

Vers une amélioration de la résistance du lapin à la pasteurellose

E. HELLOIN¹, H. GARREAU², C. SLUGOCKI¹, M. HILGENBERG¹,
C. LE BEUX¹, D. LICOIS³, S. BOUCHER⁴, B. LE NORMAND⁵, H. MORIN⁶,
L.M. BAUMIER⁷, F. COISNE⁸, E. FOURNIER⁹, C. MORENO², F. LANTIER³

¹INRA, CIRM-Bactéries Pathogènes, IASP, Centre de Tours, 37380 Nouzilly, France

²INRA, UR631 SAGA, Chemin de Borde Rouge, 31326 CASTANET TOLOSAN, France

³INRA, IASP, Centre de Tours, 37380 Nouzilly, France

⁴Labovet Conseil (réseau Cristal), BP539, 85505 Les Herbiers cedex, France

⁵SCP Fouque-Gounot-Le Normand-Le Page 47 Bd Leclerc, 35460 St Brice En Cogles, France

⁶Filavie S.A.S., Rue du Moulin de la Rousselière, 44821 Saint Herblain Cedex, France

⁷Grimaud Frères Sélection, La Corbière 49450 Roussay, France

⁸Sarl Hycole, Route De Villers Plouich, Bp 15, 59159 Marcoing, France

⁹Eurolap, Le Germillan Bp 2, 35140 Gosné, France

Résumé : L'évaluation de la résistance génétique du Lapin à l'infection par les pasteurelles doit tenir compte de la multiplicité et de la diversité des souches de *Pasteurella* sévissant dans les populations. La sélection génétique n'est efficace que si la résistance à l'ensemble des souches est contrôlée, au moins partiellement, par les mêmes gènes. Une collection d'environ 200 souches de *Pasteurella* a donc été constituée à partir des isolements effectués depuis 2003 dans les élevages. Ces souches sont en cours de caractérisation et leur diversité génétique est évaluée à l'aide de nouveaux marqueurs génétiques (VNTR : Multi-Locus Variable-Number Tandem Repeat) mis au point dans le cadre de notre projet. La virulence de souches modèle sera comparée *in vivo*. Les données obtenues permettront de définir un modèle d'infection qui sera utilisé pour caractériser une population expérimentale de lapins. Ces mesures des paramètres génétiques du caractère « résistance à l'infection par *Pasteurella* » et du polymorphisme de la population permettront d'étudier la possibilité du contrôle de la pasteurellose dans les élevages cynicoles par le biais d'une sélection génétique.

Abstract: Toward an improvement of the rabbit genetic resistance to pasteurellosis. The evaluation of the genetic resistance of the Rabbit to pasteurellosis, taking into account the multiplicity and diversity of *Pasteurella* strains that can be isolated in breeding units, is described as a new tool for the control of this disease. To be efficient a genomic selection has to target a common pool of genes that control susceptibility/resistance to the various *Pasteurella* isolates. A collection of about 200 strains has been established from isolates sampled in rabbit flocks since 2003. These strains are characterized and their genetic diversity is evaluated through polymorphic VNTR that have been specifically designed from the *Pasteurella* genomic sequence. Virulence of representative *Pasteurella* strains will be evaluated *in vivo*. Data will be used to define an infection model allowing the measure at individual level of susceptibility to infection in a selected rabbit population. Genetic parameters of the criteria "susceptibility to *Pasteurella* infection" and polymorphism of genetic markers (SNPs) associated to resistance will allow an evaluation of the potential of genetic selection for resistance to infection as a tool for controlling pasteurellosis in rabbit breeding units.

Introduction

La pasteurellose est l'une des maladies les plus fréquentes chez le lapin qu'il soit de chair, fermier, de laboratoire ou de compagnie (Boucher et Nouaille, 2002 ; Coudert, 2004). Elle entraîne des pertes économiques (mortalité, dépression de croissance, baisse de fertilité et réforme des femelles) qui grèvent lourdement le revenu des éleveurs. Les traitements antibiotiques sont décevants car les rechutes sont fréquentes et les vaccinations (stocks vaccins ou autovaccins) n'apportent pas une réponse favorable systématique et ce d'autant plus que la seule valence pasteurellique a été prise en compte dans le traitement (la présence d'autres agents pathogènes comme les mycoplasmes, les bordetelles ou la régulation des paramètres d'ambiance non pris en compte sont des causes d'échec thérapeutique) (Boucher *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'utilisation de traitements antibiotiques

systématiques est de plus en plus mal acceptée par le consommateur. Répondant à la demande des principaux acteurs de la profession (Interprofession, syndicats des sélectionneurs, fédération des éleveurs) l'INRA projette de reproduire expérimentalement la pasteurellose pour étudier le déterminisme génétique de la résistance de l'hôte. Ce projet repose sur une collaboration entre les unités de recherche INRA SAGA et IASP, le Centre INRA de Ressources Biologiques CIRM-BP, et les principaux cabinets et laboratoires vétérinaires français spécialisés en lapin.

1. Mise en place d'un modèle d'infection expérimentale permettant de reproduire la maladie

La première étape de ce travail a pour objectif d'améliorer notre connaissance des souches pathogènes isolées dans les élevages et de leur diversité génétique.

1.1 Création d'une collection de souches de *Pasteurella multocida*

Il s'agit de réaliser l'inventaire et la description des souches de pasteurelles isolées entre 2003 et 2007, dans des élevages à pasteurellose et identifiées par les laboratoires LABOVET ANALYSES, FILAVIE et le cabinet vétérinaire SCP Fouque-Gounot-Le Normand-Le Page (Figure 1, Tableau 1). Leur conservation et leur caractérisation sont assurées par le Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux bactéries pathogènes d'origine animale et humaine (CIRM-BP) sous forme de dépôt confidentiel sécurisé (INRA, Tours).

Figure 1. Origine géographique et effectif des 132 isolats prélevés dans les élevages de production



Les souches sont identifiées et caractérisées sur la base de critères phénotypiques et moléculaires. Il s'agit de Bacilles à gram négatif microaérophiles et immobiles présentant les caractères bactériologiques classiques définissant l'espèce *Pasteurella multocida*. L'utilisation différentielle de certains sucres (sorbitol, dulcitol) permet de distinguer les sous-espèces *multocida*, *septica* et *gallicida*. Les tests moléculaires pratiqués correspondent à des réactions de PCR spécifiques de l'espèce *P. multocida* (Townsend *et al.*, 1998), des différents types capsulaires (Townsend *et al.*, 2001) et de la présence du gène codant pour la toxine A dermonécrotique (Register & DeJong, 2006) liée au syndrome de rhinite atrophique (DiGiacomo *et al.*, 1993). La majorité des isolats caractérisés (73%) appartiennent à la sous-espèce *P. multocida septica* et possèdent un type capsulaire A ou F tandis que la plupart des isolats restants appartiennent à la sous-espèce *P. multocida multocida* et sont de type capsulaire A. Les isolats de type capsulaire D sont beaucoup plus rares (< 1%) et appartiennent aux deux sous-espèces *multocida* et *septica*. Ces résultats sont en accord avec les observations de Jaglic *et al.* (2004)

montrant une corrélation claire entre la pathologie et le type capsulaire et une prédominance des sérotypes A, D et F chez le lapin. Aucune des souches caractérisées jusqu'à présent ne possède le gène codant pour la toxine A ce qui corrobore le faible nombre d'isolats de type capsulaire D dans l'échantillon de souches analysé. En effet, la toxine dermonécrotique est essentiellement produite par les souches de sérotype capsulaire D (Kpodékon *et al.*, 1999).

Ce travail a abouti à la constitution d'une collection de souches large et représentative des isolats associés aux maladies observées dans les élevages français de sélection, de multiplication et de production du lapin de chair.

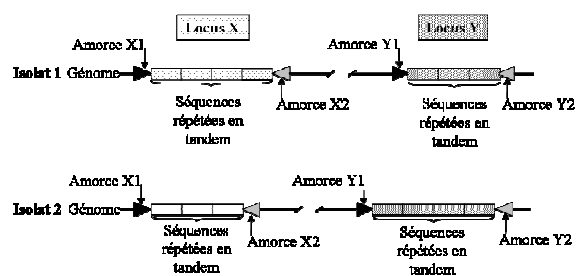
Tableau 1. Répartition des isolats de la collection selon l'étage de production.

Etage	Fréquence
Sélection	15
Multiplication	31
Production	133
Total	179

1.2 Caractérisation génétique des souches de la collection

Une méthode de typage moléculaire par MLVA (Multi-Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis) est en cours de développement. Cette technique repose sur l'analyse de séquences répétées de taille variables situées dans des régions intra ou intergénomiques du génome de *P. multocida* (Figure 2).

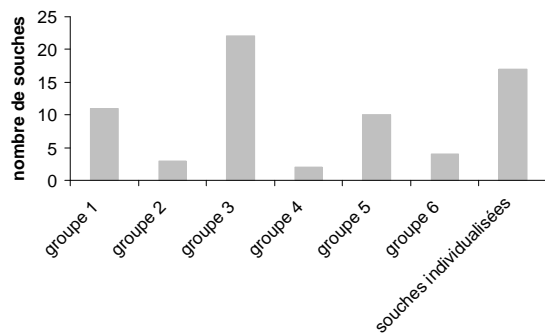
Figure 2. Principe de la technique de typage moléculaire MLVA.



Dans un premier temps, 10 séquences répétées en tandem ont été sélectionnées *in silico* d'après la séquence complète du génome de *P. multocida* PM70 (May *et al.*, 2001). Le polymorphisme de taille de ces TR a ensuite été testé sur un panel de 21 souches sélectionnées dans la collection de façon à limiter l'éventualité de lien épidémiologique entre ces souches. Ce polymorphisme des VNTR a ensuite été confirmé par électrophorèse capillaire sur un plus grand nombre de souches (69). Les résultats obtenus montrent que 6 des 10 TR sont polymorphes et permettent de séparer les souches analysées en 17 souches individualisées et 6 groupes contenant de 2 à

22 souches (Figure 3). La discrimination des souches du groupe majoritaire rassemblant 32% des souches analysées est susceptible d'être affinée et d'autres VNTR seront recherchés dans ce but. L'analyse des VNTR sera alors poursuivie sur l'ensemble des isolats disponibles.

Figure 3. Fréquence de répartition des 69 souches analysées à l'aide des 6 VNTR retenus.



Les résultats obtenus seront confrontés aux résultats de l'analyse phénotypique et aux données associées aux souches (date, origine géographique et organe d'isolement, étage de production des lapins hôtes) de façon à regrouper les isolats en groupes de souches représentatifs de l'ensemble de la collection.

L'objectif de ce travail est d'aboutir à la définition d'un petit nombre de souches représentatives de la diversité génétique observée sur le terrain et qui permettent de reproduire la maladie et/ou le portage afin de définir un modèle d'infection chez le lapin.

1.3 Test de virulence des souches

Différentes voies et doses d'inoculation feront l'objet de tests sur une à deux souches afin de définir les conditions d'infection les plus pertinentes, en privilégiant les voies naturelles orales et intranasales. La virulence sera appréciée par la morbidité/létalité et le nombre de bactéries dans les tissus cibles. Ces conditions expérimentales seront utilisées pour comparer la sensibilité d'animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et d'animaux conventionnels.

Une fois défini et validé, le modèle d'infection retenu sera appliqué à une comparaison de la virulence d'un panel de souches de *Pasteurella* sélectionné en tenant compte de leurs caractéristiques biologiques et génétiques telles qu'elles ont été décrites ci-dessus. Une souche, ou un petit nombre de souches représentatives seront retenues pour l'étude de la résistance de l'hôte à l'infection.

Si les résultats obtenus permettent d'évaluer la sensibilité/résistance de chaque individu à ce type de pathogènes, les critères retenus (morbidité, létalité et/ou colonisation bactérienne) pourront être appliqués à une population de référence de taille conséquente. Cette population sera également caractérisée au plan génétique grâce aux outils moléculaires maintenant disponibles chez le lapin.

2. Perspectives pour l'étude de la résistance à la pasteurellose

Les données et les outils de la génomique pour le lapin ont largement progressé au cours des cinq dernières années. Le lapin bénéficie maintenant d'une carte génétique (marqueurs microsatellites anonymes et polymorphismes associés aux gènes), de plusieurs banques de grands fragments d'ADN génomiques (BAC, Bacterial Artificial Chromosome) permettant de localiser précisément un marqueur sur le génome de cette espèce, et d'une carte cytogénétique (Chantry-Darmon *et al.*, 2006). Dans le cadre du *Mammalian Genome project*, un programme de séquençage complet du génome du lapin sera achevé en 2009 par le Broad Institute (Boston, USA) en collaboration avec des laboratoires de l'INRA et d'autres laboratoires européens (Rogel-Gaillard *et al.*, 2008) et donnera au lapin le statut de nouvelle espèce séquencée. De nouvelles ressources génomiques seront alors produites : des banques d'ADNc de pleine longueur permettront l'expression de protéines et la production d'anticorps. L'ADN issu de lapins de 12 races et de deux lapins sauvages sera également entièrement séquencé afin d'identifier des polymorphismes nucléotidiques et de produire des marqueurs SNP. Les marqueurs SNP (pour « Single Nucleotide Polymorphism » ou variation d'une paire de bases du génome) sont présents en très grande quantité sur le génome (plusieurs millions) et autorisent les méthodes de génotypage à haut débit (puces avec génotypage de plusieurs milliers de SNP simultanément). L'information apportée par ces nouveaux outils ouvre la voie à de nouvelles méthodes de sélection (sélection assistée par marqueur, sélection génomique) qui se révèlent particulièrement intéressantes pour l'amélioration génétique des caractères de résistance aux maladies. Dans un premier temps, la recherche des QTL et la prédiction des effets des marqueurs SNP de résistance à la maladie seront réalisées sur une population expérimentale inoculée à l'aide du modèle d'infection en cours de production. La mise en œuvre de la sélection dans les populations commerciales pourra se faire sur la base de ces résultats expérimentaux, à partir de la valeur estimée des effets des marqueurs et après avoir génotypé les animaux candidats à la sélection. Elle sera toutefois conditionnée par l'importance de l'effet des marqueurs et par le coût du génotypage des animaux.

Conclusion

Compte tenu de l'importance de la pasteurellose en cuniculture, la mise en place d'un protocole d'étude de la résistance génétique à l'infection par *Pasteurella* revêt une importance majeure : il doit permettre de mieux appréhender les possibilités et les modalités de contrôle de cette maladie. Si les paramètres génétiques des critères de résistance retenus et le polymorphisme des populations de lapins le permettent, l'utilisation de lignées sélectionnées pour

la résistance aux *Pasteurella* pourra être envisagée dans les élevages.

Remerciements

Nous remercions Isabelle Lantier pour sa disponibilité et son aide à la mise en place des analyses en électrophorèse capillaire. Ce projet a reçu le soutien financier de l'association interprofessionnelle avicole et cunicole AGENAVI et du CLIPP.

Références

- BOUCHER S., NOUAILLE L., 2002. Le syndrome respiratoire : un exemple de l'approche actuelle des maladies. In *Manuel pratique des Maladies des lapins*. France Agricole, 2^e éd., 38 – 41
- BOUCHER S., NOUAILLE L., ALBIZU I., BASELGA R., 2003. Autovaccines against mycoplasmas in farm rabbits. *World Rabbit Sci.* 2003, 11: 109 - 204
- CHANTRY-DARMON C., URIEN C., DE ROCHAMBEAU H., ALLAIN D., PENNA B., HAYES H., GROHS C., CRIBIU E.P., DERETZ-PICOULET S., LARZUL C., SAVE J.C., NEAU A., CHARDON P., ROGEL-GAILLARD C., 2006. A first-generation microsatellite-based integrated genetic and cytogenetic map for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and localization of *angora* and *albino*. *Animal Genetics* 37, 335–341
- COUDERT P., 2004. Pasteurelloses du lapin. *Cuniculture*, 31, 49-51
- DIGIACOMO R.F., DEEB B.J., BRODIE S.J., ZIMMERMAN T.E., VELTKAMP E.R., CHRISP C.E., 1993. Toxin production by *Pasteurella multocida* isolated from rabbits with atrophic rhinitis. *Am J Vet Res* 54: 1280-1286
- JAGLIC Z., KUCEROVA Z., NEDBALCOVA K., HLOZEK P., BARTOS M., 2004. Identification of *Pasteurella multocida* Serogroup F isolates in rabbits. *Journal of veterinary medicine* 51: 467-469
- KPODEKON M., RIDEAUD P., COUDERT P., 1999. Pasteurelloses du lapin : revue. *Rev Med Vet* 150: 221-232
- MAY B.J., ZHANG Q., LI L.L., PAUSTIAN M.L., WHITTAM T.S., KAPUR V., 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3460-3465
- REGISTER K.B., DEJONG K.D. 2006. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet Microbiol* 117: 201-210.
- ROGEL-GAILLARD C., CHANTRY-DARMON C., HAYES H., 2008. Les données récentes sur le génome du lapin. *Biofutur*, 287, 28-31
- TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J., ADLER B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39: 924-929
- TOWNSEND K.M., FROST A.J., LEE C.W., PAPADIMITRIOU J.M., DAWKINS H.J.S., 1998. Development of PCR Assays for Species- and Type-Specific Identification of *Pasteurella multocida* Isolates. *J Clin Microbiol* 36: 1096-1100