

Vers une amélioration de la résistance du lapin à la pasteurellose

E. HELLOIN¹, I. LANTIER³, C. SLUGOCKI¹, E. CHAMBELLON¹, H. LE ROUX³, P. BERTHON³, F. KEMPF¹, C. ROSSIGNOL³, S. BOUCHER⁴, B. LE NORMAND⁵, H. MORIN⁶, L.M. BAUMIER⁷, F. COISNE⁸, E. FOURNIER⁹, M. GUNIA², C. MORENO², H. GARREAU², F. LANTIER³

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

²INRA, UR631 GENPHYS, Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France

³INRA, EIA, ISP, 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

⁷Hypharm, La Corbière, F-49450 Roussay France

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

Résumé – L'évaluation de la résistance génétique du Lapin à la pasteurellose doit tenir compte de la diversité des souches de *Pasteurella* sévissant dans les populations. Une collection de 200 souches de *Pasteurella* a été constituée à partir d'isolements effectués dans des élevages français. Les souches ont été caractérisées et leur diversité génétique évaluée grâce au développement d'une technique MLVA (Multi-Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis) validée par une technique publiée (MLST, Multi Locus Sequence Type), moins discriminante. La virulence chez le lapin, de 5 souches représentatives de chacun des groupes génétiques les plus fréquents, a été mesurée *in vivo* après infection intra-nasale ou sous-cutanée. Cette dernière voie a été retenue pour tester les virulences de 20 souches représentatives de la collection. Une grande variabilité de leurs virulences a été observée ainsi qu'une variabilité individuelle des lapins quant à leur capacité à contrôler l'infection.

Abstract – Toward an improvement of rabbit genetic resistance to pasteurellosis. The evaluation of the Rabbit genetic resistance to pasteurellosis should take into account the diversity of *Pasteurella* isolates. A collection of 200 strains has been established from isolates sampled in French flocks. These strains were characterized and their genetic diversity evaluated through the development of a MLVA technique (Multi-Locus Variable-number-tandem-repeat analysis), and validated with the already published but less discriminating MLST (Multi Locus Sequence Type). Virulence in Rabbit of 5 strains selected as representatives of the main genetic groups of *Pasteurella* was evaluated *in vivo* after intra-nasal or subcutaneous inoculation. The subcutaneous infection route was chosen to compare 20 representative strains from the collection and evidenced their virulence variability, as well as an individual variability in the rabbit's ability to control the infection.

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 ; Kpodekon et al, 1999 ; 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 GENPHYS (Toulouse) et ISP, le Centre International de Ressources Microbiennes CIRM-BP, la Plate-forme d'infectiologie expérimentale (INRA Nouzilly) et les principaux cabinets et laboratoires vétérinaires français spécialisés en lapin.

1. Matériel et méthodes

1.1. Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de la collection

Les souches ont été identifiées et caractérisées sur la base de critères phénotypiques (caractères bactériologiques classiques définissant l'espèce *Pasteurella multocida*, utilisation différentielle du sorbitol et du dulcitol pour distinguer les sous-espèces *multocida*, *septica* et *gallicida*.) et moléculaires (réactions de PCR spécifiques de l'espèce *P. multocida* et des différents types capsulaires (Townsend et al., 2001) et de la présence du gène codant pour la toxine A dermo-nécrotique (Register

and DeJong, 2006) liée au syndrome de rhinite atrophique (DiGiacomo et al., 1993).

1.2. Génotypage des souches de *Pasteurella multocida*

Une méthode de typage moléculaire par MLVA (Multi-Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis) a été développée. Cette technique repose sur l'analyse de séquences répétées de tailles variables situées dans des régions intra ou intergéniques du génome. Une analyse *in silico* du génome de *P. multocida* PM70 (May et al., 2001) à l'aide d'outils de détection de microsatellites avait initialement permis de sélectionner 10 régions VNTR (Bikandi et al., 2004 ; Grissa et al., 2008). Deux PCR multiplexes ont été mises au point et réalisées pour chacune des 174 souches en utilisant des amorces marquées avec trois fluorophores différents de façon à combiner l'amplification des six VNTR identifiés comme les plus polymorphes. La taille des amplicons a ensuite été analysée précisément par deux séries d'électrophorèses capillaires par comparaison à un standard de taille interne (ABI-310 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

La technique MLVA développée a été validée par comparaison des résultats obtenus à ceux produits par un schéma Multi Locus Sequence Type (MLST) déjà publié (Davies et al., 2004) sur un panel de 28 souches de la collection. Ce dernier a été constitué de façon à représenter au mieux la diversité observée en MLVA associée aux différents caractères et origines des souches.

1.3. Stratégie expérimentale

La virulence de 5 souches représentant les groupes génétiques les plus fréquemment isolés dans les élevages a été mesurée *in vivo* selon plusieurs protocoles afin de définir un modèle d'infection chez le lapin. Le modèle retenu a ensuite été utilisé pour comparer les virulences de 20 souches, choisies pour représenter la diversité de la collection en tenant compte de la sous-espèce, du type capsulaire, du profil MLVA et de l'origine (Tableau 1).

1.4. Test de virulence des souches

Des lapins de 7-8 semaines issus d'un élevage indemne de pathogènes (animaux SPF, Hypharm) ont été maintenus en cages de 2-3 animaux et infectés après une semaine d'adaptation aux locaux confinés (A2). Ils ont été pesés lors de leur arrivée puis chaque semaine, et des prises de sang ont été réalisées à chaque intervention afin de rechercher les anticorps anti-*Pasteurella* à l'aide d'un test ELISA mis au point au laboratoire. Leur température corporelle a été mesurée quotidiennement les jours suivant l'infection puis à intervalles réguliers jusqu'à l'autopsie finale, 2 semaines après l'infection expérimentale. Deux voies d'inoculation, la voie intra-nasale (IN) et la voie sous-

cutanée (SC) dorsalement en arrière du cou ont été testées.

1.5. Analyses statistiques

Afin de détecter des niveaux pertinents de structure génétique, les isolats bactériens ont été regroupés de différentes manières (pathologie associée chez le lapin, âge du lapin). La différenciation a été examinée à l'aide de l'estimateur de Weir & Cockerham (Weir & Cockerham 1984) et en testant leur signification par randomisation (15000 permutations) à l'aide de l'outil FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). L'effet de la localisation des souches sur la structure génétique a été analysé à l'aide des F-statistiques hiérarchiques développées par Yang (1998) et l'outil R-package HierFstat 0.04-6 (De Meeûs & Goudet, 2007).

La correspondance entre les profils MLVA et MLST a été confirmée grâce au test de Mantel en comparant les distances génétiques estimées avec chaque technique (1000 permutations).

2. Résultats et discussion

2.1. Biodiversité des isolats de *Pasteurella*

Six régions VNTR ont été sélectionnées à partir de la séquence complète de la souche Pm70 (May et al. 2001) et leur polymorphisme a été analysé sur les 174 isolats de *P. multocida*. De 3 à 14 allèles différents ont été identifiés par locus. La combinaison des allèles de chaque locus a permis de définir 51 profils MLVA distincts dont 4 représentent 61% des isolats analysés (MLVA types 5 (n=48), 1 (n=25), 10 (n=18) et 15 (n=16)). L'analyse de la relation génétique entre les profils MLVA par l'approche « Minimum Spanning Tree » (Feil et al. 2004) a permis de définir 7 groupes ou « complexes clonaux » (Figure 1).

Nous avons observé une excellente concordance ($p < 0.001$) entre les groupes de souches définis par MLVA et ceux définis par le schéma MLST de Davies et al. (2004), avec une discrimination plus élevée en MLVA se traduisant par l'identification de plusieurs groupes MLVA au sein d'un même groupe MLST.

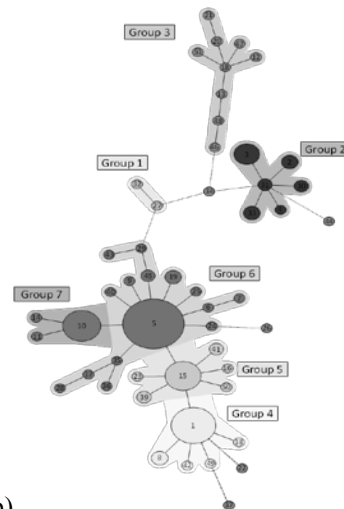
2.2. Relation entre l'origine des souches et leurs génotypes.

Les liens statistiques entre les lapins prélevés (âge, pathologie associée au prélèvement, origines géographiques, étage de production...) et le génotype MLVA de souches ont été étudiés. Aucun lien significatif n'a été observé ni avec la classe d'âge des lapins ni avec les symptômes présentés par ces derniers (F non significatif, $P > 0,05$).

Cependant, il existe une corrélation entre l'origine géographique au niveau du département et le génotype (F= 0,053, P = 0,006), de même qu'entre l'étage de production et le génotype (F=0,091, P = 0,002).

Figure 1 : a) Analyse de la proximité génétique des 51 profils MLVA identifiés et regroupement en 7 groupes. Les nombres correspondent à l'identifiant de chaque profil MLVA. La taille des cercles reflète le nombre de souches. Un trait entre deux cercles correspond à la variation allélique d'un seul locus.. b) Répartition géographique des souches par profil MLVA. La taille des cercles reflète le nombre de souches possédant le même profil MLVA.

a)



b)



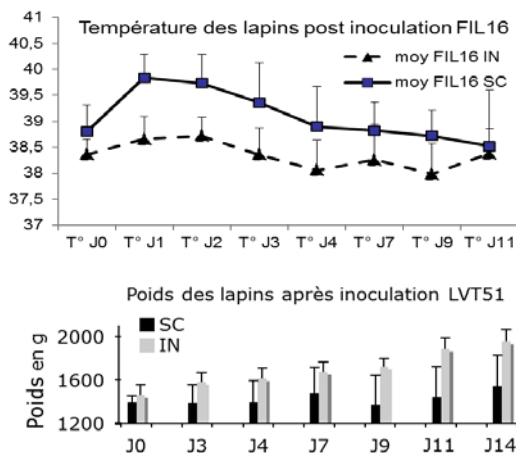
2.3. Choix du modèle expérimental

Cinq souches de *Pasteurella*, deux dates d'autopsie (J7, J14), et les voies IN et SC ont été comparées (Figure 2). Des lots de 5 lapereaux des 2 sexes ont été utilisés. Après infection par voie intra-nasale (2×10^7 bactéries), seule une légère hyperthermie a été observée et la croissance des lapereaux n'a pas été affectée. *Pasteurella* n'a pu être ré-isolée qu'à partir des fosses nasales et dans 2 cas sur 5, des poumons. Un second essai avec une dose 10 fois plus élevée n'a pas amélioré la reproductibilité de l'infection. En revanche, la voie sous-cutanée (2×10^6 bactéries/animal) provoque une forte hyperthermie, un arrêt de la croissance des lapereaux, la formation d'abcès plus ou moins disséminés selon les souches et une contamination des poumons, de la rate et du foie. Elle provoque la séroconversion de tous les animaux inoculés. Cette voie a donc été retenue pour mesurer la virulence des souches en raison de sa capacité à provoquer une infection reproductible et quantifiable.

Tableau 1. Souches de *Pasteurella* dont la virulence a été mesurée par inoculation sous-cutanée au Lapin.

Isolats	Organe ou pathologie	Sous espèce	Type capsulaire	Etage production	Département	Groupe MLVA
LVT51	poumon	<i>septica</i>	F	production	49	6
BLN18	oreille	<i>multocida</i>	A	multiplication	35	
FIL54	foie - trachée	<i>septica</i>	A	production	05	
LVT50	poumon	<i>septica</i>	F	production	49	
LVT55	poumon	<i>multocida</i>	D	production	49	4
FIL16	sinus	<i>septica</i>	F	sélection	49	
LVT13	sinus	<i>septica</i>	A	production	49	
LVT41	pattes	<i>multocida</i>	A	production	49	
LVT100	sinus	<i>septica</i>	F	production	86	5
LVT105	poumon	<i>septica</i>	F	production	85	
FIL14	sinus	<i>septica</i>	F	sélection	49	7
LVT5	corne utérine	<i>septica</i>	A	production	49	
LVT62	poumon	<i>multocida</i>	F	production	49	3
LVT84	abcès	<i>septica</i>	F	production	49	
FIL53	utérus mamelle	<i>septica</i>	F	production	79	2
FIL25	abcès	<i>multocida</i>	A	multiplication	49	
FIL20	coryza	<i>multocida</i>	A	sélection	49	
FIL27	mastite	<i>multocida</i>	A	multiplication	49	
FIL64	poumon-sinus	<i>multocida</i>	A	production	79	2
LF2	péritoine	<i>multocida</i>	A	production	22	

Figure 2 : L'infection par voie sous-cutanée provoque des signes cliniques marqués (exemples).



2.4. Mesure de la virulence des souches

Vingt souches de *Pasteurella* représentatives des différents groupes génétiques (tableau 1) ont été inoculées par voie SC à des lots de 5 lapins. Des lots témoins non infectés et des répétitions de certains inocula ont montré la reproductibilité des résultats et l'absence de contamination entre lots pendant la durée (14 jours) de chacune des 3 infections expérimentales. L'infection SC par *Pasteurella* provoque la séroconversion de tous les animaux inoculés.

Plusieurs animaux ont été capables de contrôler complètement l'infection par certaines souches, mais la majorité a développé des abcès au point d'inoculation et en d'autres localisations incluant les ganglions lymphatiques, la cage thoracique et les poumons. Les animaux présentant des lésions ont manifesté une croissance réduite, en relation avec le nombre et la taille de celles-ci.

Les souches testées peuvent être classées en trois groupes en fonction de leurs pouvoirs pathogènes :

- Des souches très peu pathogènes, n'induisant qu'une légère hyperthermie avec un impact faible sur la croissance des lapereaux ;
- Des souches provoquant une hyperthermie forte mais transitoire, ainsi que des abcès dans les tissus sous-cutanés et parfois les tissus profonds, avec un impact important sur la croissance des animaux ;
- Des souches responsables de nombreux abcès et disséminant dans les tissus profonds à des niveaux élevés, provoquant la mort d'une proportion importante d'animaux (40% - 80%), les comptages de *Pasteurella* dans la rate, les poumons et le foie pouvant atteindre 200 000 bactéries/g.

Conclusions

Le modèle d'infection expérimentale mis au point permet une infection reproductible et quantifiable. Il met en évidence une grande variabilité du pouvoir pathogène des souches de *P. multocida* isolées dans les élevages cynicoles.

L'utilisation d'une souche à fort pouvoir pathogène permettra de comparer la variabilité des réponses des populations de lapins à l'infection par *Pasteurella*, variabilité dont une partie est probablement d'origine génétique. Dans la perspective d'une sélection sur ce type de critère, il sera important de mesurer les paramètres et les marqueurs génétiques associés chez le lapin à la résistance à l'infection par *Pasteurella*.

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement le personnel de la Plate-forme d'infectiologie expérimentale (PFIE, INRA Val-de-Loire, Nouzilly) dont F. Sarcé, P. Cousin, B. Campone, T. Chaumeil et E. Guittou.

Références

- BIKANDI J., SAN MILLAN R., REMENTERIA A., GARAIZAR J., 2004. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 20 : 798-799.
- 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., pages 38 – 41.
- BOUCHER S., NOUAILLE L., ALBIZU I., BASELGA R., 2003. Auto-vaccines against mycoplasmas in farm rabbits. *World Rabbit Sci.* 2003 : 11: 109 – 204.
- COUDERT P., 2004. Pasteurelloses du lapin. *Cuniculture*, 31 : 49-51.
- DAVIES RL, MACCORQUODALE R, REILLY S., 2004. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet Microbiol.* 99:145-58.
- DE MEEUS T, GOUDET J., 2007. A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. *Infect Genet Evol* 7: 731-735.
- 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.
- GOUDET J., 2002. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2. available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- GRISSA I, BOUCHON P, POURCEL C, VERGNAUD G., 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90: 660-668.
- 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. *PNAS* 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.* 2006: 117: 201-10.
- 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.
- WEIR BS, COCKERHAM C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-70.
- YANG R.C., 1998. Estimating hierarchical F-statistics. *Evolution* 52: 950-9