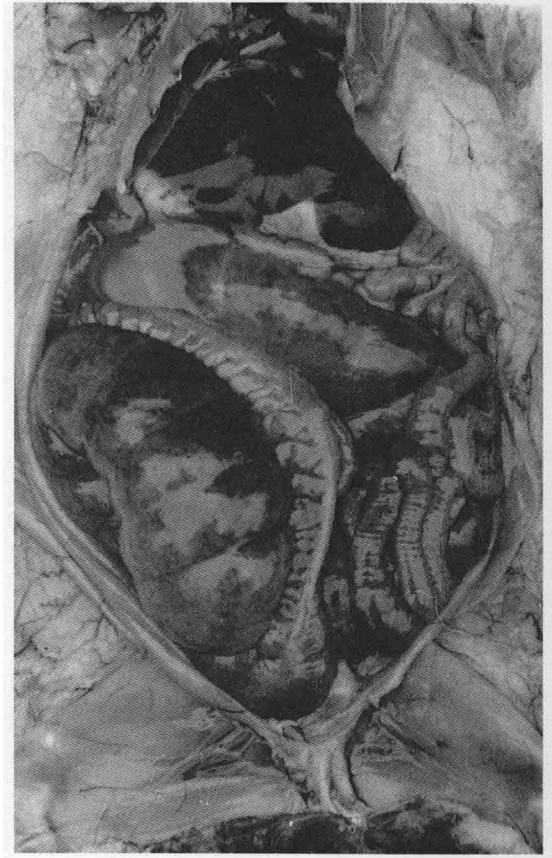


Figure 2. Lapereau infecté expérimentalement par la souche B10 (O103, rhamnose négative). Lésions digestives : hypertrophie caecale avec contenu liquide.



sont trouvés dans les fèces des animaux malades et de nombreux auteurs ont démontré le pouvoir pathogène des souches isolées de tels animaux, en reproduisant des diarrhées mortelles par simple administration orale de doses relativement faibles (10^2 à 10^4 bactéries) (Licois *et al* 1982, Renault *et al* 1983, Peeters *et al* 1984, Camguilhem 1985). Cette entité se distingue donc clairement des colibacillooses secondaires aux erreurs d'élevage, notamment par la pathogénicité des souches bactériennes en cause.

1.2 / La colibacillose expérimentale à *E. coli* O103

En 1985, nous avons mis au point un modèle expérimental de colibacillose, en reproduisant la maladie sur 142 lapereaux sevrés. L'infection par voie orale par 10^4 ou 10^7 *E. coli* appartenant à la souche B10 (O103, rhamnose négative : voir ci-dessous) (Camguilhem *et al* 1986) s'accompagne d'une diarrhée chez 90 % des animaux infectés et les taux de mortalité, 25 jours après infection, étaient respectivement de 50 % et 62 % dans les lots traités à 10^4 et 10^7 . Des pertes de poids très importantes, de 20 à 30 %, sont enregistrées avant la mort. Les fèces sont très liquides et souillent le train postérieur des animaux (figure 1). A l'autopsie, les lésions intéressent exclusivement l'appareil digestif, avec un contenu liquide et nauséabond du cæcum et du colon, et, dans certains cas, des lésions

hémorragiques de la séreuse en « coups de pinceau » au niveau du cæcum et du colon proximal, dont le contenu est hémorragique (figure 2).

A l'histologie, on observe une colonisation bactérienne de l'apex des villosités intestinales, des foyers de destruction de l'épithélium et des hémorragies. Le contenu cæcal des animaux malades présente des taux élevés de colibacilles (10^7 à 10^8 par ml), et son pH est plus élevé que chez les animaux sains (6,6 contre 5,8).

Le pouvoir pathogène de la souche B10 a été depuis largement confirmé et ce modèle expérimental a, par la suite, été complété pour l'étude de protocoles de traitement et de vaccination.

2 / Caractéristiques des souches d'*E. Coli* entéro-pathogènes pour le lapin sevré

2.1 / Enquête épidémiologique et protocole d'étude des souches de colibacilles isolées en France dans les élevages infectés

Entre 1984 et 1987, un total de 575 souches d'*Escherichia coli* provenant de 119 élevages répartis sur 34 départements et où sévissaient des diarrhées après sevrage ont été isolées. Ces souches ont été caractérisées par leur séro-groupe O (typage de leur lipopolysaccharide ou antigène O), à l'aide de 12 sérums anti-O correspondant aux sérogroupes les plus fréquemment rencontrés chez le lapin.

Cent vingt six souches (au moins une par élevage), représentatives des 575 souches isolées, ont ensuite été caractérisées par leur biotype, par contrôle de leur pouvoir de fermentation d'une série de cinq carbohydrates (sorbitose, dulcitol, raffinose, saccharose et rhamnose), selon un schéma de typage proposé par Okerman et Devriese (1985).

Enfin, un lot de 39 souches, représentatives des 126 précédentes quant aux sérogroupes et biotypes, ont été retenues pour des études sur leur sensibilité aux antibiotiques et leur pouvoir pathogène expérimental. A cet effet, chaque souche sélectionnée a été administrée *per os* à 3 lapins de 37 jours, à la dose de 10^9 cellules. Un suivi clinique (enregistrement des pertes de poids, des diarrhées et de la mortalité) et microbiologique (recherche des coccidies, mesure des taux de colibacilles dans les contenus cæcaux et réisolement de la souche inoculée) permettaient d'apprécier le pouvoir pathogène expérimental de chaque souche. Cette étude a démontré l'existence d'une relation univoque entre le pouvoir pathogène des colibacilles isolés des lapins diarrhéiques en France et les marqueurs diagnostiques éventuels que sont leurs sérogroupes, biotypes, ou antibiotypes. En outre, elle a débouché - au travers de l'étude des facultés d'adhésion de ces souches à des systèmes cellulaires *in vitro* - sur la découverte d'un adhésine caractéristique des souches O103 hautement pathogènes chez le lapin sevré.

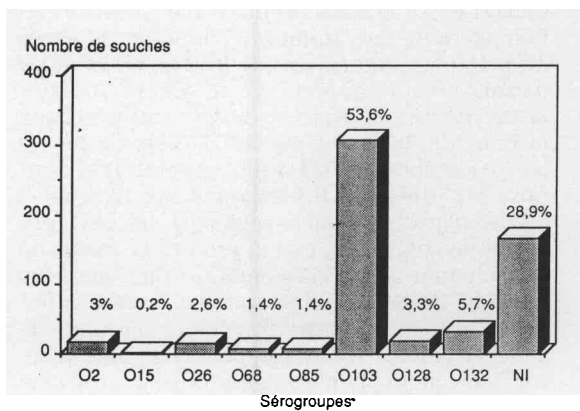
2.2 / Sérogroupes

Dans notre étude, plus de la moitié des souches d'*E. coli* isolées en France de lapins sevrés diarrhéiques appartiennent au séro-groupe O103 (figure 3) (Camguilhem et Milon 1989). De telles souches sont isolées sur l'ensemble du territoire. Les autres sérogroupes, beaucoup moins fréquents, sont dans l'ordre O132, O128, O2 et O26. Dans la quasi totalité des cas, les souches isolées dans un même élevage appartiennent au même séro-groupe.

Plusieurs auteurs ont décrit des souches de colibacilles pathogènes pour le lapin sevré appartenant au sérotype O15:H-. Ces souches semblent prédominantes notamment dans les pays du Bénélux (Okerman *et al* 1985, Peeters *et al* 1988) et semblent proches de la souche RDEC-1 (Rabbit Diarrheal *E. coli* - type 1), qui est considérée comme un modèle des souches entéropathogènes d'*E. coli* (Cantey et Blake 1977). Parmi les souches que nous avons isolées, une seule appartenait à ce séro-groupe, et son pouvoir pathogène n'a pu être confirmé. Les souches de colibacilles pathogènes isolées chez le lapin sevré semblent donc montrer des répartitions géographiques très nettes, avec une forte proportion de souches O103 en France, alors que des pays limitrophes tels que la Belgique présentent une dominance de souches O15. Ceci pourrait être lié à l'intégration des systèmes d'élevage industriels du lapin, qui permet la diffusion des souches pathogènes par le biais des élevages de reproducteurs.

Certaines souches d'*Escherichia coli* provoquent des entérites chez le lapin sevré, avec des taux de mortalité importants. La maladie est rebelle aux traitements.

Figure 3. Sérogroupes obtenus chez 575 souches d'*Escherichia coli* isolées de lapereaux sevrés diarrhéiques dans des élevages rationnels français entre 1984 et 1987. N.I. = souches non typables ou de sérotypes non identifiés.



2.3 / Biotypes

Sur 126 souches provenant de 119 élevages, 14 biotypes différents ont été identifiés selon le procédé simplifié d'Okerman (Okerman et Devriese 1985). L'étude de la capacité des souches à fermenter le rhamnose est tout à fait intéressante: elle permet de distinguer 74 souches rhamnose négatives appartenant aux seuls sérogroupes O103 et O26 (soit 70 des 72

Tableau 1. Pathogénicité de 39 souches d'*E. coli* isolées de lapins sevrés diarrhéiques et appartenant à différents sérogroupes et biotypes.

Pathogénicité*	Sérogroupe	Nb	Biotype**
+++	O103	1	6 (1 souche)
	O103	14	14 (14 souches)
	O26:H11 et r:H11	4	13 (4 souches) (toutes Rha -)
+ / -	O103	1	30
	O2	1	27
	O103	1	30
	O132	3	30 (3 souches) (toutes Rha +)
-	O103	1	30
	« O68 »	4	19, 30, 31 (4 souches)
	O2	4	27, 28, 30, 31 (4 souches)
	O132	2	30 (2 souches)
	O128	1	30
	O85	1	18
	O15	1	30

* : Appréciee par infection expérimentale après administration par voie orale de 10^{10} bactéries viables de chaque souche testée à des lots de 3 lapins sevrés. +++ : Diarrhées sévères, pertes de poids, déshydratation, mortalités. + / - : Diarrhées passagères, retards de croissance, pas de mortalités. ** : Tous les codes inférieurs à 16 correspondent à des biotypes rhamnose négatifs. Voir Camguilhem et Milon 1989 pour plus de précisions.

souches de sérogroupe O103 testées, et la totalité des souches O26 testées) (Camguilhem et Milon 1989).

2.4 / Pouvoir pathogène expérimental

L'infection expérimentale de lots de lapins sevrés par 39 souches différentes, représentatives des différents sérogroupes et biotypes, a montré trois types de réponses (tableau 1) (Camguilhem et Milon 1989) : (i) un premier lot de souches provoque des pertes de poids graves, des diarrhées profuses avec déshydratation et mort des animaux 5 à 14 jours après infection, accompagnées de lésions intestinales parfois hémorragiques. Ainsi, les 15 souches O103 rhamnose-négatives testées ont provoqué la mort de 33 lapins sur 44 (75 %) ; de même les 4 souches O26:H11 ou rough:H11 rhamnose-négatives ont tué 9 lapins sur 12. Toutes les souches rhamnose-négatives testées font partie de ce groupe, ce qui montre la valeur de la recherche de la fermentation du rhamnose dans le diagnostic des souches entéropathogènes pour le lapin. (ii) un deuxième groupe de souches, toutes rhamnose-positives, plus hétérogènes quant à leurs sérogroupes, provoque des diarrhées légères, avec retard de croissance passager, sans mortalité. (iii) les autres souches, également rhamnose positives, ne provoquent aucun trouble et peuvent être qualifiées de non pathogènes. Leur isolement de lapins diarrhéiques est secondaire à une diarrhée d'autre origine. Ces souches font partie de la flore normale du lapin.

Ces résultats démontrent que les souches de colibacilles hautement pathogènes pour le lapin ne se recrutent, en France, que parmi les souches O103, épidémiologiquement prédominantes, et O26 (isolées dans 4 élevages situés dans le même département). Toutes ces

souches présentent un marqueur - le caractère rhamnose négatif - assez peu fréquent chez les colibacilles pour en faire un caractère de diagnostic bactériologique simple et fiable, à la portée de tout laboratoire impliqué dans le diagnostic des colibacillooses en médecine vétérinaire. La recherche conjointe du sérogroupe et du caractère rhamnose négatif permet en effet de distinguer aisément ces souches, des *E. coli* peu ou non pathogènes isolés chez le lapin. Le sérogroupe à lui seul semble insuffisant car une minorité de souches O103 rhamnose positives et non - ou peu - pathogènes semblent circuler dans le cheptel français (tableau 1).

Aucune information intéressante n'a été apportée par l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques. Les souches pathogènes O103 et O26 se répartissent respectivement dans 8 et 2 antibiotypes différents (Camguilhem et Milon 1989).

2.5 / Adhésion bactérienne aux cellules intestinales et de lignées

Les bactéries responsables de troubles digestifs présentent, dans l'immense majorité des cas, des systèmes biochimiques appelés « adhésines », qui leur permettent de s'adsorber spécifiquement aux entérocytes par le biais d'interactions de type ligand-récepteur. Ce phénomène d'adhésion aux muqueuses est considéré comme un facteur intrinsèque de pathogénicité. Il permet à ces bactéries de déjouer certains mécanismes non spécifiques de défense de l'organisme tels que péristaltisme, couche de mucus, flux liquidiens qui contribuent à l'élimination des microorganismes. Il permet également à ces germes non résidents d'entrer en compétition avec la flore normale, elle-même souvent formée de germes adhérents aux

En France, les souches d'*E. coli* très pathogènes pour le lapin appartiennent essentiellement au sérogroupe O103, à des biovar rhamnose négatifs, et elles expriment une adhésion spécifique.

Souches	Adhésion villosités de lapin de 8 jours	Adhésion villosités de lapin de 6 semaines	Adhésion cellules HeLa	Protéine de 32 kDa dans extraits de membrane
O103, rha -	+	+	+	+
O26, rha -	-	+/-	+/-	-
RDEC-1	-	+	-	-
O103, rha +	-	+	-	-
O128, rha +	+	+	+	+

Tableau 2. Propriétés d'adhésion et d'expression de la protéine de p.m. 32 000 chez des souches d'*E. Coli* isolées de lapins sevrés diarrhéiques. La souche RDEC-1 (voir texte) est un don de L. Okerman (Université de Gand). Pour plus de détails, voir Milon et al 1990b.

muqueuses, et de coloniser la surface disponible, première étape avant l'expression de leur pouvoir pathogène. La souche américaine RDEC-1 (Cantey et Blake 1977) présente un système d'adhésion à la muqueuse iléale du lapin, qui a été bien étudié et qui en fait un des principaux représentants d'une des catégories de colibacilles responsables de troubles digestifs (toutes espèces confondues) : les EPEC (Enteropathogenic *E. coli*) (Levine 1987). Les EPEC forment une catégorie différente des ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*) que l'on retrouve, par exemple, dans les diarrhées néo-natales des veaux et des porcelets. L'adhésine de RDEC-1 forme des pili (des « poils ») à la surface de la bactérie. Ces pili, appelés AF/R1 pour « Adhesive Factor of RDEC-1 », sont formés par polymérisation d'une protéine de p.m. 19 000, codée par un plasmide (Cheney *et al* 1983). L'AF/R1 a de l'affinité pour un récepteur porté par la membrane des entérocytes des lapins âgés de plus de 3 semaines (Cheney et Boedecker 1984). L'interaction AF/R1-récepteur permet une première étape d'adhésion du germe à la muqueuse, qui est suivie d'une seconde étape de contact étroit entre la membrane externe de la bactérie et la membrane cytoplasmique de l'entérocyte, avec effacement des microvillosités de cette dernière (Takeuchi *et al* 1978) : cette image dite « en coupe » ou « en piédestal » semble relativement typique des EPEC.

Nous avons entrepris, en 1989, l'étude des propriétés d'adhésion cellulaire des souches isolées des lapins français. Des tests d'adhésion ont été réalisés *in vitro* en mettant en présence les différentes souches caractérisées plus haut avec 3 systèmes cellulaires : des villosités intestinales de lapins de 8 jours et de 6 semaines (figure 4) et des cellules de lignée HeLa entretenues en culture (figure 5) (Esslinger *et al* 1989 ; Milon *et al* 1990). Une étude en parallèle des composants de membrane externe des souches, par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et test d'immunoempreintes nous a permis de mettre en évidence une nouvelle adhésine, différente de l'AF/R1, partagée par les souches O103 pathogènes et deux souches O128 non - ou peu - pathogènes (tableau 2). Cette protéine permet l'adhésion aux trois systèmes de cellules utilisés et présente un monomère protéique de p.m. 32 000 (Milon *et al* 1990b). Sa présence est corrélée avec un haut niveau de colonisation du tube digestif du lapin. Son déterminisme n'est apparemment pas plasmidique et la

structure bactérienne porteuse de cette protéine semble être de nature « pilaire » (données non publiées). L'expression de l'adhésine par les souches est hautement dépendante du milieu de culture et de la température d'incubation : les souches sont adhérentes *in vitro* et

Figure 4. Adhésion *in vitro* aux villosités intestinales de lapereaux de 8 jours. A : Souche non adhérente : la bordure en brosse est bien visible et forme un liseré brillant. B : souche B10 (O103, rhamnose négative). Notez les bactéries adsorbées à la surface de la bordure en brosse.

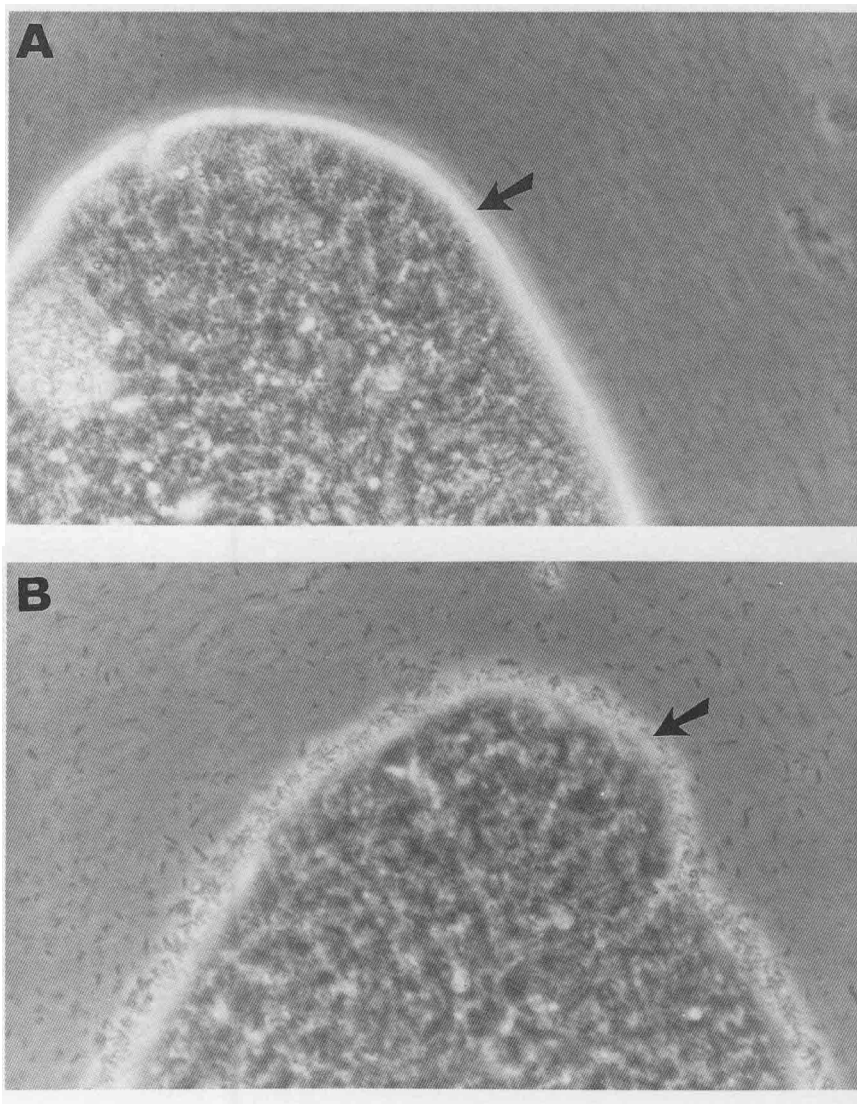
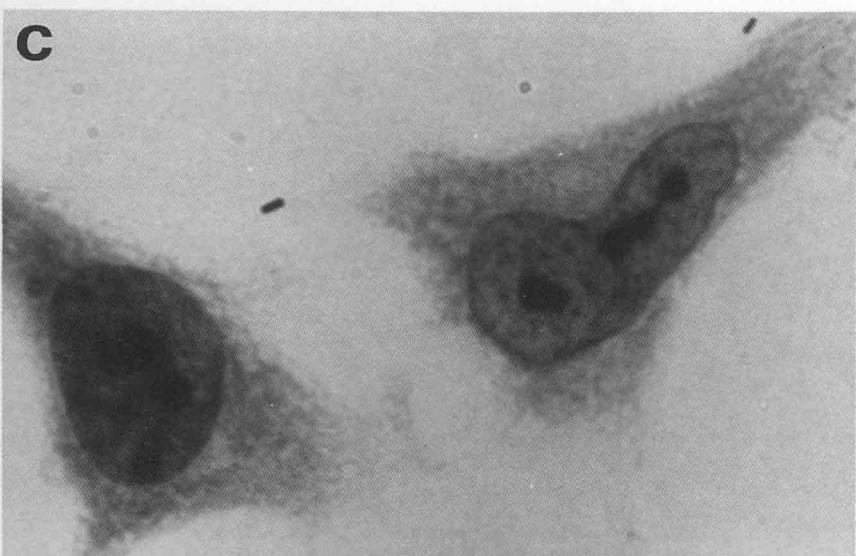
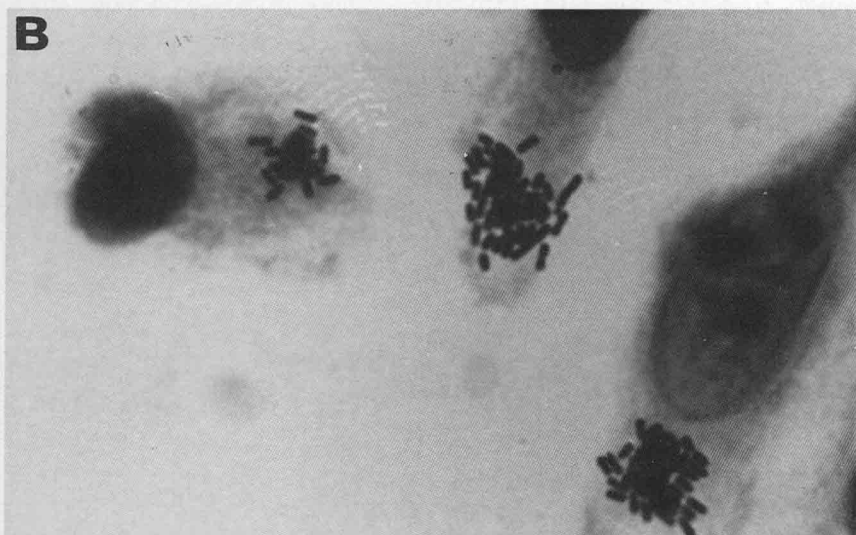
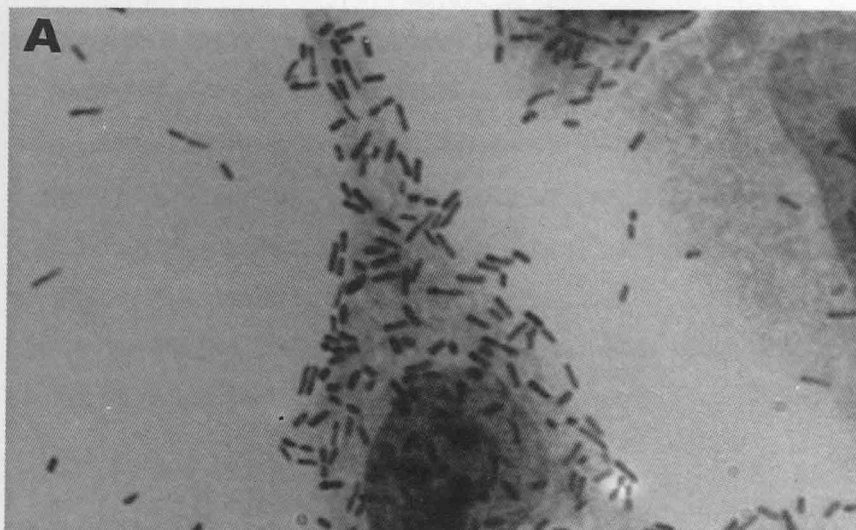


Figure 5. Adhésion *in vitro* aux cellules de lignées HeLa. A : souche B10 (O103, rhamnose négative) ; les bactéries recouvrent la totalité de la surface cellulaire (adhésion dite « diffuse »). B : souche C110 (rough : H11, rhamnose négative) ; les bactéries forment des microcolonies à la surface des cellules (adhésion dite « localisée »). C : souche non adhérente.



expriment la protéine de p.m.32 000 seulement après culture en milieu Penassay, à 37°C.

La découverte du système d'adhésion des souches O103 a permis des progrès dans la rationalisation des protocoles expérimentaux de vaccination utilisant des souches vaccinales inactivées ou vivantes exprimant fortement cet adhésine, qui s'avère un antigène vaccinal important. En outre, l'utilisation diagnostique de cette adhésine (par mise en évidence immunologique) est en cours de développement dans notre laboratoire.

En conclusion, l'entérite colibacillaire du lapin sevré est essentiellement due, en France, à des souches d'*Escherichia coli* de sérotype O103, de biotypes rhamnose-négatifs. Ceci justifie en partie le terme de « colibacillose O103 » largement répandu dans les milieux cynicoles. Les souches O103 pathogènes possèdent une adhésine protéique originale, de p.m. 32 000, différente de celle de la souche RDEC-1. L'intérêt de cette adhésine réside dans son caractère antigénique, participant à la vaccination, et dans son utilisation diagnostique possible.

3 / Vaccination contre la colibacillose O103

3.1 / Généralités - Raisons et contraintes de la vaccination

Dans le cadre de la colibacillose O103, le traitement antibiotique (colistine, néomycine, fluméquine ou enrofloxacin dans l'eau de boisson) apporte une amélioration passagère des résultats zootechniques, mais ne blanchit pas l'élevage (Camguilhem et Tournut 1986, Peeters *et al* 1990). Les antibiotiques ne peuvent pas être envisagés comme agents prophylactiques pour des raisons de coût et d'efficacité. Différentes méthodes prophylactiques par modification de l'alimentation (acidification de l'eau de boisson par addition d'acide acétique, augmentation du taux cellulosique de l'aliment) n'ont aucune action préventive (Lebas et Camguilhem 1986). Compte tenu de ces données, la prophylaxie de l'entérite colibacillaire O103 ne peut être envisagée que par la vaccination.

Trois données nous ont orientés vers le choix de protocoles de vaccination par voie orale des lapereaux au sevrage :

- la colibacillose est une affection strictement digestive. La mise en oeuvre d'une réponse immunitaire générale, obtenue en vaccinant par voie parentérale, risque d'être inefficace en terme de protection. Cette assertion a été vérifiée : la vaccination par voie intradermique ne protège pas les lapereaux contre une épreuve virulente (Camguilhem 1986). Il est nécessaire de stimuler les réponses immunitaires locales, au niveau digestif, de manière à obtenir des effecteurs capables de protéger la muqueuse au site d'infection. Ceci justifie l'administration d'un vaccin par voie orale, capable de stimuler le système immunitaire commun aux muqueuses. Les vaccins utilisés étant des bactéries inactivées par le formol (plus apte à conserver les structures antigéniques natives qu'un traitement par la chaleur), c'est-à-dire

des antigènes inertes, des administrations répétées et relativement massives sont nécessaires pour obtenir une bonne stimulation (Mestecky 1987).

- la colibacillose O103 n'est pas une affection néonatale ; elle n'atteint pas les jeunes au nid, dans les premiers jours de vie, mais sévit cliniquement seulement après le sevrage. Des protocoles impliquant une vaccination des mères et le transfert des anticorps maternels au jeune par voie transplacentaire et lactée (Peri et Rothberg 1986) - tels que ceux utilisés dans la prophylaxie des colibacilloses néonatales à ETEC du veau ou du porcelet - risquent d'être inefficaces, car leurs effets de protection locale cessent pratiquement dès l'arrêt de l'allaitement. Nous avons néanmoins vérifié ce point (voir 3-4).

- la colibacillose O103 frappe parfois très tôt après le sevrage. Il convient donc de tenter de protéger les jeunes le plus tôt possible. Une stimulation de ceux-ci pendant la phase d'allaitement pourrait sembler souhaitable, mais se heurte à l'immaturité de leur système immunitaire et à l'effet pervers que peut jouer le transfert de l'immunité maternelle sur les capacités de réponse propres au nouveau-né. Nous avons donc opté pour une vaccination des jeunes dès le sevrage (débutant à 27-30 jours d'âge).

3.2 / Protocoles expérimentaux utilisant la souche B10

Les protocoles de vaccination dont nous allons parler ont donc tous des points communs : la souche vaccinale est la souche B10 (O103, rhamnose négative) inactivée par le formol. Les doses quotidiennes sont de 2 à 4 10^9 corps bactériens. Le vaccin est administré *per os* à la sonde oesophagienne. L'efficacité de la vaccination est évaluée par une épreuve virulente réalisée 5 jours après arrêt de la vaccination, en administrant *per os* aux lapereaux une dose de 2 à 4 10^4 bactéries viables de la souche B10. Dans le cas de protocoles de vaccination exclusive des mères, les lapereaux sont éprouvés de la même façon, 10 jours après sevrage. Un lot témoin de lapereaux non vaccinés est éprouvé systématiquement en parallèle. L'efficacité de la vaccination est vérifiée par comparaison des lots vaccinés et témoins sur un plan clinique (contrôle des pertes de poids et courbes de croissance, des signes de diarrhée et de la mortalité), microbiologique (numérations des colibacilles et caractérisation des souches isolées, numération des coccidies), et immunologique (dosages d'anticorps de classe IgA anti-LPS O103 ou anti-adhésine dans les fèces, contenus caécaux ou lactosérums par ELISA, dosage d'IgA et d'agglutinines sériques). L'essentiel des résultats obtenus ont été résumés sur le tableau 3.

3.3 / Vaccination au sevrage par un vaccin inactivé

a / Protocole de base

Les premiers essais très positifs ont été obtenus grâce à l'utilisation par voie orale d'un vaccin préparé par culture de la souche B10 en

bouillon Trypticase-Soja (BTS), à raison de 2 à 4 10^9 corps bactériens par jour pendant 10 jours à partir du sevrage (Camguilhem et Milon 1990). Une protection totale contre les signes cliniques a été obtenue (tableau 3) et les animaux vaccinés ont conservé une croissance excellente (gain de poids moyen quotidien de 40 g.) durant toute l'épreuve virulente. En outre, les animaux recevant ce régime vaccinal ont éliminé rapidement la souche d'épreuve, qui n'était plus retrouvée dans les fèces dès le 13^e jour après infection (tableau 3). Ce protocole s'avérait alors bien meilleur que son équivalent utilisant un vaccin préparé par culture de la souche sur gélose Minca. Rétrospectivement, cette différence d'efficacité peut être mise sur le compte de l'expression de l'adhésine dans le vaccin : le milieu BTS permet une faible expression, alors que celle-ci n'est pas exprimée en gélose Minca.

Nous avons alors tenté de diminuer la durée d'administration de ce vaccin, 10 jours nous semblant incompatible avec les contraintes d'élevage. Au cours de deux autres expérimentations, un vaccin préparé par culture en BTS a été administré pendant 6 jours ou 4 jours, donnant dans chaque cas des protections incomplètes et laissant persister la souche d'épreuve jusqu'à l'abattage des animaux survivants à des poids commerciaux (tableau 3). Le but a été cependant atteint en modifiant le milieu de culture de la souche vaccinale : les études sur l'adhésine des souches O103 nous ayant montré que celle-ci était fortement exprimée en bouillon Penassay, ce milieu de culture a été utilisé dans la préparation des vaccins. Avec une telle préparation, une protection totale a été obtenue après quatre jours d'administration seulement, et la souche d'épreuve n'était plus retrouvée dans les fèces 13 jours après l'infection (Milon *et al* 1989) (tableau 3).

b / Nécessité d'un rappel

Le protocole de 4 jours utilisant le vaccin préparé en bouillon Penassay a été testé sur le terrain dans un élevage industriel présentant des problèmes répétés de colibacillose O103 (Camguilhem *et al* 1990). Une bande de 728 lapereaux a été divisée en deux lots dont un a reçu le vaccin dans l'eau de boisson (5 10^7 bactéries par ml) pendant les quatre premiers jours après le sevrage. Les résultats obtenus ont montré une protection correcte des animaux pendant les 4 premières semaines d'engraissement (1,1 % de mortalité par diarrhée chez les vaccinés contre 5,5 % chez les témoins), mais la reprise des diarrhées colibacillaires par la suite (à la sixième semaine, 9,7 % de mortalité par diarrhée chez les témoins et 6,6 % chez les vaccinés). A l'évidence, le vaccin oral administré au sevrage ne protège pas pendant toute la vie économique des animaux, dans des situations où des réinfections successives par les colibacilles O103 sont possibles. Nous avons donc essayé de vérifier l'efficacité du protocole dans une situation expérimentale de pression d'infection forte et permanente, obtenue en élevant dans les mêmes cages, au contact les uns des autres, des animaux vaccinés et témoins tous éprouvés par la souche B10 (Camguilhem *et al* 1990). Dans cette situation, les animaux

Un vaccin inactivé administré par voie orale pendant 4 jours à partir du sevrage protège les animaux. Dans les élevages très infectés, un rappel de vaccination peut s'avérer nécessaire.

Tableau 3. Principaux résultats obtenus expérimentalement dans des protocoles de vaccination par voie orale utilisant des vaccins à souche B10 inactivée par le formol, administrés à la dose de 2.10^9 bactéries pendant plusieurs jours aux lapereaux dès le sevrage, ou aux mères pendant la gestation avec rappel durant la lactation. Les lapereaux sevrés sont ensuite éprouvés par administration orale de 2.10^4 E. Coli B10 vivants, 5 jours après la fin de la vaccination.

Animaux vaccinés	Protocole (milieu de culture de la souche vaccinale, nombre de jours d'administration)	Nbre d'anx du lot	Résultats de la vaccination (en % de protection contre les signes cliniques ci-dessous, après infection expérimentale des lapereaux*)			Persistance des colibacilles O103 (taux fécaux ou cœcaux de colibacilles, % de souches O103)	
			Pertes de poids	Diarrhées	Mortalité	12-14 jours après infection	26-30 jours après infection
Jeunes ¹	Bouillon Trypticase Soja (BTS), 10 jours	8	100	100	100	$1,3.10^4$ (0 %)	$8,5.10^2$ (0 %)
Jeunes ¹	Gélose Minca, 10 jours	8	60	67	50	$5,4.10^5$ (75 %)	$1,2.10^3$ (0 %)
Mères ²	BTS, 4 jours, 2 fois (gest. + lact.)	17	0	3	0	NT**	$1,4.10^5$ (87,5 %)
Jeunes ²	BTS, 4 jours	16	76	72	62	NT	$1,8.10^2$ (22,2 %)
Mères et jeunes ²	BTS, 4 jours, 2 fois (mères) 4 jours (jeunes)	18	36	25	34	NT	$2,3.10^3$ (65,4 %)
Jeunes ²	BTS, 6 jours	16	82	82	60	8.10^4 (25 %)	$1,5.10^2$ (20,8 %)
Jeunes ²	B. Penassay, 4 jours	16	100	100	100	2.10^3 (0 %)	$2,4.10^1$ (0 %)

* : % protection = $\{1 - (\% \text{ signe clinique dans lot vacciné} / \% \text{ signe clinique dans lot témoin non vacciné})\} \times 100$. ** : non testé.

¹: Camguilhem et Milon 1990 ; ²: Milon *et al* 1989.

La vaccination des mères est inefficace pour protéger les jeunes après le sevrage, quel que soit le mode d'administration du vaccin.

témoins, malades ou non, restent excréteurs du colibacille jusqu'à leur mort, et servent de source de réinfection permanente pour les animaux vaccinés de la même cage. Tous les animaux étant infectés expérimentalement le même jour, cette situation est encore plus « drastique » que celle que l'on est susceptible de rencontrer sur le terrain, où l'infection n'est pas systématique, mais se produit à l'origine probablement chez quelques lapereaux à partir de mères porteuses du germe ou à partir de l'environnement avant de s'étendre par transmission directe à partir des malades. Les résultats obtenus globalement montrent l'intérêt d'un rappel de vaccination de 3 jours, débutant 3 semaines après le premier vaccin au sevrage (tableau 4). Cependant, une protection totale n'a pu être obtenue, deux des animaux vaccinés avec rappel montrant une perte de poids avec diarrhée sans mortalité. En outre, les animaux des deux lots vaccinés ont été trouvés excréteurs de la souche d'épreuve jusqu'à l'abattage.

En conclusion, dans l'état actuel des résultats, une vaccination au sevrage par une souche inactivée administrée *per os* est inoffensive et probablement utile pour rompre le cycle épidémiologique de l'infection en élevage, comme pour protéger les animaux pendant la période d'engraissement. Dans les élevages fortement infectés, il est sans doute souhaitable d'utiliser un protocole de vaccination comprenant un rappel de quelques jours trois semaines après l'entrée en engraissement. Des progrès restent à

faire quant à la forme finale du vaccin et son mode d'administration, qui doivent être les moins contraignants possibles.

3.4 / Inefficacité de la vaccination des mères

Deux expérimentations distinctes nous ont confirmé l'inefficacité de la vaccination des mères dans le cadre de la colibacillose à *E.coli* O103 (Milon et Camguilhem 1989, Milon *et al* 1989). Dans les deux cas, malgré une bonne réponse des femelles à la vaccination (anticorps sériques et fécaux de classe IgA) et une bonne transmission des anticorps dans le lait, aucune protection n'a été obtenue, chez les jeunes sevrés, vis-à-vis de l'infection d'épreuve. Plus encore, la vaccination maternelle diminue l'efficacité d'une vaccination ultérieure des jeunes (tableau 3), peut être par l'effet résiduel des anticorps transmis par la mère, qui pourraient inhiber la stimulation antigénique par le vaccin chez le jeune. Ces résultats démontrent qu'à la différence des colibacilloses néonatales à ETEC rencontrées chez le porcelet ou le veau, la vaccination maternelle et le transfert d'immunité passive qui en découle ne peut permettre de protéger les lapereaux - tout au moins contre la forme clinique la plus fréquente de l'infection : celle qui se manifeste après le sevrage.

3.5 / Vaccination par souches vivantes ?

Une des manières de résoudre le problème posé sur le terrain par la nécessité d'une admi-

nistration répétée du vaccin oral à souche inactivée serait d'utiliser une souche vaccinale vivante, capable de persister dans le tube digestif des animaux et d'y assurer une stimulation immunitaire permanente. Dans ce cas, une seule administration au sevrage serait suffisante pour protéger les animaux durant toute leur vie économique. Nous avons abordé cette hypothèse en utilisant des souches sauvages non pathogènes possédant des caractéristiques qui nous permettraient de penser qu'elles étaient de bonnes candidates [Milon *et al* 1990a]. Deux souches ont ainsi été sélectionnées : les souches C127 et C6, toutes deux isolées de lapins [Milon *et al* 1990b]. La souche C127 (O103, rhamnose positive, non pathogène) possède le même LPS, mais présente des propriétés d'adhésion différentes de celles des souches O103 pathogènes et ne produit pas l'adhésine de 32 kDa. La souche C6 (O128, rhamnose positive, non pathogène) produit la même adhésine que les souches O103 pathogènes, mais a un LPS différent, sans antigénicité croisée avec le LPS O103. Ces deux souches, administrées en une seule fois au sevrage, colonisent le tube digestif des lapereaux. Elles provoquent de très bonnes réponses locales en IgA anti-LPS. La souche C127 a apporté une protection significative mais non totale contre une épreuve virulente par la souche B10 [Milon *et al* 1990a]. Par contre, la souche C6 a très fortement colonisé (environ 10⁶ bactéries/g de fèces), et a produit un effet de barrière écologique drastique sur la souche d'épreuve, qui a été très rapidement éliminée. La protection a été totale, mais l'administration de C6 a provoqué quelques retards de croissance passagers. Ces résultats nous incitent à poursuivre dans cette voie, en tentant de « mettre au point » une souche vaccinale d'innocuité parfaite et possédant l'adhésine des colibacilles O103 pathogènes.

Conclusions et perspectives

Les progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance des souches d'*Escherichia coli* responsables d'entérites chez le lapin à l'engrais ont permis une véritable avancée dans le cadre du diagnostic et des programmes de prophylaxie envisageables pour prévenir la maladie. La vaccination se présente, dans ce

domaine, comme une possibilité majeure. Les protocoles de vaccination maternelle ne sont pas efficaces, pas plus que la vaccination des jeunes par voie parentérale. Seule, la vaccination des lapereaux sevrés par voie orale, permettant la stimulation des défenses immunitaires locales, présente un intérêt indéniable. A ce titre, la colibacillose du lapin représente un modèle intéressant en pathologie comparée, et les résultats obtenus pourraient éventuellement servir dans le cadre d'autres infections bactériennes, médicales ou vétérinaires, dans lesquelles les possibilités de vaccination par voie locale ont été peu explorées. Ce type de protocole peut utiliser des vaccins à souches inactivées par le formol, parfaitement inoffensifs, mais qui présentent l'inconvénient de nécessiter une administration répétée aux lapereaux juste après sevrage, voire même un rappel en cours d'engraissement, lorsque l'élevage est sévèrement infecté. Un mode d'administration peu contraignant pour l'éleveur (dans l'eau de boisson ou l'aliment) doit faire l'objet d'études. La découverte de l'adhésine responsable de l'attachement des colibacilles O103 à la muqueuse intestinale du lapin a permis d'améliorer l'efficacité des vaccins et leur facilité d'administration, comme elle permettra - à moyen terme - d'envisager l'utilisation de souches vaccinales atténuées administrables en une seule fois au sevrage et capables de protéger les animaux pendant toute leur durée de vie économique. De telles souches doivent néanmoins faire la preuve de leur parfaite innocuité, et, compte tenu des risques de recombinaisons génétiques *in vivo* avec des souches sauvages pathogènes, nécessitent une étude plus poussée des supports génétiques des facteurs de pathogénicité propres à ces dernières. Certains aspects de la pathogénicité des souches O103 n'ont encore reçu que peu d'attention ; c'est le cas par exemple de leur production éventuelle de toxines, de leur caractère invasif ou non de la muqueuse... Des travaux fondamentaux supplémentaires sont donc nécessaires, qui déboucheront forcément sur des applications vaccinales toujours plus élaborées.

Remerciements

Les travaux présentés ci-dessus ont reçu le soutien de l'INRA. Merci à F. Lebas, H. De Rochambeau, F. Tudela (INRA, centre de Toulouse-Auzeville) pour leur aide.

Tableau 4. Morbidité et mortalités enregistrées chez des lapereaux élevés en situation de réinfections permanentes et soumis à une vaccination simple (4 j. au sevrage) ou avec rappel (4 j. au sevrage + 3 j., 3 semaines plus tard) avec le vaccin inactivé préparé en bouillon Penassay. Entre parenthèses : % de protection.

Lot	A (vaccin simple)	B (vaccin + rappel)	C (témoins)
Nombre d'animaux	14	14	24
Nombre de pertes de poids	4 (54)	2 (77)	15
Nombre de cas de diarrhées	3 (66)	2 (77)	15
Mortalités	2 (71)	0 (100)	12

Références bibliographiques

- CAMGUILHEM R., 1985. Isolement d'une souche d'*Escherichia coli* (séro-groupe O103) responsable d'entérite colibacillaire du lapin en engraissement. Mise en évidence de son pouvoir pathogène. *Revue Méd. Vét.*, 136, 61-68.
- CAMGUILHEM R., 1986. Essai de vaccination des lapins par voie intradermique contre l'entérite colibacillaire à *E. coli* O103. C.R. 4èmes Journées de la Recherche Cunicole INRA-ITAVI, Comm. n°35.
- CAMGUILHEM R. et MILON A., 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits : clues to diagnosis of pathogenic strains. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 743-747.
- CAMGUILHEM R. et MILON A., 1990. Protection of weaned rabbits against experimental *E. coli* O103 intestinal infection by oral formalin-killed vaccine. *Vet. Microbiol.*, 21, 353-362.
- CAMGUILHEM R. et TOURNUT J. 1986. Traitement d'une entérite colibacillaire expérimentale du lapin sevré par la fluméquine. C.R. 4èmes Journées de la Recherche Cunicole INRA-ITAVI, Comm. n° 36.
- CAMGUILHEM R., LEBAS F. et LABIE C., 1986. Reproduction expérimentale chez le lapin en engraissement d'une diarrhée provoquée par une souche d'*Escherichia coli* de séro-groupe O103. *Ann. Rech. Vét.*, 17, 409-424.
- CAMGUILHEM R., MILON A., ESSLINGER J., GREGORY J.N., MAIRE C. et CHMITTELIN F. 1990. Vaccination contre la colibacillose O103 : vaccin inactivé utilisé par voie orale en situation d'infection permanente. C.R. 5èmes Journées de la Recherche Cunicole INRA-ITAVI, Décembre 1990, Comm. n° 19.
- CANTEY J.R. et BLAKE P.K. 1977. Diarrhea due to *E. coli* in the rabbit. A novel mechanism. *J. Infect. Dis.* 135, 454-462.
- CHENEY C.P. et BOEDECKER E.C., 1984. Rabbit mucosal receptors for enteropathogenic *Escherichia coli* strains : appearance of bacterial receptor activity at weaning. *Gastroenterology*, 87, 821-826.
- CHENEY C.P., FORMAL P.A., SCHAD P.A., et BOEDECKER E.C., 1983. Genetic transfer of a mucosal adherence factor (R1) from an enteropathogenic *Escherichia coli* strain into a *Shigella flexneri* strain and the phenotypic suppression of this adherence factor. *J. Infect. Dis.* 147, 711-723.
- ESSLINGER J., MILON A. et CAMGUILHEM R., 1989. Adhésion aux entérocytes et pathogénicité des *Escherichia coli* responsables d'entérites chez le lapin sevré. *Revue Méd. Vét.*, 140, 829-834.
- LEBAS F. et CAMGUILHEM R., 1986. Infection expérimentale de lapereaux en engraissement avec une souche d'*Escherichia coli* de séro-groupe O103 : effet de la teneur en cellulose de l'aliment et de l'addition d'acide acétique dans l'eau de boisson. C.R. 4èmes Journées de la Recherche Cunicole INRA-ITAVI, Comm. n° 34.
- LEVINE M.M., 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.*, 155, 377-389.
- LICOIS D., COUDERT P., GUILLOT J.P. et RENAULT L., 1982. Diarrhée expérimentale du lapin : étude de la pathologie due à des coccidioses intestinales (*E. intestinalis*) et à des *Escherichia coli*. C.R. 4èmes Journées de la Recherche Cunicole INRA-ITAVI, Comm. n° 27.
- MESTECKY J., 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.*, 7, 265-274.
- MILON A. et CAMGUILHEM R. 1989. Essais de protection des lapereaux sevrés contre l'entérite à *Escherichia coli* O103 : vaccination des mères avec un vaccin inactivé. *Revue Méd. Vét.*, 140, 389-395.
- MILON A., ESSLINGER J. et CAMGUILHEM R. 1989. Vaccination du lapin sevré contre la colibacillose à *E. coli* O103. Nouveaux résultats. *Revue Méd. Vét.*, 140, 835-839.
- MILON A., CAMGUILHEM R. et ESSLINGER J., 1990a. Vaccination du lapereau contre la colibacillose O103 : rôles de l'immunité anti-LPS et de l'effet de barrière exercé par des souches vivantes non pathogènes. C.R. 5èmes Journées de la Recherche Cunicole INRA-ITAVI, Décembre 1990, Comm. n° 18.
- MILON A., ESSLINGER J. et CAMGUILHEM R. 1990b. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. *Infect. Immun.* 58, 2690-2695.
- OKERMAN L. et DEVRIESE L.A., 1985. Biotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 955-958.
- PEETERS J.E., GEEROMS R. et GLORIEUX B., 1984. Experimental *Escherichia coli* enteropathy in weaning rabbits : clinical manifestations and pathological findings. *J. Comp. Pathol.*, 94, 521-528.
- PEETERS J.E., GEEROMS R. et ORSKOV F., 1988. Biotype, serotype and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect. Immun.*, 56, 1442-1448.
- PEETERS J.E., GEEROMS R., VROONEN C. et SCHOETENS F., 1990. Treatment and eradication of enteropathogenic *E. coli* in commercial rabbits : laboratory and field trials. C.R. Colloque « Actualité de l'élevage du lapin », Bologne, 4/6/90.
- PERI B.A., et ROTHBERG R.M., 1986. Transmission of maternal antibody prenatally and from milk into serum of neonatal rabbit. *Immunology*, 57, 49-53.
- RENAULT L., ROUX J., LE BOURHIS E., COUDERT P., LICOIS D. et GUILLOT F., 1983. Description d'un séro-groupe (O103) d'*Escherichia coli* entéropathogène chez le lapin au sevrage. *Bull. Acad. Vét.*, 56, 387-400.
- TAKEUCHI A., INMAN L.R., O'HANLEY P.D., CANTEY J.R. et LUSHBAUGH W.B., 1978. Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. *Infect. Immun.*, 19, 686-694.

Summary

E. Coli O103 enteritis in weaned rabbits. Vaccination trials.

Digestive colibacillosis in weaned rabbit is an epizootic enteritic syndrome, with mortality rates up to 30 %, which occurs frequently in French industrial rabbit-fattening farms. It is associated with the colonization of the distal ileum and caecum by *Escherichia coli* strains belonging, in France, mostly to the O103 serogroup and to rhamnose negative biovars. A new proteic adhesin of m.w. 32,000, which allows this colonization, has been recently described in these strains.

Antibiotics are ineffective in controlling the disease. On the contrary, oral vaccination,

which stimulates local immunity at the digestive level, is efficient in the prevention of the illness. In our hands, a formalin-killed vaccine, prepared from a culture of an O103 strain in a medium which favours the expression of the adhesin and given per os in a 4-days schedule to young rabbits at weaning, completely protects the animals against a virulent challenge and allows a quick elimination of the challenge O103 strain from their digestive tract. This original prophylactic method will improve as information on the infection and the causal bacterial strains is documented.

CAMGUILHEM R., MILON A., 1991. Entérite du lapin à *Escherichia coli* O103. Essais de prévention. *INRA Prod. Anim.*, 4 (2), 131-140.