



**ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT CLINIQUE DES ANIMAUX DE COMPAGNIE ET EQUIDES
CLINIQUE AVIAIRE, DES RONGEURS ET LAGOMORPHES**

**Contribution à l'identification de l'agent étiologique de l'entéropathie
épizootique du lapin.**

**Contribution to the identification of the aetiological agent of epizootic
rabbit enteropathy.**

Nathalie HUYBENS

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2012-2013

*A ceux que j'ai appelé Parrain et Marraine,
Modèles d'excellence et de joie de vivre,
J'aurais aimé tenir vos mains un peu plus longtemps.*

REMERCIEMENTS

J'ai toujours été plus doué avec les chiffres qu'avec les mots mais aujourd'hui je ne sais pas ce qu'il y a de plus difficile, compter le nombre de personnes à remercier ou trouver les mots pour le faire...

Tout d'abord j'aimerais remercier mon promoteur, Didier Marlier, pour les heures précieuses de discussion que j'ai passées avec lui et pour ses conseils qui m'ont permis d'orienter au mieux la recherche ainsi que l'écriture.

Ma gratitude n'est pas moindre pour mon co-promoteur, Jacques Mainil, pour ses conseils et le support dont il a fait preuve depuis la préparation du FRIA jusqu'à la défense de cette thèse.

Une reconnaissance tout particulière pour Julien Houeix. Optimisateur de PCR hors pair, spécialiste des galeries API, repiqueur de toutes les colonies, tueur stoïque de lapins. Cette thèse n'existerait pas sans toutes les manipulations que tu as réalisées, merci beaucoup !

J'aimerais remercier également Dominique Licois pour avoir géré toutes les inoculations dans son laboratoire et pour m'avoir transmis ses connaissances aussi bien sur l'entéropathie et la pathologie cunicole que sur les méthodes d'expérimentation.

Je n'oublie pas les membres du service de Bactériologie, Marjorie Bardiaux, Adeline Muylaer et Jean-Noël Duprez qui ont supporté mes visites et questions incessantes ainsi que l'emprunt récurrent de réactif et matériel.

Un tout grand merci au service des Cyanobactéries, spécialement Annick Wilmots pour avoir partagé sa connaissance de l'étude des populations bactériennes et m'avoir permis d'utiliser son laboratoire pour l'exécution des DGGEs.

Je remercie également Frédéric Farnir pour son aide dans les analyses statistiques ainsi que Sylvie Combes et Laurent Cauquil pour l'analyse Statfingerprint de mes résultats DGGE.

Un tout grand merci à Pierre pour les corrections grammaticales et orthographiques.

Many thanks to Anne for the English corrections.

Merci aux collègues qui ont partagé avec moi ces quelques années au service aviaire, Aline, Alex, Charlie, Fred et Julien. Il y a eu des hauts et des bas mais les cinq sens de l'aviaire resteront pour moi une excellente expérience.

Merci à mes parents et à leur conjoint pour leur support inconditionnel.

Merci à Violaine et Arnaud, chouchou et canard, vous avez été d'un grand soutien durant les premières années de cette thèse où nous vivions ensemble et même après, à distance.

Enfin, merci à Flo parce que tu es tout, que tu me donnes tout et que sans toi, je n'aurais jamais fini ce travail... je ne l'aurais sans doute jamais commencé.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
I. HISTORIQUE DE L'ÉLEVAGE DE LAPIN	15
II. PATHOLOGIES DIGESTIVES DU LAPIN D'ÉLEVAGE	17
1. <i>Non infectieuses</i>	17
2. <i>Virales</i>	19
a. Rotavirus.....	19
b. Coronavirus.....	19
c. Autres virus	20
3. <i>Bactériennes</i>	20
a. Escherichia coli.....	20
b. Clostridium spiroforme.....	21
c. Clostridium piliforme	21
d. Autres bactéries.....	21
4. <i>Parasitaires</i>	22
a. Eimeria sp.	22
b. Autres parasites.....	22
5. <i>D'origine inconnue</i>	22
III. L'ENTÉROPATHIE ÉPIZOOTIQUE DU LAPIN	23
1. <i>Apparition de la pathologie</i>	23
2. <i>Signes cliniques et lésions</i>	23
3. <i>Reproduction expérimentale</i>	24
4. <i>Traitement et prophylaxie</i>	25
5. <i>Etiologie</i>	25
6. <i>Phase précoce et toxine</i>	26
7. <i>Autres recherches</i>	27
8. <i>Evolution de l'épidémie</i>	27
IV. L'ANALYSE DES POPULATIONS BACTÉRIENNES COMPLEXES PAR DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	29
1. <i>Pourquoi la biologie moléculaire ?</i>	29
2. <i>Article de synthèse</i>	29
OBJECTIFS	47
PARTIE EXPERIMENTALE	49
I. COMPARAISON DU TEC4 ET DE SES FRACTIONS PAR LA BACTÉRIOLOGIE CLASSIQUE	49
1. <i>Fractionnements</i>	49
a. Centrifugation sur gradient discontinu de sucrose	49
b. Adhérence cellulaire	50
c. Traitement au chloroforme éthanol	51
d. Antibiogrammes	51
e. Traitement aux antibiotiques	52
f. Traitement par acidification	54
2. <i>Inoculations</i>	55
a. 50% et RK501	55
b. RK502, PLA, RIN	56
c. 50%, RK501, CERK, RIN.....	56
d. Fractions antibiotiques	57

e.	Fractions acides	58
3.	<i>Etude bactériologique classique</i>	59
a.	Bactérioscopie	59
b.	Mise en culture sur milieux conventionnels	61
c.	Recherche d'entérobactéries.....	61
d.	Recherche de <i>Campylobacter</i>	61
e.	Calcul des Unités Formant Colonies.....	63
f.	Visualisation des bactéries et cellules sur lames Lab-Teck®	64
II.	GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE PAR PCR (DIFFÉRENTES APPROCHES).....	65
1.	<i>ARDRA</i>	65
2.	<i>DGGE</i>	66
a.	Région hypervariable V3.....	66
b.	Régions hypervariables V6-V8	67
3.	<i>RAPD</i>	68
4.	<i>Clonage et Séquençage des bandes d'intérêt</i>	71
a.	Matériel et méthode de clonage	71
b.	Analyse des séquences	72
5.	<i>Identification des séquences d'intérêt dans des échantillons de terrain</i>	74
a.	Mise au point des PCR pour les séquences R6B et AP5 et pour le gène <i>yijP</i>	74
b.	Echantillons	74
c.	Identification des souches porteuses des séquences R6B et AP5.....	76
d.	Inoculation du <i>Staphylococcus epidermidis</i> R6B+	76
e.	Clonage de gène <i>yijP</i> -like du TEC4	77
6.	<i>Application de la DGGE sur des matières fécales de lapins inoculés avec TEC4 et des témoins négatifs</i>	80
a.	Inoculation et prélèvements.....	80
b.	Comparaison des flores fécales	80
7.	<i>Mise en évidence d'une bactériémie potentielle</i>	85
III.	COMPARAISON DES FRACTIONS PAR PYROSÉQUENÇAGE.....	87
IV.	RÉSUMÉ DES RÉSULTATS	91
	DISCUSSION GENERALE	93
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	103
	PUBLICATIONS	105
1.	<i>Article : "Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces epizootic rabbit enteropathy."</i> .	105
2.	<i>Article : "Epizootic rabbit enteropathy inoculum (TEC4) : antibiograms and antibiotic fractionation."</i>	115
3.	<i>Conférence internationale : "Is epizootic rabbit enteropathy (ERE) a bacterial disease?"</i>	124
4.	<i>Poster : "Biomolecular comparison of bacteriological caecal flora with and without Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) contamination"</i>	130
5.	<i>Short Communication : « Epizootic rabbit enteropathy: comparison of biomolecular profiles from virulent and non-virulent samples. »</i>	133
6.	<i>Short Communication : «Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inoculums and rabbits caecal samples</i> »	136
	BIBLIOGRAPHIE	139

LISTE DES ABREVIATIONS

16SrDNA	Gène codant pour l'ARN 16S de la sous unité 30S du ribosome procaryote
50%	Fraction du TEC4 récupéré dans le coussin de sucrose à 50% lors de la centrifugation sur gradient discontinu de sucrose
50PH	Fraction 50% traité à l'acide (pH = 2,2)
AA	Acide Aminé
ADF	Acide Detergent Fibre Lignocellulose
ADL	Acid Detergent Lignin Lignine
AMC	TEC4 traité à l'amoxicilline /ac. clavulanique
ANOSIM	Analyse de similarité
AP5	Séquence d'intérêt de 788pb présents dans TEC et mis en évidence par une RAPD
AP-PCR	Arbitrary primed - PCR PCR utilisant des amorces créées arbitrairement
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis Profils de restriction du gène 16SrDNA
BACI	TEC4 traité à la bacitracine
CARL	Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes
CCDA	Gélose pour <i>Campylobacter</i> avec charbon de bois, desoxycholate et supplément
CEF	TEC4 traité au ceftiofur
CERK	RK501 traité au chloroforme/éthanol
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Électrophorèse sur gel contenant un gradient de dénaturant
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium Milieu utilisé pour la culture cellulaire
DOX	TEC4 traité à la doxycycline
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique.
EEL	Entéropathie Épizootique du Lapin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
EM	Entérite Mucoïde
EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène
FAO	Food and Agriculture Organization Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FD	Fibres digestibles
GQM	Gain Quotidien Moyen
HT-sequencing	High Throughput sequencing Séquençage à ultra haut débit
IASP	Infectiologie Animale et Santé Publique
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria Broth
MJED	Méga Joules d'Énergie Digestible

NDF	Neutral Detergent Fibre Fibres faiblement digestives
NMDS	Random starts nonmetric multidimensional scaling
NOVO	TEC4 traité à la novobiocine
OTU	Operational Taxonomic Unit
PB	Paire de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction Réaction de polymérase en chaine
PI	Post inoculation
PLA	Inoculum obtenu par adhérence de la fraction 50 % sur boîte de culture cellulaire vide
R6B	Séquence d'intérêt de 396pb présents dans TEC et mis en évidence par une RAPD
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA PCR aléatoire sur des génomes entiers
RbCV	Rabbit Coronavirus Coronavirus du lapin
RDP	Ribosomal Database Project Base de données phylogénétiques sur les séquences du gène 16SrDNA
RIN	Dernier liquide de rinçage lors du fractionnement par adhérence cellulaire
RK13	Lignée cellulaire immortalisée de reins de lapin
RK501	Inoculum obtenu par adhérence de la fraction 50 % sur des cellules RK13 (un passage)
RK502	Inoculum obtenu par adhérence de la fraction 50 % sur des cellules RK13 (deux passages)
STREP	TEC4 traité à la streptomycine
SUR	Fraction du TEC4 récupéré dans le surnageant lors de la centrifugation sur gradient discontinu de sucrose
TAB	Témoin traitement antibiotiques
TAE	Tris, Acétate, EDTA Solution tampon de migration en gel d'électrophorèse
TE	Tris, EDTA Solution tampon de conservation de gel d'électrophorèse
TEC	Inoculum de référence de l'EEL, obtenu après dilution, centrifugation et filtration de contenu digestif de lapin malade.
TEC1	Inoculum de référence de l'EEL de 1ère génération
TEC2	Inoculum de référence de l'EEL de 2ème génération
TEC3	Inoculum de référence de l'EEL de 3ème génération
TEC4	Inoculum de référence de l'EEL de 4ème génération
TEM1	Témoin négatif, contenu caecal d'un lapin EOPS
TEM2	Témoin négatif, contenu caecal d'un lapin de compagnie
TEM3	Témoin négatif, contenu caecal d'un lapin d'élevage
TEM4	Témoin négatif, contenu caecal d'un lapin de 3 lapins EOPS
TEPH	TEC4 traité à l'acide (pH = 2,2)
TYL	TEC4 traité à la tylosine
UFC	Unité Formant Colonie
VAN	TEC4 traité à la vancomycine

RESUME

L'entéropathie épizootique du lapin (EEL) est une pathologie digestive induisant d'énormes pertes économiques pour la cuniculture européenne. L'agent étiologique reste inconnu à ce jour mais un inoculum de référence (TEC4) permet de reproduire la pathologie. Cet inoculum contient un trop grand nombre d'espèces bactériennes différentes pour permettre une analyse moléculaire directe. Il a donc été traité par centrifugation sur gradient de sucrose, par adhérence cellulaire, par ajout de chloroforme / éthanol, d'antibiotiques et d'un tampon acide, afin de réduire le nombre d'espèces bactériennes n'ayant pas de lien étiologique direct avec l'EEL. Ces différentes fractions ont été inoculées à des lapins exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) afin de vérifier leur virulence. Leur flore bactérienne a été analysée par des techniques de bactériologie classique à savoir : l'identification des espèces cultivables sur des milieux traditionnels, le dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC) et un examen bactérioscopique direct après coloration de Gram afin de dénombrer les bactéries morphologiquement différentes.

Des techniques de biologie moléculaire ont été utilisées sur l'inoculum, ses fractions et des témoins négatifs. Le but était de trouver une séquence génomique spécifique à savoir une séquence, présente dans les fractions reproduisant la pathologie et absente de celles ne la reproduisant pas. Trois méthodes moléculaires ont été employées pour comparer les fractions positives et négatives. Une analyse des profils de restriction du gène 16SrDNA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ou ARDRA) a été effectuée au moyen de 22 enzymes de restriction. Les régions hypervariables V3 et, V6 à V8 du gène 16SrDNA ont été étudiées par Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Des PCR aléatoires (Random Amplification of Polymorphic DNA ou RAPD) ont également été effectuées. Seule cette dernière technique a permis la mise en évidence de séquences d'intérêt. Malheureusement une analyse de la fréquence de ces séquences sur des échantillons de terrain n'a pas permis la mise en évidence d'un lien étiologique avec l'EEL. Pour la première séquence, la souche bactérienne porteuse a pu être isolée. Aucun signe clinique d'EEL n'a pu être reproduit dans une épreuve virulente sévère.

Des échantillons de matières fécales, de sang sur EDTA et de sérum ont été récoltés lors d'une reproduction expérimentale d'EEL sur lapins sensibles. Une étude de l'évolution de la flore fécale de lapins inoculés et non inoculés au cours du temps a été réalisée grâce à des profils de DGGE. Malheureusement, aucune bande spécifique ni aucun motif de bande ne semble lié à la présence de la pathologie. Sept espèces bactériennes ont été détectées dans les prélèvements de sang réalisés deux jours après inoculation chez trois lapins malades. Ceci confirme l'hypothèse d'une bactériémie en phase précoce d'EEL.

Enfin, six fractions ont été analysées par un pyroséquençage du gène 16SrDNA. Le but était de mettre en évidence un genre ou une espèce présents dans les fractions virulentes, moins nombreux dans la fraction peu virulente et absent de la fraction non virulente. La richesse et la diversité des échantillons est égale voire supérieur à celle d'échantillons de matière fécale humaine ou de sol. Comme il fallait s'y attendre, les genres identifiés par cette technique sont différents de ceux obtenus par culture, néanmoins aucun genre particulier ne semble lié aux échantillons virulents. La résolution de ce type d'analyse (souvent limitée au genre) semble insuffisante pour identifier l'agent directement ; néanmoins, un nombre plus élevé de séquences et d'échantillons pourrait permettre de réduire à un genre ou une famille la recherche de l'agent étiologique.

ABSTRACT

Epizootic rabbit enteropathy (ERE) is a pathology of the digestive system inducing economic loss in rabbit husbandry throughout Europe. The aetiological agent is unknown at the present time but a reference inoculum (TEC4) reproduces the pathology. This inoculum contains an extremely rich bacterial flora. Several methods were used to reduce this bacterial flora while retaining virulence: centrifugation on discontinuous sucrose gradient, cellular adherence and treatment with chloroform/ethanol, antibiotics and an acid buffer. The flora of the obtained fractions were analyzed using traditional bacteriological techniques: identification of cultivable species, counting of colony forming units (CFU) and direct bacterioscopic exam after Gram coloration.

Then, molecular biology was used to compare inocula, fractions and negative control. Three methods were used to find sequences present in virulent inocula and absent from non virulent inocula and negative controls. Twenty-two restriction enzymes were used to compare the 16SrDNA restriction profile (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis or ARDRA). Hypervariable regions V3 and V6 to V8 were studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Finally, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) was used on the inocula, fractions and negative controls. Only the RAPD allow the obtainment of sequences specific to virulent inoculum. Unfortunately, a study on field samples did not confirm the link between the sequences and ERE. For one of the two identified sequences, a bacterial strain carrier was isolated. The strain was inoculated into rabbits but no clinical signs of ERE were observed.

Samples of stools, blood and serum were collected during an experimental ERE infection. The evolution of fecal bacterial flora was studied using DGGE to follow the evolution of flora over the course of the disease. Unfortunately, neither specific bands nor specific band patterns appeared to be linked to the disease. Seven bacterial species were detected in the blood samples of three inoculated rabbits at day two post inoculation, confirming the hypothesis that bacteremia occurs early on ERE infection.

Finally, six fractions were analysed by pyrosequencing of the 16SrDNA gene. The aim was to find one or several species present in the virulent inocula but absent or less numerous in the non-virulent inocula and control. The richness and diversity of all the inocula is equal or superior to human feces. As expected, the flora identified by pyrosequencing was different from the cultivable flora. However, no genera or species was specifically linked to the virulent inocula. The resolution of this technique was inadequate to identify the aetiological agent of ERE. A higher number of samples and sequences could at best restrain the identification to one genus.

INTRODUCTION

I. HISTORIQUE DE L'ÉLEVAGE DE LAPIN

Le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*), à l'inverse de nombreuses espèces d'animaux de rente, n'a été domestiqué que tardivement. Les premiers rapports de reproduction en captivité datent de la fin du Moyen-âge. Cependant, les gourmets de l'époque préférant le lapin sauvage ou de garenne au lapin d'élevage (Lebas, sans date), l'essor de l'élevage rationnel n'a réellement commencé qu'à la fin du 19^{ème} siècle. Au siècle dernier, des sociétés d'élevage voient le jour et des races sont sélectionnées pour leur production de viande ou la qualité de leurs poils (Lebas *et al.*, 1997). En Belgique, plusieurs races locales sont créées telles que le Géant des Flandres, le Bleu de Beveren, le Blanc de Termonde,... (Fédération Nationale des Eleveurs d'Animaux de Basse-Cour, 2009).

Dès les années 1950, les petits élevages et les élevages familiaux ont tendance à disparaître majoritairement à cause de l'épidémie de myxomatose qui se propage partout en Europe (Fenner et Ratcliffe, 1965) mais aussi suite à la mise sur le marché de viande congelée. Les éleveurs professionnels sortent relativement indemnes de cette crise, essentiellement grâce à la vaccination efficace de leur cheptel (Lebas, sans date). Alors que l'industrialisation de l'élevage se développe vers la fin des années cinquante, les races locales sont remplacées par deux races importées des Etats-Unis : le Néo-Zélandais et le Californien dont la conformation des pattes est plus adaptée au grillage des cages et dont la productivité est supérieure. Les progrès en management et en automatisation durant les années septante permettent aux éleveurs de gagner du temps pour le nettoyage et l'alimentation ainsi que pour s'occuper des animaux. Ils mettent en place le sevrage précoce (Lebas *et al.*, 1997). A la même époque, un hybride néo-zélandais/californien, qui possède un meilleur indice de consommation et arrive plus rapidement à un poids d'abattage, est créé (Maj *et al.*, 2009). Dans les années quatre-vingts, quelques grosses unités de productions (environ 500 femelles) voient le jour en Belgique (Filière avicole et cunicole wallonne, sans date). Leur gestion est facilitée par l'insémination artificielle, l'utilisation d'analogue de la gonadolibérine et la conduite en bandes. Cette conduite d'élevage a également permis l'égalisation des tailles des portées par adoption des nouveau-nés (Bolet, 1998).

En 1997, vingt pays généraient plus de 80 % de la production mondiale (Lebas *et al.*, 1997). L'Europe latine est le plus grand producteur et l'Italie est en première position avec une production de 300 000 tonnes. La Belgique était le douzième plus grand producteur avec 24 000 tonnes de carcasses par an (Lebas *et al.*, 1997) grâce à environ 200 000 femelles reproductrices (Filière avicole et cunicole wallonne, sans date). En 2001, la FAO estimait la production mondiale de lapin à plus d'un million de tonnes par an (Anonyme, 2001). En 2006, la production de viande de lapin atteint 1,6 millions de tonnes. Cet essor est essentiellement dû à une augmentation importante de la production chinoise qui compense la chute de production européenne (Braine, 2007). A cette période, l'Italie, par exemple, ne produit plus que 225 000 tonnes (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2008). La production interne n'étant pas suffisante pour la consommation (5^{ème} mondiale), la Belgique importe de la viande de lapin. Les importations proviennent surtout de Hongrie et de Chine (respectivement 95 et 40 % de leur production étant destinée à l'exportation).

Introduction

La production belge actuelle est, comme en France, répartie entre des élevages industriels et « artisanaux ». Ces derniers sont relativement difficiles à quantifier mais représentent une portion non négligeable de la production, un quart à un tiers en Belgique (Colin et Lebas, 1995). D'après la branche belge de la World Rabbit Association, la production belge a chuté à 150.000 lapins par an (environ 30 000 mères) en 2009 alors qu'elle était de 300.000 en 1999 (environ 60 000 mères). Par contre, en 2006, la production belge n'était constituée que d'environ 20 000 mères. Une légère croissance aurait donc repris depuis deux-trois ans (Jacquet, communication personnelle). En France, les statistiques des rassemblements d'éleveurs tels que la RENACEB et RENALAP montrent une diminution lente mais persistante sur une période de 10 ans (1997-2006) (Braine, 2003; Jentzer, 2008) mais, depuis 2007, la production française a légèrement progressé malgré la hausse des prix des aliments (Jentzer, 2008). Malheureusement, les associations de producteurs craignent que leur marge bénéficiaire, en perpétuelle baisse, ne finisse par nuire à de nombreuses infrastructures (Jentzer, 2008).

Malgré la légère augmentation du nombre d'animaux produits pendant ces deux dernières années, un déclin de la production cunicole et spécialement de la production vivrière est observé dans nos pays. Divers facteurs expliquent cette situation notamment, comme déjà indiqué ci-dessus, un important problème économique. En effet, la marge brute des exploitants diminue fortement (Jentzer, 2008). Dans ce cadre, l'apparition de l'entéropathie épizootique du lapin en 1997 a joué un rôle important suite aux mortalités et pertes de production en élevage. Cette pathologie a entraîné un manque à gagner ainsi qu'une augmentation des frais vétérinaire et de médicaments avec en corolaire une diminution de 14% des revenus des éleveurs (Dewree *et al.*, 2003). D'autres explications à cette diminution pourraient être le développement de plus en plus important du lapin comme animal de compagnie (Brouyaux, 2006) ainsi que les préoccupations grandissantes concernant l'aspect éthique des élevages industriels d'animaux. Ce dernier aspect a déjà été pris en compte par certains éleveurs comme le montrent les 48 ateliers de productions de lapin d'agriculture biologique en France (Leroyer et Coulombel, 2009). En Belgique, un éleveur a produit durant 5 ans des lapins label engraisés sur paille (Jacquet *et al.*, 2005). Cependant, une incidence sévère des infections digestives notamment par *Eimeria* spp est constatée dans ce type d'élevage (Morisse *et al.*, 1999; Dal Bosco *et al.*, 2002). Ces derniers ne semblent donc pas être une solution durable pour un renouveau de l'élevage de lapins.

La consommation mondiale annuelle de viande de lapin était de 280g par personne en 1997. Une grande variation est remarquée en fonction des pays : de 30g par an et par personne au Japon à 8,8kg par an et par personne à Malte. En France (et probablement la Belgique) la consommation était d'environ 2kg/an/habitant (Lebas *et al.*, 1997). La viande de lapin est soumise à très peu d'interdits religieux mais, le lapin étant de plus en plus considéré comme un animal de compagnie, sa consommation n'est plus aussi appréciée que par le passé. Pourtant, la viande de lapin possède de nombreux atouts pour répondre à certaines préoccupations sociétales ou de santé publique :

- Premièrement, dans la conjoncture alimentation-santé-obésité, il s'agit d'une viande maigre, avec un ratio « protéines sur énergie » élevé ce qui est intéressant dans un contexte de limitation des apports en énergie. De plus, les acides aminés essentiels y sont présents avec une bonne biodisponibilité. La teneur en cholestérol est l'une des plus basses parmi les viandes. Les omega3 sont présents de manière non négligeable dans la viande de lapin même si le rapport omega6/omega3 est fort variable d'un lapin à l'autre. Enfin, la viande de

lapin est pauvre en sodium mais riche en phosphore et autre minéraux (Combes et Dalle Zotte, 2005).

- Deuxièmement, dans la prospective du développement durable, l'énergie consommée par la cuniculture est assez faible comparée à d'autres élevages notamment à l'aviculture (Aubert *et al.*, 2009). Une lapine peut produire 80 à 120 kilos de lapins vifs par an, soit près de 3000 pour cent de son propre poids en viande (FAO, 2001). Le régime alimentaire du lapin contient plus de 16 à 21% de lignocellulose qui sont non digestibles par l'homme dont plus de 5,5% de lignine qui est non digérée par la plupart des herbivores (Gidenne, 2003). Ces constatations poussent d'ailleurs les pays en voie de développement à stimuler l'installation d'élevages cunicoles le plus souvent familiaux (Raharjo, 2008; Samkol et Lukefahr, 2008), initiatives encouragées par la FAO (FAO, 2001). Dans nos pays, les capacités du lapin à digérer la lignocellulose permettent d'utiliser les sous-produits de fabrication de biocarburant dans leur ration avec en plus un impact positif sur le rapport omega6/omega3 (Molette *et al.*, 2009).

Si le lapin est moins élevé pour sa viande, des élevages de lapins de compagnie se développent dans nos pays. Il y aurait en France environ 22.500 lapins nains reproducteurs (Fédération Française de Cuniculture, 2010). De nouvelles races apparaissent ainsi que de nouvelles robes pour les lapins nains (béliers nains, angoras nains et autres). Ces nouvelles caractéristiques sont sélectionnées par des éleveurs tout comme l'ont été les races viandeuses au siècle dernier (Fédération Française de Cuniculture, 2009; Fédération Nationale des Eleveurs d'Animaux de Basse-Cour, 2009).

La consommation de viande de lapin, bien qu'en diminution, reste encore élevée dans les pays d'Europe latine. Cette prédominance est également retrouvée dans la recherche scientifique. En effet, la moitié des communications du 9ème Congrès Mondial de Cuniculture (Vérone - Italie - Juin 2008) provenait d'équipes italiennes, françaises et espagnoles. A ce jour, les chercheurs, les groupements d'éleveurs et les vétérinaires de terrain continuent à défendre et améliorer un élevage écologiquement viable et une viande de bonne qualité.

II. PATHOLOGIES DIGESTIVES DU LAPIN D'ELEVAGE

En élevage industriel, les pathologies digestives représentent le principal motif de consultation vétérinaire comme le démontre une étude sur 11 ans (1998-2008) réalisée en France sur plus de 9000 autopsies (Sraka et Boucher, 2009). Une étude belge (de 1994 à 1998) démontre que les troubles digestifs représentent 32% des pathologies dans l'ensemble de la cuniculture belge et même 49% des pathologies des lapins de moins de 14 semaines (Marlier *et al.*, 2003). Les troubles digestifs du lapin sont le plus souvent multifactoriels (Cerioli et Lavazza, 2006). Dans 18,5% des cas, plusieurs agents pathogènes primaires ou opportunistes sont retrouvés (Peeters *et al.*, 1984). Certaines causes favorisantes ainsi que certains pathogènes primaires sont bien connus mais le développement d'une maladie est un déséquilibre entre la résistance de l'hôte, le pouvoir pathogène d'agents infectieux et l'environnement (Licois et Marlier, 2008).

1. NON INFECTIEUSES

Des conditions défavorables d'élevage (mauvaises conditions de logement, bruits,...) peuvent

Introduction

entraîner un état de stress chez le lapin pouvant être responsable de pathologies digestives (Marlier *et al.*, 2003). En effet, une augmentation du taux d'adrénaline augmenterait la durée du transit dans le tractus digestif ce qui laisserait plus de temps aux différents agents pathogènes pour adhérer à la muqueuse ou se développer dans le tractus digestif (Marlier *et al.*, 2003).

D'autre part, l'alimentation en cuniculture joue un rôle essentiel dans la santé digestive des lapins (Gidenne et Garcia, 2006). L'eau doit être disponible à raison de 200mL par jour et par lapin et ne doit pas être d'un pH trop basique (Marlier *et al.*, 2003). La ration doit être adaptée qualitativement et quantitativement en fonction du stade physiologique des animaux et en faisant attention aux transitions brutales. Brièvement, il convient d'apporter de 9,4 à 9,8 Méga Joules d'énergie digestible (MJED) par kg d'aliment à 90% de matière sèche et de 12 à 12,5g de protéine digestible/MJED. Durant l'engraissement, un aliment contenant une teneur en énergie digestible augmentée (9,8 à 10,3 MJED/kg d'aliment à 90 % de matière sèche) est utilisé avec une réduction des protéines digestibles à 11,5 ou 12 g/MJED (Gidenne, 2000). Les différents types de fibres (tableau 1) ont une grande importance dans la santé du tractus digestif du lapin, surtout les fibres faiblement digestibles (lignocellulose) (Gidenne, 2000; Bennegadi *et al.*, 2003; Gidenne, 2003; Romero *et al.*, 2009). Les recommandations dans la matière sèche sont de 32 et 50% de fibres en général et de 16 à 21% de lignocellulose dont plus de 5,5% de lignine (Gidenne, 2003). Le régime alimentaire influence la flore bactérienne résidente du tractus digestif et donc, dans une certaine mesure, la capacité à résister aux espèces pathogènes (Carabano *et al.*, 2006; Gidenne *et al.*, 2008).

TABLEAU 1: PRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES AU SEIN DES GLUCIDES

Amidon	Pectines et mucilages	Hémicellulose	Cellulose	Lignine
Glucides				
Fibres				
Fibres insolubles (ou faiblement digestibles) = NDF (neutral detergent fibre)				
		NDF - ADF	ADF (acide detergent fibre) = Lignocellulose	
Fibres solubles (digestibles) = FD		ADF - ADL	ADL (Acid Detergent Lignin)	

Le sevrage est une période capitale pour la maîtrise des pathologies digestives. En effet, il s'agit d'un changement de milieu combiné à un changement d'alimentation (Gidenne et Fortun-Lamothe, 2002). Afin d'éviter l'utilisation d'antibiotiques au moment du sevrage, diverses solutions ont été développées comme par exemple, l'augmentation des fibres non digestibles dans la ration juste après le sevrage ainsi qu'une transition lente de l'alimentation à partir du nid (Gidenne et Fortun-Lamothe, 2002). Par contre, l'efficacité de l'utilisation de prébiotiques, probiotiques ou extraits végétaux n'a pas encore été démontrée pour l'amélioration de la santé digestive des lapins (Maertens *et al.*, 2006).

Enfin, le lapin est très sensible aux mycotoxines surtout les aflatoxines (produites par les *Aspergillus*). Leur présence dans les aliments (fréquente en Asie mais plus rare dans nos pays) peut entraîner des troubles gastro-intestinaux mais également des ulcères et hémorragies de l'estomac, des prolapsus rectaux, une chute de l'immunité, des troubles nerveux, des tumeurs, des malformations chez les jeunes,... (Mezes et Balogh, 2009)

2. VIRALES

Des virus sont détectés chez environ 40% des lapins présentant une entérite, sans explication complémentaire des auteurs (Cerioli et Lavazza, 2006). Ils ne semblent cependant pas capables d'induire des pathologies graves dans les élevages et sont plutôt considérés comme peu pathogènes voire apathogènes. Ils ont pour la plupart la capacité de devenir endémiques. Le rôle des infections virales comme facteur favorisant d'autres pathologies digestives n'est pas encore bien défini (Lavazza et Capucci, 2008). L'hypothèse avancée par plusieurs auteurs est que ces infections endommagent la muqueuse intestinale, permettant l'attachement et la multiplication de bactéries pathogènes primaires ou opportunistes (Lavazza et Capucci, 2008). La prévalence des différentes familles de virus trouvées chez des lapins avec entérite est présentée au tableau 2.

TABLEAU 2 : FAMILLES DE VIRUS DETECTEES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE 1997 A 2005 CHEZ DES LAPINS AVEC ENTERITE (N=515)

	Négatif	Rotavirus	Parvovirus	Coronavirus	Entérovirus	Adénovirus	Calicivirus	Réovirus
Nbr	318	95	59	84	18	4	2	1
%	60	18,6	11,5	18,1	4,1	0,7	0,6	0,3

a. ROTAVIRUS

Les rotavirus sont les virus les plus souvent détectés chez des lapins présentant des troubles digestifs (tableau 2) (Cerioli et Lavazza, 2006). Ces virus sont peu pathogènes mais une inoculation reproduit des épisodes de diarrhée (Thouless *et al.*, 1988). La plupart des lapins adultes en sont porteurs asymptomatiques (Lavazza et Capucci, 2008), ce qui expliquerait la présence d'anticorps maternels chez les lapereaux jusqu'à l'âge de 30 à 45 jours (Cerioli et Lavazza, 2006; Lavazza et Capucci, 2008). Après cette période, selon la pression d'infection, des infections cliniques, avec des diarrhées suivies de constipations, ou subcliniques maintiennent la présence des virus dans les élevages. Les lésions macroscopiques retrouvées lors de rotavirose ne sont peu voire pas du tout décrites. Néanmoins, les diagnostics anatomopathologiques posés sur base de ces lésions sont des entérites et typhlites catarrhales, hémorragiques ou nécrotiques (Cerioli et Lavazza, 2006; Lavazza et Capucci, 2008). Ces épisodes cliniques apparaissent plus souvent en hiver lorsque la pression d'infection augmente et que la ventilation est diminuée (Marlier *et al.*, 2003). Une synergie a été décrite expérimentalement entre les rotavirus et *Escherichia coli* (Thouless *et al.*, 1996).

b. CORONAVIRUS

Le coronavirus du lapin (RbCV) n'est pas encore classé au sein de la famille des *Coronaviridae* (Lavazza et Capucci, 2008). Deux formes cliniques sont décrites en élevage : systémique ou entérique. La forme systémique entraîne fièvre, anorexie, leucocytose, lymphopénie, anémie, hypergammaglobulinémie et, très souvent, la mort. Les lésions retrouvées à l'autopsie sont essentiellement localisées au myocarde et à la plèvre. La forme entérique, quant à elle, se caractérise par des signes semblables au coronavirus des autres espèces (Cerioli et Lavazza, 2006; Lavazza et Capucci, 2008). Le virus se multiplie au sommet des villosités et entraîne des diarrhées dans 14% des cas lors d'inoculation (Descoteaux et Lussier, 1990). Le RbCV est souvent présent conjointement à des rotavirus dans le tractus digestif de lapins d'élevage. Son rôle en tant que pathogène primaire est donc difficile à établir lors de pathologies digestives en élevage mais, face à la séroprévalence de ce virus (100% des exploitations et 3 à 40% des animaux), la possibilité d'infections subcliniques et un

Introduction

rôle en tant que pathogène opportuniste sont fort probables (Descoteaux et Lussier, 1990; Cerioli et Lavazza, 2006).

c. AUTRES VIRUS

Parmi les autres familles de virus présents dans le tractus digestif du lapin, le parvovirus est à signaler (Metcalf *et al.*, 1989). Des signes de léthargie et dysorexie sont décrits lors d'inoculation (Matsunaga et Chino, 1981) mais la présence de parvovirose clinique dans les élevages n'est pas établie (Cerioli et Lavazza, 2006). En plus des autres virus isolés dans l'étude de Cerioli et Lavazza (Entérovirus, Adénovirus, Calicivirus et Réovirus) et dont l'isolation semble anecdotique, il faut ajouter les picobirnavirus détectés par Lubert et collaborateurs (1995) chez 10% des lapins mais sans aucun signe clinique associé.

En conclusion, le rôle des infections virales dans l'étiologie des pathologies digestives chez les lapins est encore peu connu mais ils pourraient jouer un rôle important en tant que facteurs favorisant les infections bactériennes.

3. BACTÉRIENNES

La flore digestive du lapin est essentiellement constituée de bactéries Gram positives anaérobies (Monteils *et al.*, 2008). Elles jouent un rôle essentiel dans la digestion microbienne caecale. L'équilibre de cette flore peut être rompu, entraînant des diarrhées, par les facteurs décrits plus haut à savoir l'alimentation, les traitements aux antibiotiques (Abecia *et al.*, 2007) et sans doute le stress et les virus entériques. En plus des déséquilibres de la flore digestive (dysbactériose), certaines espèces bactériennes sont considérées comme des agents pathogènes primaires.

a. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli est l'espèce la plus souvent identifiée lors de pathologies digestives (Sraka et Boucher, 2009). Pourtant, la flore digestive du lapin est pauvre en colibacilles, 10^2 à 10^5 d'unités formant colonie (UFC) par gramme (Marlier *et al.*, 2003; Licois et Marlier, 2008) alors que celle des ruminants par exemple en compte entre 10^6 et 10^8 (Callaway *et al.*, 2009). Les souches d'*Escherichia coli* sont classées en fonction de leur sérovar (antigène O et H) ainsi que leur pathovar (EHEC, EPEC, ETEC,...) (Boullier et Milon, 2006). Les *E. coli* pathogènes du lapin connus à ce jour appartiennent uniquement au pathovar EPEC (Pohl *et al.*, 1993; Licois, 2004) même si de nombreux sérovares sont présents. Un même sérovar peut être hautement pathogène ou pathogène opportuniste. Des tests de fermentation de différents sucres (donnant un biotype) peuvent être réalisés pour identifier les souches pathogènes et la mobilité de la souche est également une caractéristique pour classer les *E. coli* entéropathogènes du lapin (Peeters *et al.*, 1988; Pohl *et al.*, 1993).

Dans les élevages, les lapins adultes sont porteurs asymptomatiques des différentes souches (Boullier et Milon, 2006) et constituent le réservoir de l'infection. Certaines souches sont essentiellement pathogènes pour les lapereaux sous la mère (même avant l'âge de 15 jours) comme par exemple des souches O109:H2:K- qui peuvent entraîner jusqu'à 100% de mortalité (Boullier et Milon, 2006). D'autres souches sont pathogènes pour les lapins à l'engraissement telles que O15:H- en Belgique et Hollande ou O103:H2:K- rhamnose négatif en France, Italie et Espagne (Licois et Marlier, 2008). Les colibacillooses (infection intestinale par des souches pathogènes) entraînent des diarrhées et la mort. Les lésions observées lors des autopsies sont un contenu intestinal liquide ou

hémorragique, des parois intestinales d'épaisseur diminuée avec des zones d'hémorragie et une muqueuse congestive (Boullier et Milon, 2006). D'autre part, comme signalé plus haut, des diarrhées et entérites sont également décrites lors de colidysbactériose c'est-à-dire lors d'une augmentation de la flore colibacillaire à 10^8 - 10^9 UFC/g en absence de souche pathogène (Licois et Marlier, 2008).

b. CLOSTRIDIUM SPIROFORME

Clostridium spiroforme est présent de manière physiologique dans le caecum des lapins sains. Certains antibiotiques ou un déséquilibre alimentaire favorisent le développement de cette espèce et la production de sa toxine *iota-like* (Licois et Marlier, 2008). Cette dernière cause une destruction et desquamation des cellules épithéliales et entraîne une typhlite hémorragique avec un contenu caecal fortement liquide (Marlier *et al.*, 2003; Licois et Marlier, 2008). Plus de 90% des souches de *Clostridium spiroforme* seraient toxigènes (Peeters *et al.*, 1986; Drigo *et al.*, 2008). *Clostridium spiroforme* est identifié comme cause primaire de diarrhée dans 10% des cas (Boucher et Nouaille, 2002).

c. CLOSTRIDIUM PILIFORME

Clostridium piliforme est l'agent de la maladie de Tyzzer qui est décrite chez le lapin (Licois, 1986) et de nombreuses espèces comme par exemple le poulain (Durham, 2008), l'agneau (Scholes et Edwards, 2009) ou les rongeurs (Riley et Franklin, 1997) mais également le panda roux (Langan *et al.*, 2000) ou les tamarins (Sasseville *et al.*, 2007). En cuniculture, les épisodes de Tyzzer sont rares mais peuvent être économiquement préoccupants (Le Normand *et al.*, 2005; Licois et Marlier, 2008). Deux formes de la maladie sont décrites : chronique et aiguë. La forme chronique se traduit par des pertes de poids et un mauvais état général tandis que la forme aiguë se traduit par des diarrhées (principalement lors du sevrage), une typhlite aiguë pseudomembraneuse avec un œdème de la paroi ainsi que par des foyers nécrotiques dans le foie et parfois dans le myocarde (Marlier *et al.*, 2003).

d. AUTRES BACTÉRIES

Clostridium perfringens est souvent identifié lors d'épisodes d'entéropathie épizootique du lapin (EEL) mais ne semble pas être l'agent étiologique de cette pathologie. En revanche, il joue certainement un rôle de compliquant dans la dysbactériose liée à l'EEL (Dewree *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006).

Enfin, d'autres espèces peuvent être rencontrées lors de pathologies digestives : *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Yersinia enterocolitica*, *Lawsonia intracellularis*, *Haemophilus paracuniculus* et *Salmonella enterica* (Marlier *et al.*, 2003; Sraka et Boucher, 2009). Cette dernière espèce n'était que peu voire pas isolée de lapins jusqu'à ces dernières années. Elle représentait en 2008, 1,3% des espèces bactériennes isolées lors de pathologies digestives dans un centre de référence français (Sraka et Boucher, 2009). Néanmoins, le rôle pathogène de *Salmonella enterica* reste controversé et n'a à ce jour pas été démontré.

4. PARASITAIRES

a. EIMERIA SP.

Parmi les différents parasites intestinaux, les plus répandus en élevage cunicole sont les *Eimeria*, parasites responsables de la coccidiose (Licois et Marlier, 2008). Il existe 10 espèces d'*Eimeria* à tropisme digestif spécifiques au lapin. Elles sont classées en quatre catégories : les apathogènes (*E. coecicola*), les légèrement pathogènes (*E. perforans*, *E. vedjovskyi* et *E. exigua*), les pathogènes (*E. irresidua*, *E. magna*, *E. media* et *E. piriformis*) et les hautement pathogènes (*E. flavescens* et *E. intestinalis*) (Lebas *et al.*, 1997). Chaque espèce a un tropisme particulier pour une zone de l'intestin (Marlier *et al.*, 2003). Les signes de coccidioses sont essentiellement des diarrhées tandis que les lésions sont un aspect segmenté des anses intestinales avec congestion et de l'œdème de la paroi (Licois et Marlier, 2008). En plus de ces espèces à tropisme intestinal, il faut ajouter *E. stiedae*, une espèce à tropisme hépatique qui cause surtout des pertes économique lors de saisies des foies infectés à l'abattoir (Lebas *et al.*, 1997).

b. AUTRES PARASITES

La levure *Cyniclomyces guttulatus* (ou *Saccharomycopsis guttulatus*) appartient à la flore intestinale physiologique du lapin (James *et al.*, 1998). Néanmoins, son développement excessif dû à des traitements antibiotiques par exemple pourrait induire des diarrhées (Hage, 1952; Hersey-Benner, 2008).

D'autres parasites du tractus digestif peuvent être isolés (*Cryptosporidium* spp, *Lambliia intestinalis*, *Passalurus ambiguus*, *Trichostrongylus retortaeformis*, *Trichostrongylus axei* et *Graphidium strigosum*) mais ne sont pas considérés comme pathogènes primaires. De plus, ils sont anecdotiques ou n'induisent pas de diarrhée dans les élevages respectant les règles d'hygiène de base (Marlier *et al.*, 2003).

5. D'ORIGINE INCONNUE

L'entérite mucoïde ou entéropathie mucoïde (EM) est décrite depuis 1929 (van Kruiningen et Williams, 1972). Cette pathologie se traduit par une stase caecale et une production importante de mucus dans le caecum et le colon essentiellement chez les lapins de 7 à 10 semaines. Les mortalités peuvent être importantes (Marlier *et al.*, 2003). L'agent ou les agents responsables n'ont pas été clairement identifié (s) mais l'EM est reproduite par ligature du caecum (Toofanian et Targowski, 1983). L'aflatoxine B₁ serait un facteur favorisant (Mogollon G *et al.*, 1981) mais n'est pas indispensable au développement de la pathologie (McLeod et Katz, 1986). L'injection préventive d'antibiotique pendant une reproduction expérimentale diminue les signes cliniques et les mortalités (Toofanian et Targowski, 1983). Différents agents ont été détectés lors d'EM (*Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*) mais leur inoculation n'a jamais permis de reproduire la pathologie (McLeod et Katz, 1986). L'EM a été décrite de manière sporadique en Amérique (Marlier *et al.*, 2003), en Inde (Rai et Ahlawat, 1993), au Kenya (Njiro *et al.*, 1988), en Italie (Marcato et Sja'Ban, 1967), en Hongrie (Vetesi et Kutas, 1974) et en Angleterre (Pout, 1971). L'absence de dilatation de l'estomac permet de différencier l'EM de l'EEL (Marlier *et al.*, 2003). Cette dernière est la seconde pathologie digestive d'origine inconnue en cuniculture.

III. L'ENTEROPATHIE EPIZOOTIQUE DU LAPIN

1. APPARITION DE LA PATHOLOGIE

Au début de l'année 1997, une nouvelle pathologie est apparue dans les élevages français (Duval, 1998) et espagnols (Guitan *et al.*, 2000) avant de s'étendre de manière épizootique dans toute la France (Duval, 1998) ainsi qu'en Belgique (Marlier et Vindevogel, 1998). Les signes retenus pour l'étude de l'évolution de l'épizootie sont : ballonnements précédés d'une sous-consommation alimentaire, contenu caecal liquide, diarrhée d'intensité variable et mortalité brutale (Duval, 1998). Les premières exploitations touchées ayant été livrées par la même firme d'aliments, une intoxication ou un déséquilibre alimentaire ont été retenus comme premières hypothèses étiologiques avant d'être réfutés rapidement (Lebas, 1998). L'aliment pourrait cependant avoir eu un rôle de vecteur de la pathologie dans l'épidémie (Lebas, 1998). Face au développement épizootique du syndrome, les acteurs de la filière suspectent alors une étiologie infectieuse, confirmée par la reproduction de la maladie par diverses inoculations (Le Gall *et al.*, 1998; Licois, 1998). L'hypothèse virale est celle retenue durant les premières années de recherche sur base des aspects épidémiologiques de l'EEL (Licois, 1998). Le nom d'entéocolite épizootique du lapin est erronément donné en premier à la pathologie (Lebas, 1998) mais plus tard le nom d'entéropathie épizootique du lapin est retenu pour insister sur la caractéristique lésionnelle majeure de l'EEL, à savoir l'absence de lésions inflammatoires lorsqu'aucun compliquant secondaire n'est présent (Licois et Coudert, 2001). Les termes « entéocolite » ou « entéocolite mucoïde » ont aussi été employés à tort pour décrire des cas d'EEL (Guitan *et al.*, 2000; Jones et Duff, 2001).

2. SIGNES CLINIQUES ET LÉSIONS

L'EEL touche essentiellement les animaux d'élevage entre la 6^{ème} et 14^{ème} semaine (Licois *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006). Elle peut également affecter les adultes (Licois *et al.*, 2000) ou les lapereaux à partir de 12 jours (Boisot *et al.*, 2005). Contrairement aux autres pathologies du lapin, les animaux sauvages en milieu naturel ne semblent pas souffrir d'EEL, bien que des exploitations de lapins sauvages aient été touchées (Licois *et al.*, 2000). Des élevages d'animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) ont également été infectés par l'EEL (Vandekerchove *et al.*, 2001). Les signes cliniques sont peu spécifiques : diminution de la consommation d'eau et de nourriture, ballonnement et parfois faible diarrhée ou émission de mucus (Licois *et al.*, 2006). Les lésions sont assez caractéristiques : dilatation du tractus digestif y compris de l'estomac sans aucun signe inflammatoire (Licois *et al.*, 2005; Licois *et al.*, 2006; Marlier *et al.*, 2006). D'autres lésions ont été décrites de manière variable : impaction caecale ou contenu caecal liquide et gazeux (Licois *et al.*, 2006) et présence de mucus dans le tractus antérieur et/ou postérieur (Licois *et al.*, 2000). Des pneumonies ont été associées à l'EEL (Le Gall *et al.*, 1998; Licois *et al.*, 2000) mais ne semblent au final pas être liées à la pathologie (Licois *et al.*, 2006). Les taux de mortalité renseignés en début d'épidémie étaient très élevés (jusque 80%) (Duval, 1998) mais ils ont fortement diminué aujourd'hui. Néanmoins, un effet synergique entre l(es) agent(s) étiologique(s) de l'entéropathie épizootique et d'autres pathogènes digestifs comme *Eimeria* spp. (Coudert *et al.*, 2000; Coudert, 2003) ou les *E. coli* entéropathogènes (Barral *et al.*, 2000) peut toujours se traduire par de sévères mortalités.

3. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE

Rapidement après l'apparition de l'EEL, des reproductions expérimentales de la maladie ont pu être obtenues mais sans grande répétabilité ni reproductibilité (Le Gall *et al.*, 1998; Licois, 1998; Licois *et al.*, 1998). Différents inoculums ont été utilisés : des aliments contaminés, des contenus intestinaux de lapins malades, des broyats de différents organes, des filtrats de contenus digestifs et du sang d'animaux malades (Le Gall *et al.*, 1998; Licois, 1998). Seuls les aliments contaminés et le contenu digestif ont permis de reproduire la pathologie. Des immunosuppresseurs ont été utilisés avec succès pour obtenir des mortalités plus élevées (Licois *et al.*, 1998). En effet, les reproductions sur lapins EOPS n'induisent pas des taux de mortalité aussi élevés que ceux observés sur le terrain (Licois *et al.*, 1998; Licois *et al.*, 2005). Cette utilisation d'immunosuppresseurs pour favoriser l'intensité de signes cliniques et augmenter les taux de mortalité lors des reproductions expérimentales ne s'est pas généralisée par la suite. En effet, outre la lourdeur des protocoles expérimentaux globaux, il a été rapidement démontré que l'étude cinétique de l'évolution des gains quotidiens moyens (GQM) avec une chute caractéristique des GQM associée à l'identification de lésions typiques d'EEL (dilatation du tractus digestif antérieur sans signe d'inflammation) sur des animaux morts spontanément ou sacrifiés durant l'expérience étaient des signes cliniques suffisants pour confirmer la bonne reproduction expérimentale de l'EEL (Licois *et al.*, 2005).

Suite aux difficultés rencontrées durant les inoculations expérimentales (évaluation de la dose infectante, mortalités variables,...), un inoculum de référence a été développé. Ce premier inoculum dénommé TEC1, était composé de contenus caecaux de lapins malades inoculés avec un échantillon de terrain appelé TEC car fourni par la firme d'alimentation TECHNA (Licois et Coudert, 2001). Le TEC1 a permis d'obtenir les générations suivantes d'inoculum de référence à savoir TEC2 (Licois et Coudert, 2001), TEC3 (Licois *et al.*, 2003; Coudert et Licois, 2005) et TEC4 (Licois et Coudert, 2005). Grâce à ces inoculums, non seulement les signes cliniques d'EEL sont reproduits mais l'évolution des gains quotidiens moyens, la morbidité et la mortalité sont reproduites de façon répétable (Licois et Coudert, 2001; Licois *et al.*, 2005). Le signe clinique le plus fiable lors de reproduction de l'EEL sur des lapins EOPS inoculés avec un TEC est une chute de GQM dès le second jour après inoculation et se maintenant jusqu'au septième jour. Les morbidités et mortalités généralement observées sont respectivement de 90 à 100% et de 20 à 50% (Licois *et al.*, 2005). En terme de composition, les inoculums TEC sont exempts d'organisme pathogènes spécifiques (*Eimeria* spp., *Passalurus ambiguus*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium spiroforme* et *Escherichia coli* EPEC des sérogroupes O2, O15, O26, O49, O85, O103, O109, O128 et O132) et ne contiennent pas d'*Escherichia coli* (Licois et Coudert, 2001; Licois *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont été réalisées grâce aux générations successives d'inoculums TEC. Ces travaux ont porté sur l'étiologie de l'EEL (Marlier *et al.*, 2003; Coudert et Licois, 2005; Persillon *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006; Licois, 2007), les traitements (Boisot *et al.*, 2003) ou la contagion (Boisot *et al.*, 2005). Plus tard, le TEC3 a été fractionné grâce à une centrifugation sur gradient discontinu de sucrose donnant sept fractions dont les plus denses (30%, 40% ; 50% et culot) contiennent l'agent ou les agents en quantité suffisante pour reproduire l'EEL (Szalo *et al.*, 2007). D'autres inoculums, moins virulents, ont été créés à partir d'échantillons de terrain belges et hollandais (Licois *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006).

4. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Les exploitations n'utilisant aucun traitement antibiotique enregistrent des mortalités d'environ 30% lorsque l'EEL s'exprime cliniquement dans la ferme (Macchioni *et al.*, 2000). L'antibiotique avec lequel les résultats thérapeutiques cliniques les plus probants ont été obtenus est la bacitracine-Zn par voie orale dans l'eau de boisson (Boisot *et al.*, 2004; Maertens *et al.*, 2005) ou dans l'aliment (Richard *et al.*, 2000; Duperray *et al.*, 2003). Une administration préventive de bacitracine semble aussi efficace qu'un traitement curatif de 14 jours (Boisot *et al.*, 2004). D'autres antibiotiques ont également été efficaces notamment l'administration par voie orale de tylosine, seule ou en association avec l'apramycine (Bostvironnois et Morel Saives, 2003). L'administration par voie orale de cette dernière molécule semble également limiter les mortalités lors d'EEL. (Badiola *et al.*, 2000). La tiamuline a également été utilisée avec ou sans immunostimulant (Macrogard®) pour réduire significativement la mortalité (Coudert *et al.*, 2000).

Quel que soit le traitement administré, dans la plupart des cas, les mortalités reprennent une semaine après l'arrêt du traitement (Coudert *et al.*, 2000). D'autres solutions préventives et thérapeutiques, basées notamment sur des modifications de la composition de l'aliment, ont été recherchées pour lutter contre l'EEL. Par exemple, une restriction alimentaire atteignant au moins 20% de la consommation *ad libitum* permet de réduire sensiblement la mortalité et la morbidité lors d'une reproduction expérimentale d'EEL (Boisot *et al.*, 2003). Par contre, une tentative d'augmentation des NDF (fibres faiblement digestibles) ne semble pas réduire significativement la mortalité (Romero *et al.*, 2009). Un effet positif sur les mortalités en cas d'EEL a été observé avec un supplément de L-glutamine mais aucun effet n'a été observé avec un supplément en L-arginine (Chamorro *et al.*, 2007). Enfin, des résultats mitigés ont été obtenus par Maertens et Struklec (2006) concernant l'adjonction de tanins dans la ration pour diminuer les mortalités liées à l'EEL.

L'identification des facteurs de risques d'expression aiguë d'EEL en élevage a été réalisée sur base de différentes enquêtes épidémiologiques rétrospectives (Jacquinet *et al.*, 2001; Larour *et al.*, 2004; Bouquin *et al.*, 2009). L'EEL est plus fréquente dans les élevages au sein desquels un transport des lapereaux au sevrage est effectué, un sevrage à plus de 35 jours a lieu, un mélange des portées est réalisé, les taux de mortalité au nid sont élevés, la technique de gestion par bande unique n'est pas utilisée et, globalement, ceux dont les mesures de biosécurité sont défailtantes. A contrario, une densité faible, un aliment adapté aux besoins des lapereaux en maternité et un rationnement alimentaire en engraissement contribuent à limiter l'expression de l'EEL (Jacquinet *et al.*, 2001; Larour *et al.*, 2004; Bouquin *et al.*, 2009). Ces différents facteurs de risques ont été rapidement maîtrisés par de nombreux éleveurs et les mortalités les plus sévères liées à l'EEL étaient contrôlées environ 2 ans après le début de l'épidémie en France (Licois *et al.*, 2000).

5. ETIOLOGIE

La première hypothèse étiologique retenue était un agent viral. Les arguments avancés étaient l'évolution rapide de l'épidémie, l'absence d'effet curatif à long terme des traitements antibiotiques et l'absence de lésions inflammatoires généralement systématiques lors d'infection bactérienne chez le lapin (Licois, 1998; Licois *et al.*, 2006). Une fois le premier inoculum de référence mis au point, des inoculations de filtrat (0,2µm) ont été réalisées sans succès pour démontrer la cause virale (Licois, 1998). La présence de virus a été recherchée dans le TEC et des prélèvements de terrains par microscopie (Vandekerchove *et al.*, 2001), PCR (Céré *et al.*, 2000; Licois *et al.*, 2005) et

ELISA commerciaux (Marlier *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006; Szalo *et al.*, 2007). D'après ces différentes études, seuls des rotavirus sont présents dans les différents TEC (Licois *et al.*, 2005; Szalo *et al.*, 2007) et dans les prélèvements de terrain (Céré *et al.*, 2000; Vandekerchove *et al.*, 2001; Marlier *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006). Bien que des rotavirus soient présents dans les TEC, ils ne sont pas présents dans les fractions obtenues par Szalo *et al.* (2007) qui reproduisent l'EEL. De plus, des tentatives d'inoculation avec des rotavirus isolés sur le terrain n'ont pas permis de reproduire la pathologie (Licois *et al.*, 2006). L'hypothèse virale a donc été abandonnée par la plupart des équipes de recherche.

La seconde hypothèse, qui est toujours d'actualité aujourd'hui, est une étiologie bactérienne (Licois *et al.*, 2006; Marlier *et al.*, 2006; Szalo *et al.*, 2007). Des souches d'*E. coli* sont régulièrement identifiées lors d'EEL clinique (Barral *et al.*, 2000) mais ne jouent aucun rôle dans l'étiologie de la pathologie. En effet, aucun biotype ou séovar ne prédomine dans les souches isolées et aucun cas clinique ne présente de coli(dys)bactériose (Marlier *et al.*, 2006). De plus, les TEC qui reproduisent l'EEL ne contiennent pas d'*E. coli* (Licois et Coudert, 2001; Licois *et al.*, 2005). De même, *Clostridium spiroforme* n'a jamais été détecté dans les TEC (Licois *et al.*, 2006). Par contre, *Clostridium perfringens* est régulièrement isolé aussi bien des TEC (Licois *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2003) que des prélèvements de terrain (Dewree *et al.*, 2003; Le Normand *et al.*, 2003). De plus, une similitude existe entre les signes d'entérotoxémie et d'EEL (Licois *et al.*, 2006) et une population caecale riche en *Clostridium perfringens* semble être un indicateur d'EEL (Romero *et al.*, 2009). De nouveau, cette espèce bactérienne n'est pas retrouvée dans tous les cas d'EEL. De plus, aucune des inoculations réalisées à partir de *Clostridium perfringens* n'a permis la reproduction des signes cliniques d'EEL (Barral *et al.*, 2000; Dewree *et al.*, 2003; Le Normand *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006). La présence d'impaction caecale lors d'EEL semble cependant liée à la présence de *Clostridium perfringens* toxinotype $\alpha\beta 2$ tandis qu'un contenu liquide du caecum lors d'EEL est lié au *Clostridium perfringens* toxinotype α (Le Normand *et al.*, 2003). Aucune inoculation réalisée à base de souches bactériennes pures ou en mélange, cultivées à partir des TEC ou d'échantillons de terrain n'a permis la reproduction de signes d'EEL (Licois *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006). L'agent résiste à plusieurs congélations et décongélations à -20°C , au traitement chloroforme/éthanol mais est sensible à un traitement à 80°C (Licois *et al.*, 2006). Sur base des résultats obtenus par Szalo *et al.* (2007), il est très probable qu'il s'agisse d'une bactérie bacillaire.

D'autres études ont été réalisées sur la présence de phages dans TEC3 mais sans résultats (Persillon *et al.*, 2005). De plus, des tentatives de reproduction de l'EEL grâce à des phages isolés sur le terrain n'ont pas non plus donné de résultats (Licois *et al.*, 2006). A ce jour, aucune étude n'a porté sur un rôle éventuel d'éléments génétiques mobiles (plasmide, transposon) transportant les gènes de virulences entre espèces bactériennes présentes dans les TEC ou lors de cas d'EEL sur le terrain.

6. PHASE PRÉCOCE ET TOXINE

Une phase précoce suraigüe a été mise en évidence lors de reproduction expérimentale. Cette phase précoce se traduit chez des lapins EOPS par une chute brutale de croissance pondérale dès la 24^{ème} heure après l'inoculation de TEC (Coudert et Licois, 2005; Coudert et Licois, 2005). Elle est reproduite par inoculation orale du filtrat de TEC3 obtenu après passage au travers d'un filtre à $0,45\mu\text{m}$ (Marlier *et al.*, 2003); de TEC3 chauffé 10min à 45°C (Marlier *et al.*, 2003; Coudert et Licois, 2005); de surnageant de centrifugation du TEC3 sur gradient de sucrose (Szalo *et al.*, 2007) et de

surnageant d'une centrifugation de 2h à 8000g du TEC4 (Licois, 2007). L'injection intraveineuse de ce dernier surnageant permet également de reproduire une chute du GQM (Licois, 2007). Une protéine de 75kDa présente dans ce surnageant est spécifique au TEC mais l'injection des protéines supérieures à 3kDa du surnageant n'entraîne pas de chute de GQM (Licois, communication personnelle). Comme suspecté depuis plusieurs années, une toxine joue un rôle dans l'étiopathologie de l'EEL (Marlier *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2006; Licois, 2007; Szalo *et al.*, 2007). Cependant, la toxine seule ne reproduit pas les signes cliniques et lésions de l'EEL, même en inoculations quotidiennes répétées (Licois, communication personnelle). A l'inverse, l'administration conjointe de filtrat de TEC3 obtenu après passage au travers d'un filtre à 0,45µm et du retentât obtenu lors de cette filtration permet une reproduction totale de l'EEL, l'administration du retentât seul ayant pour effet de limiter la phase précoce de la maladie (Marlier *et al.*, 2003)

7. AUTRES RECHERCHES

Des analyses histologiques ont été réalisées par microscopie photonique sur des prélèvements de tractus digestif d'animaux de terrain morts d'EEL (Jobert *et al.*, 2001) et d'animaux EOPS infectés (Marlier *et al.*, 2003; Licois *et al.*, 2005; Xylouri *et al.*, 2008). Des lésions ont été identifiées de manière irrégulière et peu spécifique : infiltration de la *lamina propria* du tractus intestinal par des leucocytes, éosinophiles et/ou des monocytes ainsi que des atrophies et fusions des villosités. Les analyses par microscopie électronique (à balayage et en transmission) sur des prélèvements de tractus digestifs d'animaux EOPS infectés ont mis en évidence une production importante de mucus, ainsi que la présence de nombreuses bactéries adhérentes à la muqueuse intestinale, intercellulaires et certaines intracellulaires (Dewrée *et al.*, 2007).

Des changements peu spécifiques des paramètres sanguins durant des reproductions expérimentales d'EEL ont été mis en évidence : augmentation des leucocytes totaux, essentiellement des neutrophiles et diminution des lymphocytes et des globules rouges. Ces modifications peuvent correspondre à une infection bactérienne primaire ou secondaire à la présence de l'EEL (Jobert *et al.*, 2001; Marlier *et al.*, 2003; Dewrée *et al.*, 2007; Xylouri *et al.*, 2008).

Une immunisation après infection a été décrite par Boisot (2005), de même qu'une transmission d'immunité de la mère aux jeunes. Les lapereaux semblent être immunisés durant les deux premières semaines post sevrage, peu importe l'âge auquel celui-ci a lieu (Macchioni *et al.*, 2000).

Rochambeau *et al.* (2006) ont démontré une corrélation entre les animaux résistants à l'EEL et leur origine génétique. Bien que ce lien statistique ait été confirmé par Garreau *et al.* (2006), l'héritabilité de cette résistance semble très faible.

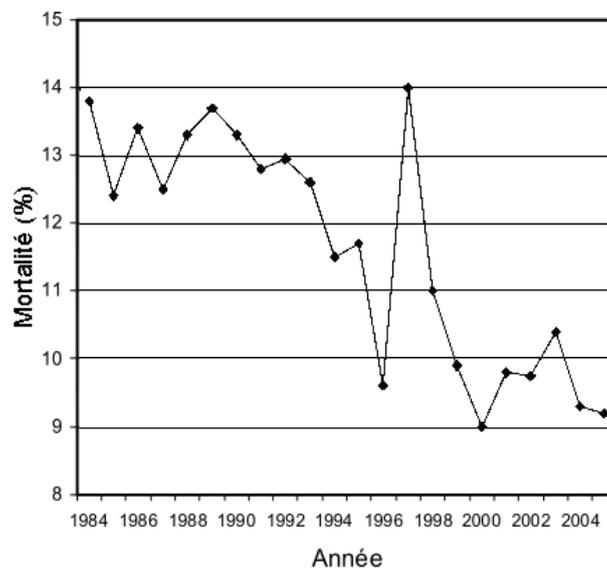
8. EVOLUTION DE L'ÉPIDÉMIE

En plus de la France et de l'Espagne qui ont été les premiers pays touchés (Duval, 1998; Guitan *et al.*, 2000), l'épidémie d'EEL est présente actuellement dans quelques pays d'Europe : Belgique (Marlier et Vindevogel, 1998), Angleterre (Jones et Duff, 2001), Pays-Bas (Marlier *et al.*, 2003), Grèce (Xylouri et Fragkiadakis, 2006), Italie, Portugal et Hongrie (Licois *et al.*, 2006). De plus, l'épidémie semble toucher d'autres continents comme l'Afrique du Nord (Licois *et al.*, 2006), et peut-être le Mexique (Rodriguez-De Lara *et al.*, 2008).

Introduction

Au pic de l'épidémie, 95% des exploitations étaient touchées en France (Duval, 1998; Licois *et al.*, 2006). L'EEL est toujours présente en France mais les mortalités sont contrôlées depuis 1999 (figure 1) (Licois *et al.*, 2000). Aux Pays-Bas, certains élevages touchés actuellement par l'EEL enregistrent des taux de mortalité compromettant l'équilibre économique de l'exploitation (Marlier, communication personnelle). Neuf exploitations belges sur dix seraient encore touchées par l'EEL aujourd'hui mais les mortalités seraient surtout liées aux infections bactériennes ou parasitaires secondaires (De Hertefelt, communication personnelle). Entre janvier 2008 et décembre 2009, 176 autopsies ont été réalisées à la Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes sur des lapins d'élevage (belges et hollandais). La majorité (122) était présentée pour troubles digestifs. Quarante-six lapins (26%) présentaient des signes d'entéropathie épizootique (données non publiées) démontrant une prévalence importante de l'EEL dans les élevages belges et hollandais.

FIGURE 1: EVOLUTION DES TAUX DE MORTALITE POST SEVRAGE EN FRANCE DE 1984 A 2004



(Maertens, 2008)

IV. L'ANALYSE DES POPULATIONS BACTERIENNES COMPLEXES PAR DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. POURQUOI LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ?

Après 10 ans de recherche sur l'entéropathie épizootique du lapin, l'hypothèse étiologique la plus probable est celle d'un ou plusieurs agents bactériens. Malheureusement, les techniques de bactériologie classique n'ont pas permis d'identifier ces souches (Licois *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006; Licois, 2007; Szalo *et al.*, 2007). D'autres approches devaient donc être envisagées.

Seulement 20 à 40% des espèces présentes dans le tractus digestif sont identifiables par des méthodes traditionnelles (Macfarlane et Macfarlane, 2004; Suchodolski *et al.*, 2004). L'agent ou les agents responsables de l'EEL sont très certainement non cultivables tout comme par exemple *Treponema pallidum* ou *Mycobacterium leprae*, agents responsables de la syphilis humaine et de la lèpre (Siqueira et Rocas, 2005). Une étude par techniques de biologie moléculaire de la flore digestive du lapin sain, du lapin malade d'EEL et des TEC semble être une alternative intéressante aux cultures traditionnelles pour identifier l'agent ou les agents responsables de l'EEL.

Certains travaux ont déjà été réalisés dans ce sens (Badiola *et al.*, 2005; Persillon *et al.*, 2005) tandis que d'autres analyses biomoléculaires ont été réalisées sur les toxines présentes dans le surnageant du TEC (Licois, 2007). L'étude des ADN bactériens présents dans les TEC nous semblait donc la méthode la plus appropriée pour identifier le ou les agents étiologiques.

2. ARTICLE DE SYNTHÈSE

L'article de synthèse : « Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des population bactériennes complexes » présenté ci-après donne un aperçu des techniques les plus communément employées dans l'étude des populations bactériennes ainsi que les points importants à considérer avant de choisir la ou les techniques les plus appropriées.

Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes

HUYBENS N.¹, MAINIL J.² ET MARLIER D.¹

¹ Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes, Département clinique des Animaux de compagnies et des Équidés, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

² Secteur de bactériologie, Département des Maladies infectieuses, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr N. Huybens Email : nathalie.huybens@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Aujourd'hui, il est certain que les techniques de culture bactérienne traditionnelles ne suffisent pas pour étudier les populations bactériennes complexes. Depuis une vingtaine d'années, une quantité importante d'études ont démontré que la plupart des espèces ne sont pas cultivables sur des milieux traditionnels et dans un même temps, ont approuvé l'utilisation de la biologie moléculaire pour l'étude de ces populations complexes, qu'elles soient digestives, aquatiques, des sols... Ces techniques sont nombreuses mais comprennent en général un canevas semblable. Tout d'abord, l'ADN doit être extrait, puis amplifié, parfois traité et enfin visualisé ou séquencé. Cette revue donne un aperçu des techniques les plus communément employées dans l'étude des populations ainsi que les points importants à considérer avant de choisir la ou les techniques les plus appropriées.

1. INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, les populations bactériennes sont fréquemment étudiées par des techniques de biologie moléculaire. En effet, l'étude des populations par isolement de bactéries sur milieux de culture ne permet la mise en évidence que d'une très faible proportion des espèces bactériennes présentes (Nocker *et al.*, 2007). Par exemple, seulement 0,01 à 0,1 % des cellules bactériennes océaniques permettent d'obtenir une colonie sur des milieux de laboratoire (Connon et Giovannoni, 2002 ; Sharkey *et al.*, 2004) ; un gramme de sol contient 10^{16} bactéries dont seulement 0,1 % à 1 % peuvent être cultivées (Torsvik *et al.*, 1998 ; Kirk *et al.*, 2004) et parmi les 10^{12} bactéries contenues dans un gramme de matières fécales seulement 20 % à 40 % peuvent être cultivées (Macfarlane *et al.*, 2004 ; Suchodolski *et al.*, 2004). En outre, les bactéries isolées sur milieux de culture subis-

sent une pression de sélection forte de la part des espèces à grande vitesse de réplication et des nutriments présents en trop grande ou trop faible quantité (Nocker *et al.*, 2007).

D'après Cases et de Lorenzo (2002), seuls 0,5 à 10 % de toutes les espèces bactériennes existantes ont été identifiés, un grand nombre d'espèces n'étant connu que par une séquence génomique. Par ailleurs, certaines bactéries identifiées depuis des décennies ne sont toujours pas cultivables comme *Treponema pallidum*, bactérie responsable de la syphilis, identifiée depuis 1905 ou *Mycobacterium leprae*, responsable de la lèpre et identifiée depuis 1893 (Siqueira et Roca, 2005).

Norman Pace et collaborateurs (Lane *et al.*, 1985 ; Stahl *et al.*, 1985 ; Olsen *et al.*, 1986) sont les premiers à avoir appliqué les techniques de biologie moléculaire à l'étude de la biodiversité. Récemment, les techniques d'amplification et d'étude de l'ADN

des populations bactériennes ont fait l'objet de nombreuses publications dans des domaines très variés, de la recherche fondamentale des populations aquatiques (Dorigo, 2005) ou du sol (Brim *et al.*, 1999) à la fabrication du vin (Gonzalez *et al.*, 2005) en passant par l'étude des bioréacteurs en écologie (Manz, 1994 ; Wang *et al.*, 2007) ou de la flore digestive humaine physiologique (Macfarlane *et al.*, 2004 ; Bezirtzoglou *et al.*, 2006 ; Gueimonde *et al.*, 2007) ou pathologique (Hertogh *et al.*, 2006). Ces techniques sont également utilisées dans des domaines vétérinaires tels que l'étude des flores digestives (Abecia *et al.*, 2005 ; Michelland *et al.*, 2008) ou le contrôle sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale (Brennan *et al.*, 2002).

Il existe un grand nombre de techniques, permettant l'étude moléculaire d'une population bactérienne. Ces outils peuvent servir pour comparer,

caractériser des populations ou mettre en évidence certains genres, espèces ou souches dans un échantillon. Cet article expose une série de techniques fréquemment employées dans l'étude des populations bactériennes.

2. EXTRACTION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Avant toute chose, l'ADN bactérien doit être extrait de la matrice de départ. Les méthodes d'extraction les plus utilisées sont appelées à trois étapes : une lyse par un détergent, une incubation avec une protéase et la précipitation des acides nucléiques (Meade *et al.*, 1982). La technique d'extraction d'ADN bactérien la plus simple est un traitement thermique. Les cultures bactériennes sont plongées pendant 5 minutes dans un bain marie à 96°C. Cette technique suffit pour extraire l'ADN des cellules mais n'élimine pas les composés inhibiteurs des réactions d'amplification ; elle convient donc très bien pour des cultures pures mais pas pour des échantillons de terrains (Sweeney *et al.*, 2006). En plus des différents protocoles mis au point, il existe des kits commerciaux pour l'extraction d'ADN. Deux techniques sont communément employées : le passage sur colonnes de silice (Boom *et al.*, 2000) ou l'utilisation de billes magnétiques (Alderton *et al.*, 1992). Dans les deux cas, le principe est le même, l'ADN est lié à la membrane de la colonne ou aux billes magnétiques et l'échantillon est débarrassé des différents contaminants. Ensuite, l'ADN est séparé de son support.

Ces différentes méthodes permettent l'extraction d'une quantité et d'une qualité variable d'ADN (Maarit Niemi *et al.*, 2001). Il est évident que l'ADN de toutes les espèces bactériennes, gram⁺ et gram⁻, présentes dans un échantillon ne peut être extrait avec la même efficacité (Carroll *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2007). Un premier biais existe donc dès cette étape. De nombreux articles de comparaison de méthodes d'extractions (Maarit Niemi *et al.*, 2001 ; Schuurman *et al.*, 2007 ; Whitehouse et Hottel, 2007) ont été publiés. Le premier critère est toujours de choisir la méthode d'extraction en fonction de l'origine des prélèvements. Par exemple, les matières fécales contiennent énormément d'inhibiteurs des réactions d'amplification (Duenngai *et al.*, 2008). Des

résultats très variables sont remarqués lors de tests comparatifs entre les kits commerciaux et les techniques internes aux différents laboratoires (Schuurman *et al.*, 2007 ; Duenngai *et al.*, 2008). De même, les échantillons provenant de sols contiennent également des inhibiteurs de PCR (Kirk *et al.*, 2004), en particulier l'acide humique (Dong *et al.*, 2006) et les métaux lourds (Wilson, 1997). Différents kits et techniques sont décrits et comparés dans la littérature (Maarit Niemi *et al.*, 2001 ; Kirk *et al.*, 2004 ; Dong *et al.*, 2006 ; Rosa *et al.*, 2006 ; Whitehouse et Hottel, 2007). Enfin des techniques très complexes peuvent être créées pour s'adapter au mieux à la source d'ADN. Par exemple, les prélèvements d'origine volcanique demandent un traitement particulier d'ultrasons, de broyage, congélation et décongélation. Ils ont récemment fait l'objet d'un article de synthèse (Herrera et Cockell, 2007).

D'autres éléments à prendre en compte lors du choix de la technique d'extraction est le temps nécessaire à la manipulation et le coût de revient de chaque extraction. Les techniques commerciales reviennent toujours plus cher (Zhang *et al.*, 2006) mais, à l'exception du traitement thermique, demandent moins de temps (Schuurman *et al.*, 2007).

3. AMPLIFICATION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE PAR POLYMÉRISATION EN CHAÎNE

a. Principes généraux de la polymérisation en chaîne

La quantité d'ADN récupéré lors de l'extraction est trop faible pour être considérée comme un échantillonnage représentatif. Afin de comparer ou d'étudier l'ADN extrait, celui-ci doit donc être amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette technique a été mise au point en 1986 par Mullis et collaborateurs (1986) ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1993. La PCR a révolutionné la biologie moléculaire comme peuvent le montrer les 247 920 articles publiés depuis sa découverte (PubMed, février 2009). Une vingtaine de cycles permettent de multiplier le nombre de molécules d'ADN présentes par un million (Lalam, 2006).

La PCR quantitative (*real-time* PCR ou Q-PCR) ainsi que la PCR semi-

quantitative peuvent être employées pour quantifier la présence d'une espèce ou d'une population bactérienne spécifique. Un gène cible est amplifié par Q-PCR. En connaissant le nombre de copies rencontrées dans le génome bactérien, le nombre de bactéries porteuses de ce gène présentes dans l'échantillon de départ peu alors être estimé. Le choix du gène permet de quantifier l'ensemble de la population, une famille ou une espèce bactérienne présente dans l'échantillon (Sharma *et al.*, 2007).

L'ADN est très stable dans le milieu contrairement à l'ARN. L'étude de ce dernier est donc plus intéressante si la viabilité d'une population bactérienne est l'objet des recherches (van der Vliet *et al.*, 1994). Les recherches peuvent cibler aussi bien l'ARN messager (ARNm) que ribosomal (ARNr) (Lahtinen *et al.*, 2008). La quantité et le type d'ARN présents sont relatifs à l'activité et à la croissance bactérienne (McClelland et Welsh, 1994 ; Sorensen et Teske, 2006 ; Hoshino et Matsumoto, 2007).

La *reverse transcriptase* (RT) permet la création à partir de l'ARN d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) (Freeman *et al.*, 1999) qui peut ensuite être amplifié par une PCR classique. Ces deux réactions peuvent être réalisées en une ou deux étapes (Sharkey *et al.*, 2004). La RT-PCR permet donc la comparaison de la composition, de la viabilité ou de l'activité de populations bactériennes. Récemment, Halet et collaborateurs (2006) ont étudié l'évolution de l'activité méthanotrophique d'une flore bactérienne de compost grâce à l'ARNr.

Ces amplifications ne sont pas sans conséquence sur la représentativité des espèces présentes dans l'échantillon. En effet, les effets stochastiques des premiers cycles de la PCR peuvent entraîner de grandes différences entre les séquences présentes en faible quantité dans l'échantillon (Peccoud et Jacob, 1996), tandis que l'effet plateau diminue la représentation finale des séquences présentes en grandes quantités dans l'échantillon. Ce dernier effet est expliqué notamment par le ré-appariement des deux brins entre eux lors des derniers cycles (Mathieu-Daude *et al.*, 1996). Ces biais sont présents dans toutes les études par PCR. Afin de les contourner, un nombre variable de cycles peut être comparé ou les PCR peuvent être réalisées en triple puis regroupées pour les analyses.

Enfin, les amorces utilisées lors des PCR sont aussi une source de biais. Comme l'ont démontré Yu et collaborateurs (2004), le choix des séquences étudiées et des amorces différentes utilisées pour des séquences identiques donnent des profils parfois très différents pour une même population.

b. Les polymérisation en chaîne ciblant les ARN ribosomiaux

Les PCR présentées plus haut, qu'elles soient aléatoires ou ciblant les REP, ne permettent pas toujours d'identifier l'espèce dont l'ADN a été amplifié, à l'inverse des gènes présentés dans ce chapitre, les gènes des ARN ribosomiaux. Ces derniers ont été et sont toujours fortement étudiés aussi bien en systématique que dans l'étude de populations. C'est la présence de zones très conservées et de zones hypervariables qui rend ces gènes très intéressants dans l'étude de populations.

Le ribosome bactérien est constitué de 2 sous unités : 50S et 30S (figure 1). La sous-unité 30S est constituée d'un ARN ribosomal, le 16S et d'une vingtaine de protéines, tandis que la sous unité 50S est composée de deux ARN

ribosomiaux le 23S et le 5S et d'une trentaine de protéines (Noller, 1984 ; Moore et Steitz, 2003). Les gènes codant pour ces trois ARN ribosomiaux sont appelés respectivement 16SrDNA, 23SrDNA et 5SrDNA. Ces trois gènes, très conservés au sein de toutes les eubactéries sont situés sur le même opéron au sein du génome bactérien. En fonction des espèces bactériennes, ils sont séparés par des zones plus ou moins longues, codantes ou non, que l'on appelle les *Internally Transcribed Spacer* (ITS) (Jensen *et al.*, 1993).

i. 16SrDNA

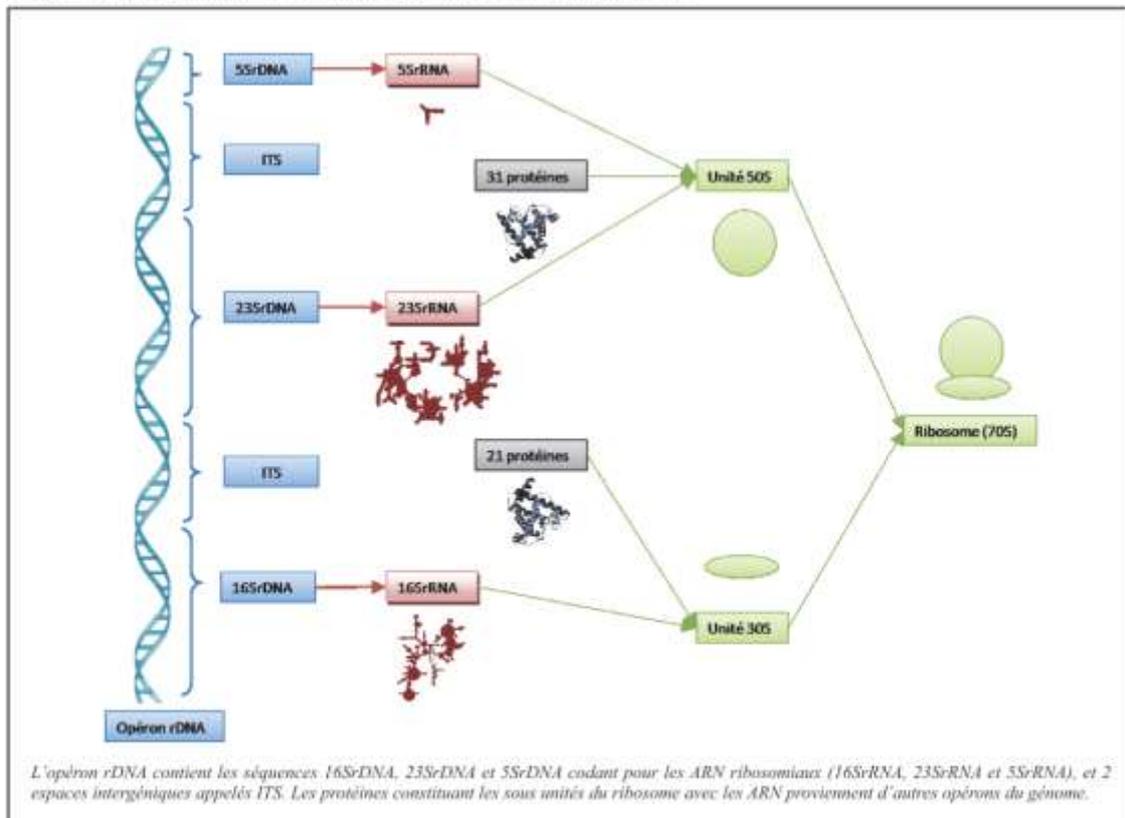
Le gène 16SrDNA est composé de régions conservées permettant l'appariement d'amorces « universelles » et de 9 zones hypervariables (de V1 à V9) (Baker *et al.*, 2003) permettant la distinction de l'espèce (Van de Peer *et al.*, 1996). La séquence du 16SrDNA est utilisée pour clarifier la taxonomie de certains taxons (McInerney *et al.*, 1995). Une banque de données, le *Ribosomal Database Project* lui est presque entièrement dédiée (Cole *et al.*, 2007). Le gène 16SrDNA est de loin le gène le plus employé dans l'étude

de population bactérienne (Wang *et al.*, 2007). Certaines bactéries ne sont connues que par la séquence de leur gène 16S. Rösch et collaborateurs (2006) utilisent alors le terme ribotype au lieu d'espèce ou souche.

Un inconvénient à l'utilisation du gène 16S est son nombre variable de copies. En effet, certaines espèces peuvent posséder entre 1 et 15 opérons ribosomiques dans leur génome (Fogel *et al.*, 1999), ce qui ne permet pas une étude quantitative des espèces présentes dans la flore.

Un grand nombre de séquences différentes d'amorces ciblant le gène 16S a été publié. Elles peuvent être universelles (Baker *et al.*, 2003) ou spécifiques comme par exemple les amorces pour *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes* (Blackwood *et al.*, 2005), ou encore pour les cyanobactéries (Boutte *et al.*, 2006). Les connaissances dans ce domaine étant en évolution exponentielle, de moins en moins d'amorces sont encore qualifiées d'universelles (Baker *et al.*, 2003).

Figure 1 : composition du ribosome procaryote et opéron rDNA



ii. 23SrDNA

Le gène 23SrDNA est l'homologue du 16S pour la grande sous unité du ribosome. Il contient également des régions conservées et variables mais sa séquence générale est plus variable que celle du 16S (Van de Peer *et al.*, 1996). Les résultats obtenus avec le gène 23S sont similaires à ceux obtenus avec le 16S (Hopfl *et al.*, 1989).

iii. Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (ITS)

Beaucoup plus utilisés que le 23SrDNA, les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (*Internally Transcribed Spacer* ou ITS) sont des séquences très variables en taille et en composition dans l'opéron des trois ARNr (16S, 23S, 5S). Le premier et le plus utilisé est présent entre l'extrémité 3' du 16SrDNA et l'extrémité 5' du 23SrDNA (Gonzalez *et al.*, 2003). Sa taille varie de 400 à 1600 pb (Fisher et Triplett, 1999). Il peut contenir des séquences codantes pour des ARN de transfert ou aucune séquence codante (Boyer *et al.*, 2001). Les régions conservées du gène 16S et 23S l'entourant permettent l'appariement des amorces universelles ou plus spécifiques et donc l'amplification de l'ITS.

Tout comme le 16SrDNA, l'ITS peut être présent en multiples copies dans un même génome (Sadeghifard *et al.*, 2006) mais également variable d'une copie à l'autre sur le chromosome (Nagpal *et al.*, 1998). L'analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou RISA) est le nom donné à l'étude par PCR puis électrophorèse de l'ITS (Nocker *et al.*, 2007).

c. Les autres gènes d'intérêt dans l'étude de populations

D'autres gènes peuvent être la cible de PCR dans le cadre d'étude de population. La plupart sont composés de zones conservées et de zones variables. Le gène *rpoC1* (RNA polymérase C1) par exemple, n'existe qu'en une seule copie dans le génome bactérien (Bergsland et Haselkorn, 1991). Ceci permet une quantification des espèces présentes plus fidèle que celle obtenue en utilisant le gène 16SrDNA (Jameson *et al.*, 2007). *RpoC1* est également employé dans la génétique eucaryote car il est présent dans l'ADN des chloroplastes (Fritsch, 2001).

D'autres gènes potentiellement intéressants pour l'étude des populations

bactériennes sont par exemple le gène *NifH* (nitrogénase réductase), très conservé chez beaucoup d'organismes mais pas présent dans toutes les espèces (Rösch *et al.*, 2006), le gène de la citrate synthétase (*gltA*) (Birtles et Raoult, 1996), ou celui de la riboflavine synthétase (Bereswill *et al.*, 1999).

d. Les polymérisations en chaîne aléatoires

Comme dit plus haut, l'amplification est nécessaire pour travailler sur l'ADN ou l'ARN. Il ne faut pas perdre de vue que les cibles des PCR doivent permettre de représenter toutes les espèces présentes dans un échantillon dans le cadre d'une étude de population. Une série de techniques utilisant des amorces s'hybridant très facilement dans tous les génomes permet donc d'amplifier des zones inconnues. Ces amorces sont souvent de faible taille.

i. L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou RAPD) est une technique qui a été développée par Williams (1990) afin de construire des cartes génétiques. Le principe consiste à utiliser des amorces d'environ 10 paires de bases avec des températures d'appariement basses, 36°C (Williams, 1990) à 45°C (Pravin *et al.*, 2007). Des appariements plus ou moins spécifiques ou des mésappariements permettent l'amplification d'une série de fragments de tailles différentes. Les fragments obtenus dépendent de l'appariement des amorces et de la distance entre ces appariements (De Wolf *et al.*, 2004).

Le peu de matériel nécessaire à la RAPD en fait une technique de base particulièrement intéressante pour observer des variations de population (Atienzar et Jha, 2006) même si la faible reproductibilité entre laboratoires est un sujet fréquent de critiques (Savelkoul *et al.*, 1999). La présence d'artefacts a souvent été décrite, présence d'amplification dans le témoin négatif (Mullis, 1991) et variation entre analyses d'un même échantillon (Ellsworth *et al.*, 1993). Afin de contrôler les résultats obtenus, il convient de multiplier les essais en variant la quantité d'ADN de départ (Atienzar et Jha, 2006). En utilisant une concentration d'ADN suffisante sans être trop élevée (entre 10 et 100ng) et en standardisant

au maximum le matériel comme la méthode (même polymérase, même cycleur, même manipulateur...), la reproductibilité de la manipulation peut être fortement améliorée (Fraga *et al.*, 2005).

Bien que cette technique soit le plus souvent employée dans des études d'écotoxicologie (De Wolf *et al.*, 2004 ; Atienzar et Jha, 2006), elle a été employée récemment pour comparer les flores des bioréacteurs (Pravin *et al.*, 2007), les communautés bactériennes du sous-sol (Findlay et Sinsabaugh, 2006) et les flores de surface de fromages (Brennan *et al.*, 2002).

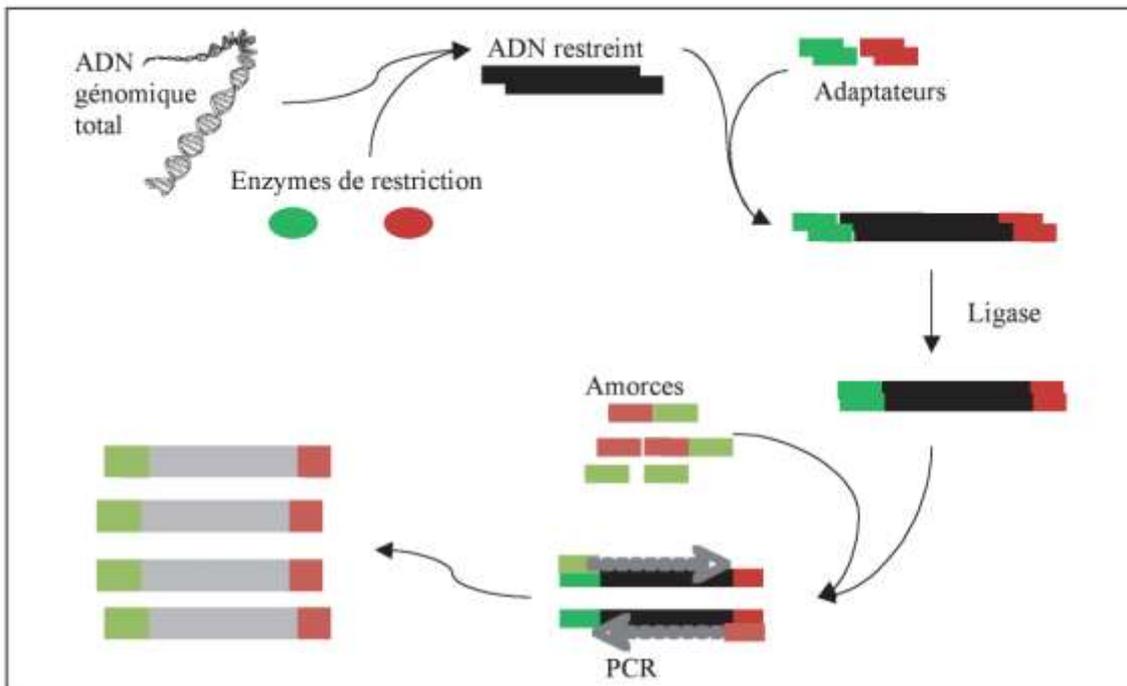
ii. La réaction de polymérisation en chaîne utilisant des amorces arbitraires (AP-PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne utilisant des amorces arbitraires (*Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction* ou AP-PCR) a été pour la première fois utilisée par Welsh et McClelland (1990) pour caractériser rapidement cinq souches de staphylocoques et onze souches de streptocoques. Des amorces d'environ 20 paires de bases sont sélectionnées au hasard. La PCR se fait en deux temps, une première série de cycles (2 à 5) avec une température d'appariement basse, de 40°C (Welsh et McClelland, 1990) à 50°C (Peinado *et al.*, 1992) et une seconde série de cycles (25 à 35) avec une température d'appariement plus élevée, de 50°C à 65°C (Sundin *et al.*, 1994). Le principe est semblable à celui de la RAPD, les amorces s'hybrident de manière plus ou moins spécifique dans le génome, favorisées par les premiers cycles à température d'appariement basse. Le nombre de fragments obtenus dépend du nombre d'amorces appariées.

Un manque de spécificité et de reproductibilité est fréquemment mentionné (McClelland et Welsh, 1994) mais l'expérience en trois réplica développée par Cusick et O'Sullivan (2000) permet d'obtenir des résultats fiables.

Une certaine confusion existe entre l'AP-PCR et la RAPD. Par exemple, Prieto et collaborateurs (2007) utilisent le terme AP-PCR dans leur comparaison de flore bactérienne des vignobles chiliens alors qu'au vu des amorces utilisées (10 pb) et des cycles de PCR programmés (une seule température d'appariement), la technique employée est vraisemblablement une RAPD. Plusieurs études comparatives

Figure 2 : principe général de l'Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)



entre des souches de *Pseudomonas* résistantes aux antibactériens ont été réalisées grâce à l'AP-PCR (Sundin *et al.*, 1994 ; Bultreys et Gilbert, 2003).

iii. L'empreinte génétique de produits d'amplification

L'empreinte génétique de produits d'amplification (DNA Amplification Fingerprinting ou DAF) est analogue à la RAPD et l'AP-PCR (Atienzar et Jha, 2006). Les différences sont : la longueur des amorces, généralement de 5 à 10 pb (Jayarao *et al.*, 1992) et une température d'appariement très basse de 30°C (Baird *et al.*, 2006). La longueur des amplicons peut être très courte, à partir de 50 pb (Atienzar et Jha, 2006 ; Baird *et al.*, 2006). Cette technique a été utilisée pour contrôler l'évolution de populations bactériennes de bioréacteurs (Breen *et al.*, 1995).

Une confusion existe entre les trois techniques de PCR aléatoire (DAF, AP-PCR et RAPD). En effet, excepté la longueur des amorces utilisées et une série de cycles différents pour l'AP-PCR, ces trois techniques sont très semblables. Men et collaborateurs (1999) utilisent une technique correspondant à la définition de AP-PCR ; cependant ils la nomment DAF dans leur article.

iv. Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

En raison des difficultés rencontrées avec les techniques d'amplification aléatoires, Vos et collaborateurs (1995) ont développé une nouvelle technique d'analyse génomique, le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (*Amplified Fragment-Length Polymorphism* ou AFLP). Le principe de cette technique est schématisé dans la figure 2. L'ADN génomique est digéré par deux enzymes. Des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités des sites de restriction. Les amorces peuvent ensuite se fixer sur les fragments obtenus et ceux-ci sont amplifiés. La PCR peut être réalisée en plusieurs étapes : une première avec des amorces dont la séquence est identique à celle des adaptateurs et qui amplifie ainsi tous les fragments ; la seconde avec des amorces possédant de 1 à 3 nucléotides supplémentaires en 3' sélectionnant ainsi un plus petit nombre de fragments étant donné que ceux-ci peuvent être très nombreux (Vos *et al.*, 1995). L'utilisation d'amorces fluorescentes permet une comparaison standardisée de cette technique par électrophorèse capillaire (Savelkoul *et al.*, 1999). Il existe de nombreuses possibilités pour réaliser des AFLP *in silico* (Meudt et Clarke, 2007), c'est-

à-dire simuler des PCR et des gels grâce à des programmes informatiques (Bikandi *et al.*, 2004). Ces simulations permettent de cibler au mieux les enzymes et amorces à utiliser lors de la réalisation de l'expérience mais nécessitent de connaître la séquence génomique complète de certaines espèces présentes dans l'échantillon.

L'AFLP est une technique puissante pour différencier des espèces voire des sous-espèces (Savelkoul *et al.*, 1999). Elle a été utilisée pour comparer des populations bactériennes de sols subissant une faible augmentation en hydrates de carbone (Rosa *et al.*, 2006), caractériser des types de *Clostridium botulinum* (Keto-Timonen *et al.*, 2005) ou encore observer l'impact des dilutions sur la croissance d'une population bactérienne (Franklin *et al.*, 2001).

v. Les zones avec répétitions palindromiques extragéniques

Les zones avec répétitions palindromiques extragéniques (*Repetitive Extragenic Palindromic* ou REP) séparent les zones codantes sur le génome des eubactéries (Stern *et al.*, 1984). Ces séquences sont présentes en grande quantité dans le génome bactérien, il peut en exister jusqu'à 1000 copies dans le

chromosome d'*E. coli* (Higgins *et al.*, 1988). Les séquences présentent entre les REP peuvent être très variables au sein d'une même espèce. En effet, les séquences palindromiques permettent l'insertion ou la délétion d'opérons ou d'éléments génétiques mobiles (Tobes et Pareja, 2006).

Les amorces employées lors des REP-PCR sont des séquences consensus de différents REP contenant beaucoup d'inosine. Cette dernière est capable de s'apparier avec des liaisons faibles aux quatre nucléotides de base (Versalovic *et al.*, 1991). Cette technique a récemment été employée dans l'analyse des flores présentes sur les raisins (Gonzalez *et al.*, 2005) et dans la mise en évidence de bactéries productrices de biosurfactant (Bodour *et al.*, 2003).

4. L'AMPLIFICATION PAR DÉPLACEMENTS MULTIPLES

Les extractions d'ADN et d'ARN ainsi que leur amplification par PCR et RT-PCR sont devenues monnaie courante dans les laboratoires de bactériologie. Par contre, de nouvelles techniques, telles que l'amplification par déplacements multiples sont en développement. Cette technique, beaucoup plus récente que la PCR, permet d'amplifier de très faibles quantités d'ADN, ce qui est très utile pour des échantillons précieux comme ceux de médecine légale ou de paléontologie.

L'amplification par déplacements multiples (*Multiple Displacement Amplification* ou MDA) est une technique d'amplification génétique mise au point par Dean et collaborateurs (2001). Les propriétés de la polymérase du bactériophage $\phi 29$ sont utilisées pour réaliser une amplification non spécifique des génomes présents dans un échantillon. Cette polymérase possède le potentiel de séparer les brins hybridés ce qui rend inutiles les cycles de dénaturation. Elle possède une activité 5'exonucléase la rendant très spécifique. Elle est active à 30°C et est inactivée à 65°C (Dean *et al.*, 2001). Enfin, elle permet d'amplifier des fragments jusqu'à 12 kb (Lasken, 2007). Ce principe a été développé pour amplifier quelques femtogrammes d'ADN précieux comme par exemple en médecine légale. Malheureusement, cette technique génère souvent des biais de surreprésentation de certaines zones du génome et de sous représentation d'autres (Lasken, 2007 ; Ishoey *et al.*, 2008).

La MDA permet essentiellement de pré-amplifier des échantillons pauvres en ADN ou contenant de fortes doses d'inhibiteurs. Les premiers à avoir utilisé la MDA sur des populations bactériennes sont Gonzalez et collaborateurs (2005). Une simple extraction et une MDA a permis d'obtenir un ADN de qualité suffisante pour réaliser leur PCR alors qu'auparavant, une complexe technique d'extraction était nécessaire pour éliminer, souvent peu efficacement, les inhibiteurs de PCR. Depuis, plusieurs études ont utilisé la MDA pour pré-amplifier de l'ADN, notamment une étude métagénomique de la population bactérienne des tourbes (Chen *et al.*, 2008).

Une autre application directe du MDA est l'amplification de l'ADN d'une cellule unique (Raghunathan *et al.*, 2005). Les quelques femtogrammes d'ADN contenu dans une seule cellule peuvent être amplifiés pour obtenir une pureté finale de minimum 30 % d'ADN génomique, les 70 % restant étant des artefacts et quelques contaminations. La MDA sur cellule unique permet de séquencer sans amplification secondaire 62 à 66 % du génome (Zhang *et al.*, 2006). Il existe différentes méthodes d'isolation des cellules : les dilutions (Zhang *et al.*, 2006), les manipulations sous microscope (Lasken, 2007 ; Ishoey *et al.*, 2008), la cytométrie de flux (Dean *et al.*, 2001 ; Podar *et al.*, 2007) ou sur des micropuces (Marcy *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, les MDA sont réalisées dans des réacteurs de 60 nl.

La seule étude de population ayant utilisé le MDA sur cellule isolée est celle de Kvist et collaborateurs (2007) qui ont étudié après analyses traditionnelles, une des archéobactéries les plus représentées dans leur échantillon de sol. Cette technique pourrait être des plus efficaces pour faciliter les analyses des clonages shotgun (Lasken, 2007).

5. TRAITEMENT DE L'ADN AMPLIFIÉ AVANT VISUALISATION

Une fois l'ADN ou l'ARN extrait, la ou les séquences amplifiées, les amplicons peuvent soit être visualisés directement soit, après traitement (s'ils sont de la même taille par exemple), afin d'afficher les différences au sein de la population étudiée. Parmi les traitements possibles, il existe les enzymes de restrictions qui coupent

l'ADN à des sites bien précis ou les substances dénaturant l'ADN, c'est-à-dire séparant les deux brins de la molécule d'ADN.

a. Les restrictions

La digestion des amplicons obtenus au moyen d'une ou plusieurs enzymes de restriction permet d'obtenir des fragments de différentes tailles. Cette technique porte le nom de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP). Une fois la restriction réalisée, les fragments peuvent être visualisés sur gel d'agarose, de polyacrylamide ou par une électrophorèse en champs pulsés (Soutos et Madden, 2007). Ils peuvent également être séquencés après extraction du gel et clonage (Nocker *et al.*, 2007). L'*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) est une RFLP réalisée sur le gène 16S (Moyer *et al.*, 1994).

L'ARDRA est une technique analytique particulièrement intéressante pour détecter des changements au sein de populations connues, mais moins efficace pour étudier la biodiversité globale d'un échantillon (Kirk *et al.*, 2004). Elle a été récemment employée pour la caractérisation et la comparaison des populations bactériennes de réserves de pétrole (Sette *et al.*, 2007) ou des populations bactériennes du plancton arctique (Zeng *et al.*, 2007). D'autres gènes sont employés comme base de RFLP, notamment l'ITS (Toth *et al.*, 2001), également utilisé pour les populations fongiques (Medina *et al.*, 2005), et le gène *rpoC1* (Jameson *et al.*, Epub).

b. La dénaturation

Le Polymorphisme de conformation des simples brins (*Single Strand Conformation Polymorphism* ou SSCP) est une technique mise au point par Orita et collaborateurs (1989) dans le cadre de l'analyse du génome humain. La première équipe à l'avoir utilisée pour une étude de population bactérienne est celle de Lee et collaborateurs (1996). L'ADN double brin est dénaturé par un agent chimique, le plus fréquent étant la formamide mais l'hydroxyde de sodium, l'urée et l'hydroxyde de méthylmercure ont également été employés (Nataraj *et al.*, 1999). L'ADN simple brin adopte ensuite une structure tridimensionnelle, possédant un encombrement stérique particulier. Cette configuration peut

varier suite à la mutation d'un seul nucléotide (Orita *et al.*, 1989). La séparation des différents brins peut ensuite se réaliser sur un gel de polyacrylamide (Hayashi, 1991) ou par électrophorèse capillaire (Baba *et al.*, 2003).

Les espèces représentant moins d'1,5 % de la population étudiée peuvent être mises en évidence par la SSCP (Lee *et al.*, 1996). Un des plus gros problèmes de la SSCP est le ré-appariement des brins séparés (Selvakumar *et al.*, 1997). La conséquence de ce ré-appariement est la présence de trois (au lieu de deux) bandes pour le même amplicon (double brin, simple brin Watson et simple brin Crick) (Schwieger et Tebbe, 1998). Ce phénomène peut être diminué par l'ajout d'un groupe phosphate à l'extrémité 5' lors de la PCR et une dénaturation employant l'exonucléase lambda (Schwieger et Tebbe, 1998).

Récemment, Ye et collaborateurs (Ye *et al.*, 2007) ont utilisé cette technique pour étudier les effets du pH sur les populations bactériennes lors de la fermentation des composts.

6. VISUALISATION DE L'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE

Une fois les différentes étapes décrites plus haut réalisées, il faut visualiser le résultat de l'amplification ou du traitement réalisés sur les amplicons. Pour ce faire, différents types d'électrophorèses peuvent être réalisés, de la plus classique sur gel d'agarose à des processus complexes tels que des gels contenant des gradients d'agents dénaturants et alliant donc dans la même étape le traitement de l'ADN et sa visualisation.

L'électrophorèse permet de séparer des particules en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Les molécules d'ADN, chargées négativement, sont attirées vers l'anode au travers d'un réseau solide non mobile (généralement un gel en agarose ou polyacrylamide). Ce réseau permet de retenir les molécules en fonction de leur taille, les plus petites gagnant plus rapidement l'anode que les grandes. Plus le réseau est dense, mieux les molécules de petites tailles seront séparées (Ausubel *et al.*, 1989).

a. Sur gel d'agarose

Les gels d'agarose permettent la séparation de fragments d'ADN de relativement grandes tailles. Les molécules

d'ADN, chargées négativement, sont soumises à un courant électrique qui les fait migrer dans le gel. En fonction de la concentration de celui-ci en agarose, certaines tailles de fragment seront mieux séparées que d'autre. Alors qu'un gel à 0,5 % permet la séparation de molécules de 30 kb à 1 kb, il faudra une concentration de 1,5 % pour séparer des fragments de 3 kb à 200 pb (Ausubel *et al.*, 1989). Les gels d'agarose sont utilisés pour l'analyse des ITS (Nagpal *et al.*, 1998), des RFLP (Toth *et al.*, 2001), des PCR aléatoires (Pravin *et al.*, 2007) et des REP-PCR (Versalovic *et al.*, 1991).

b. Sur gel de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide (*Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis* ou PAGE) sont utilisés pour des fragments plus petits que les gels d'agarose, en général inférieurs à 1 kb. À nouveau, les échantillons déposés sur le gel sont séparés en fonction de leur taille. Tout comme pour les gels d'agarose, une concentration plus élevée permet une séparation plus nette des fragments de très petites tailles (Ausubel *et al.*, 1989). Ils sont utilisés pour séparer les PCR d'ITS (Jensen *et al.*, 1993 ; Prieto *et al.*, 2007), les fragments de RFLP (Prieto *et al.*, 2007) ou les simples brins des SSCP (Lee *et al.*, 1996 ; Smalla *et al.*, 2007).

c. En champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* ou PFGE) est une électrophorèse sur gel d'agarose utilisant des champs électriques alternés. Les changements de direction des molécules en fonction de leur structure tridimensionnelle durant la migration font varier leur distance totale de migration (Lai *et al.*, 1989). La PFGE permet de séparer des fragments de très grande taille, jusqu'à 10 Mb, alors que les électrophorèses traditionnelles séparent des fragments de maximum 50 kb (Herschleb *et al.*, 2007).

La PFGE peut être utilisée sur des génomes ou métagénomes entiers restreints avec des enzymes de restrictions coupant peu fréquemment (Quelle et Catalano, 2001 ; Nagase *et al.*, 2002), sur des PCR aléatoires (Brennan *et al.*, 2002) ou des RFLP (Satokari *et al.*, 2003 ; Soutlos et Madden, 2007).

d. En gradient de dénaturant

Les électrophorèses en gradient de gel dénaturant (*Denaturing Gradient*

Gel Electrophoresis ou DGGE) et les électrophorèses en gradient de température (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis* ou TGGE) sont des techniques d'électrophorèse dénaturantes mises au point par Fischer et Lerman (1983) pour la première et Rosenbaum et collaborateurs (1987) pour la seconde. Les molécules d'ADN de petites tailles (entre 80 et 500 pb) se déplacent au sein du gel et subissent une dénaturation progressive durant l'électrophorèse en fonction de leur température de fusion (T_m). Une fois les brins dénaturés, leur encombrement stérique est trop important pour continuer la migration dans le gel. Ces techniques permettent donc de séparer des fragments de même taille en fonction de leur T_m , c'est-à-dire de leur composition nucléotidique : une augmentation du pourcentage en GC (3 ponts hydrogènes) par rapport au pourcentage en AT (2 ponts hydrogènes) augmente le T_m de la molécule pour une taille donnée (Fischer et Lerman, 1983).

Afin d'éviter la séparation complète des deux brins d'ADN, une séquence riche en GC est ajoutée à l'une des amorces lors de la PCR. Cette pince GC permet de garder les deux brins d'ADN attachés par cette extrémité grâce à la série de triples liaisons hydrogènes entre les guanines et les cytosines (Myers *et al.*, 1985). L'ajout de cette pince GC entraîne un rendement faible de la PCR. Pour augmenter le rendement, différentes techniques peuvent être employées. Le nombre de cycles, temps d'appariement et la quantité d'ADN de départ peuvent être augmentés (Abecia *et al.*, 2005). Des PCR nichées, qui amplifient l'ADN en deux temps, avec deux couples d'amorces dont le second amplifie un fragment interne au premier, peuvent être employées (Randazzo *et al.*, 2005 ; Boutte *et al.*, 2006) ou des PCR « *touchdown* », dont la température d'appariement augmente progressivement à chaque cycle (Suchodolski *et al.*, 2004 ; Yu et Morrison, 2004).

Cette technique offre des résultats semblables à la SSCP, une différence d'un seul nucléotide pouvant être détectée lorsque l'espèce représente plus de 2 % de la population étudiée (Myers *et al.*, 1985). Cependant, des trainées d'ADN sont souvent présentes sur les gels lorsque la population est trop riche. De plus, cette technique ne permet pas la mise en évidence des populations minoritaires (Rösch *et al.*,

2006). Les bandes obtenues peuvent être séquencées directement après extraction ou après un clonage.

La validation de la DGGE comme technique d'étude de population a été réalisée par Muyzer et collaborateurs (1993). Yu et Morrison (2004) ont comparé les différentes régions hypervariables du gène 16S par DGGE. Des flores caecales de lapins traités aux antibiotiques ont été comparées par DGGE (Abecia *et al.*, 2005) démontrant un changement de flore spécifique en fonction de l'antibiotique utilisé. Récemment, des flores bactériennes du sol ont été comparées par différentes techniques de biologie moléculaire notamment la DGGE (Smalla *et al.*, 2007).

e. Sur gel de polyacrylamide en deux dimensions (PAGE-2D)

Les PAGE-2D sont des électrophorèses en deux temps. La première migration a lieu sur un gel non dénaturant et permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. La colonne est excisée et déposée sur le second gel contenant un gradient de dénaturant, tout comme dans la DGGE. La seconde migration permet donc de séparer les amplicons en fonction de leur séquence. Une pince G-C est donc nécessaire dans cette technique. La PAGE-2D a été employée sur les ITS de bactéries des sols (Jones et Thies, 2007).

7. PROFILS AUTOMATISÉS DE VISUALISATION DE L'ADN

Outre les profils d'électrophorèse sur gels, il existe également des méthodes automatisées pour visualiser l'ADN. Ces profils automatisés sont réalisés grâce à des électrophorèses sur capillaire. Ils demandent un marquage préalable par des molécules fluorescentes et permettent d'obtenir des profils précis, reproductibles et de haute résolution.

a. Les fragments de restriction terminaux

La technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* ou T-RFLP) est une RFLP automatisée grâce à des produits de PCR marqués par des amorces fluorescentes et à la migration des fragments sur capillaires. Avaniiss-Aghajani et collaborateurs (1994) sont les pionniers de cette

technique. Les fragments terminaux fluorescents d'ADN restreints possèdent une taille variable en fonction de leur séquence et, donc, des pics de fluorescence sont enregistrés à différents moments. Les profils obtenus par T-RFLP possèdent une grande répétabilité (Kitts, 2001). Le gène le plus souvent employé est le 16SrDNA. Les profils obtenus peuvent être enregistrés dans des bases de données, comme, par exemple, la *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2007), ce qui permet aujourd'hui d'identifier une espèce présente sur un profil de T-RFLP sans passer par un séquençage (Marsh *et al.*, 2000). Récemment, un outil informatique permettant une aide au choix de l'enzyme lors de T-RFLP a été mis en place (Collins et Rocap, 2007).

La taille des pics de fluorescence est un bon outil de quantification. En effet les pics les plus élevés sont les séquences le plus souvent mises en évidence lors de clonages (Rahalkar et Schink, 2007). De part sa rapidité, sa sensibilité et sa reproductibilité, la T-RFLP peut être un outil de diagnostic efficace (Thies *et al.*, 2007).

Jensen et collaborateurs ont très récemment utilisé cette technique pour étudier la flore des racines et des feuilles de la zostère marine (Jensen *et al.*, 2007). Les effets de la déforestation et de la reforestation sur les populations de bactéries méthanotrophiques ont également été étudiés grâce à la T-RFLP (Singh *et al.*, 2007).

b. Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal

L'analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou ARISA) est un profil automatisé de RISA. L'ITS est amplifié par PCR en ajoutant un marqueur de fluorescence aux amorces. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire et les pics de fluorescence sont enregistrés (Nocker *et al.*, 2007). Fisher et Triplett (1999) ont mis au point cette technique. L'inconvénient principal est toujours lié au nombre de copies différentes de cette séquence intergénique, 85 % des espèces produisant deux voire trois pics (Jensen *et al.*, 1993). L'ARISA fournit rapidement des profils contenant peu d'informations mais permettant des comparaisons entre les populations. Tout comme la T-RFLP, elle a une très bonne répétabilité (Jones *et al.*, 2007).

La dynamique des populations bactériennes est l'objet d'études fréquentes par ARISA, par exemple l'effet de la composition minérale du sol (Carson *et al.*, 2007) ou la colonisation de l'intestin des dindes (Scupham, 2007). Cette dernière étude a identifié une période de transition de la flore intestinale des dindes vers 12 semaines d'âge. L'ARISA est également employée dans l'étude des populations fongiques (Ranjard *et al.*, 2001).

c. Avec ADN simple brin

Les différents brins obtenus par SSCP peuvent aussi être séparés par électrophorèse capillaire. Cette technique est appelée l'électrophorèse capillaire du polymorphisme de conformation des simples brins (*Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism* ou CE-SSCP). Elle a été utilisée très récemment dans une comparaison de flores des matières fécales et des cœcotrophes de lapins avant et après intervention chirurgicale sur le tractus digestif (Michelland *et al.*, 2008). Cette étude démontre que les flores des matières fécales et cœcotrophes sont semblables et qu'une intervention sur le tractus digestif du lapin entraîne un changement notable de la flore.

d. Séquençage

Le séquençage est la technique apportant le plus d'informations phylogénétiques lors d'études de flores bactériennes (Nocker *et al.*, 2007). Des bandes intéressantes excisées des gels ou des fragments d'ADN clonés dans un vecteur peuvent ainsi être séquencés. Dans le premier cas, l'ADN extrait du gel peut être séquencé directement (Nagpal *et al.*, 1998), après réamplification ou après clonage (Zeng *et al.*, 2007). Le séquençage des produits de PCR après clonage est fréquemment employé avec le gène 16S (Kassinen *et al.*, 2007 ; Kjeldsen *et al.*, 2007 ; Shinzato *et al.*, 2007). En effet, le séquençage de ce gène permet généralement l'identification de la souche jusqu'à l'espèce (Van de Peer *et al.*, 1996). La comparaison de différentes bibliothèques de clones du gène 16S permet d'estimer les flores en fonction des milieux. La dynamique au sein d'un milieu est par contre difficilement étudiable grâce à cette technique (Singleton *et al.*, 2001). Le séquençage peut également avoir comme cible des fragments de restrictions de génomes clonés. Cette approche, appelée *shotgun* a permis le séquençage du premier

chromosome bactérien (Fleischmann *et al.*, 1995). Venter et collaborateurs (2004) ont énormément contribué à la base de données des séquences procaryotiques grâce à leur séquençage shotgun des espèces présentes dans la mer des Sargasses. Ils ont été les premiers à employer cette technique pour l'étude d'une population entière.

De nouvelles techniques de séquençage permettent d'éviter la pré-amplification et le clonage des échantillons qui sont des activités chronophages (Cardenas et Tiedje, 2008). Grâce à ces techniques de séquençage à ultra haut débit, des milliers de simples brins d'ADN peuvent être séquencés en même temps. Trois techniques commerciales (SOLiD, Helicos, Illumina) font appel à des principes similaires : le matériel génétique est restreint en fragments de 30 à 36pb et un adaptateur (queue poly A ou un oligo) est fixé à une extrémité. Ces fragments sont ensuite fixés sur des lames grâce à des billes magnétiques et/ou des oligo. Des PCR universelles sont réalisées sur la lame pour les techniques de SOLiD et Illumina tandis qu'un seul brin est employé pour le séquençage lors d'une Helicos. Les émissions de fluorescence des nucléotides utilisés pour le séquençage sont localisées sur la lame et permettent de séquencer simultanément une quantité de fragments allant de 100 000 à 400 000 (Steeimers et Gunderson, 2005). La réunion de ces différentes séquences grâce à des algorithmes permet d'obtenir le génome ou méta-génome complet de l'échantillon dans des temps record (Huang *et al.*, 2009). D'autres techniques de séquençage à ultra haut débit sont en cours de développement, notamment l'utilisation de nanopores (Oxford Nanopore Technology, 2009). Ces techniques devraient bientôt être utilisées pour les études de populations bactériennes.

Ces différentes méthodes permettent d'étudier l'évolution d'une population bactérienne et/ou d'en comparer plusieurs. Ces techniques sont plus ou moins coûteuses ; certaines donnent des informations complémentaires ; d'autres des informations semblables. L'important est de trouver la ou les techniques les plus appropriées à l'étude choisie.

8. CHOIX DES TECHNIQUES

La première alternative à envisager est l'étude de l'ADN ou de l'ARN. Des informations différentes sont obtenues

en fonction de ce choix. L'ARN reflète beaucoup mieux l'activité de la population (Sorensen et Teske, 2006). Mais il est également plus difficile à manipuler et est facilement contaminé par de l'ADN ou des RNAses qui le dégradent (Halet *et al.*, 2006 ; Lahtinen *et al.*, 2008).

Les inconvénients et avantages des différentes techniques sont présentés au tableau I. Parmi toutes les techniques présentées, une différence doit être faite entre les profils automatisés et les autres techniques. L'automatisation permet une comparaison rapide, d'un nombre important d'échantillons avec une reproductibilité importante pour un moindre coût une fois l'appareil amorti (Nocker *et al.*, 2007). Le gros inconvénient des techniques automatisées est l'impossibilité de séquencer les pics intéressants (tableau II). Leur utilité est donc de détecter des différences entre populations (Jensen *et al.*, 2007 ; Rahalkar et Schink, 2007) ou au sein de la même population au cours du temps (Scupham, 2007) ou lors d'un changement d'environnement (Carson *et al.*, 2007).

Comme le décrivent Kirk et collaborateurs (2004) dans une synthèse sur l'étude de la biodiversité des flores du sol, les biais présents dans les différentes techniques entraînent souvent la nécessité d'en utiliser plusieurs afin d'obtenir une vision globale et plus complète de la, ou des, populations étudiées. Par exemple, Smalla et collaborateurs (2007) étudient les flores du sol avec la DGGE, la T-RFLP et la SSCP. Les conclusions qu'ils en ont tirées sont les suivantes : les profils obtenus avec les DGGE et SSCP sont comparables tandis que les profils obtenus avec la T-RFLP sont moins riches. Ces derniers, bien qu'apportant moins de résultats permettent d'obtenir des arbres phylogénétiques de bonne qualité, ils sont donc très intéressants pour une étude de routine à réaliser sur du long terme. D'un autre côté, seuls les profils de SSCP et DGGE permettent d'identifier les espèces présentes dans les populations par séquençage.

D'autres auteurs se contentent d'une seule technique. Il s'agit en grande majorité d'études démontrant une simple variation de population. Par exemple, Abecia et collaborateurs (2005) n'ont utilisé que la DGGE afin de démontrer que des traitements antibiotiques modifiaient fortement les flores digestives des lapins. Ou encore l'étude de Carson et collaborateurs (2007) qui

démontre un changement de flore bactérienne dans les sols enrichis en minéraux grâce à l'ARISA.

9. QUELLES SONT LES MÉTHODES UTILISÉES POUR LES ÉTUDES SUR LA FLORE DIGESTIVE ?

Toutes les techniques d'études de populations peuvent potentiellement être utilisées pour l'étude de flore digestive. Néanmoins certains critères doivent être pris en compte lors d'un travail sur matières fécales ou contenus intestinaux.

Tout d'abord le stockage des prélèvements se font en général à -80°C (Suchodolski *et al.*, 2004 ; Scupham, 2007) en attendant l'extraction. Certains auteurs utilisent, avec de bons résultats, d'autres méthodes de conservation par exemple à -20°C (Fenicia *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2007) ou à 4°C dilué dans un tiers d'éthanol 98 % (Badiola *et al.*, 2005). Si les extractions ne peuvent être réalisées peu de temps après la récolte d'échantillons, la conservation à -80°C ou -20°C est recommandée.

Comme dit plus haut, les matières fécales contiennent énormément d'inhibiteurs de PCR (Duenngai *et al.*, 2008), les extractions doivent donc éliminer un maximum ces inhibiteurs. Des kits commerciaux donnent de bons résultats mais souvent inférieurs à une méthode développée spécifiquement pour un type de prélèvement (Schuurman *et al.*, 2007). Le kit le plus populaire et très efficace pour les extractions de matières fécales est le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®) (Li *et al.*, 2003).

Les amorces utilisées sur des flores digestives dépendent de la flore type de l'animal étudié. Par exemple, pour une flore riche en bactéries gram positives, des amorces riches en guanine et cytosine généralement plus fréquentes chez les bactéries gram positives seront privilégiées. Des amorces spécifiques ciblant les gènes codant pour les ARN ribosomiaux des entérobactéries ou des bifido- et lactobactéries (Satakari *et al.*, 2003) peuvent être utilisées pour des études sur ces populations particulières.

Il existe des articles de revue spécifiques à l'étude des populations digestive, humaines ou animales (Macfarlane *et al.*, 2004 ; Richards *et al.*, 2005).

Tableau I : Avantages et inconvénients des techniques présentées

PCR aléatoire (RAPD, AP-PCR et DAF)	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel
	Inconvénients	Manque de reproductibilité Présence d'artefacts (amplification dans le témoin négatif)
AFLP	Avantages	Possibilité de tester <i>in silico</i> pour choisir les enzymes intéressantes Permet de différencier des espèces voir des sous espèces Compatible avec une analyse automatisée
	Inconvénients	Demande beaucoup de temps
REP	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel
	Inconvénients	Les séquences présentent entre les REP peuvent être très variables au sein d'une même espèce
RISA	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel
	Inconvénients	Une seule espèce peut avoir plusieurs signaux
ARDRA	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique
	Inconvénients	Plusieurs restrictions nécessaires pour trouver une résolution adéquate Demande beaucoup de temps
SSCP	Avantages	Pas besoin d'amorce avec pince GC Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel Compatible avec une analyse automatisée (CE-SSCP)
	Inconvénients	Taux élevé de ré appariement des brins d'ADN Une espèce peut présenter plusieurs bandes
DGGE / TGGE	Avantages	Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel Peu cher
	Inconvénients	Sensibilité limitée La pince GC diminue la rentabilité de la PCR et favorise la formation de dimère La manipulation du gel demande de l'expérience
T-RFLP	Avantages	Haute sensibilité Rapide Permet une comparaison entre les différents essais
	Inconvénients	Restriction incomplète entraîne une surestimation d'une espèce Plusieurs restrictions sont nécessaires pour une analyse complète Les profils complexes sont difficiles à interpréter phylogénétiquement
ARISA	Avantages	Permet de détecter de très légères différences de population Compatible avec RFLP et séquençage pour des analyses complémentaires
	Inconvénients	Une seule espèce peut avoir plusieurs signaux
Séquençage	Avantages	La plus haute résolution phylogénétique Permet l'identification de l'espèce
	Inconvénients	Prend du temps si passe par le clonage

Tableau II : Techniques permettant un séquençage des bandes d'intérêts

Après extraction du gel	Après clonage	Impossible
DGGE / TGGE SSCP RISA AFLP	RAPD AP-PCR DAF REP ARDRA	T-RFLP ARISA CE-SSCP

10. CONCLUSION

Il existe beaucoup de choix au niveau des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des populations bactériennes. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible. Même si les profils automatisés sont les plus faciles à comparer et reproduire, ils ne permettent pas de séquençage ultérieur. La plupart des études actuelles utilisent et comparent plusieurs méthodes.

ABSTRACT

Today, traditional bacterial cultures techniques aren't sufficient for studying complex bacterial population. For the past twenty years, a lot of studies have shown that a wide majority of bacterial species can't be grown on traditional culture media. They've also approved the use of biomolecular methods to assess complex bacterial populations whatever their

origin, digestive, aquatic, from the soil... These methods are numerous but follow generally the same framework. The DNA is extracted then amplified, sometimes treated and finally visualized or sequenced. This review discussed the more common methods used to assess bacterial population and the different points to consider before choosing one or several appropriated methods.

BIBLIOGRAPHIE

- ABECIA L., MCEWAN N.R., NEWBOLD C.J., FONDEVILA M., BALCELLS J. (2005). Molecular profiling of the major bacterial species in the rabbit caecum as affected by therapeutical doses of antibiotics. In : Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Puebla Mexico. World Rabbit Science Association : Paris, 2004, 404-409.
- ALDERTON R.P., ECCLESTON L.M., HOWE R.P., READ C.A., REEVE M.A., BECK S. Magnetic bead purification of M13 DNA sequencing templates. *Anal. Biochem.*, 1992, **201**, 166-169.
- ATIENZAR F.A., JHA A.N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat. Res.*, 2006, **613**, 76-102.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., STRUHL K. Current Protocols in molecular biology. John Wiley: New York, 1989.
- AVANISS-AGHAJANI E., JONES K., CHAPMAN D., BRUNK C. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *Biotechniques*, 1994, **17**, 144-146, 148-149.
- BABA S., KUKITA Y., HIGASA K., TAHIRA T., HAYASHI K. Single-stranded conformational polymorphism analysis using automated capillary array electrophoresis apparatuses. *Biotechniques*, 2003, **34**, 746-750.
- BADIOLA I., PEREZ DE ROZAS A.M., ROCA M., CARABANO R., GOMEZ M., GARCIA J., BLAS C.D. Characterization of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. In : Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Puebla Mexico. World Rabbit Science Association : Paris, 2004.
- BAIRD R.E., TRIGIANO R.N., WINDHAM G., WILLIAMS P., KELLEY R., ABBAS H.K., MOULTON J.K., SCRUGGS M.L. Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. *Mycopathologia*, 2006, **161**, 93-99.
- BAKER G.C., SMITH J.J., COWAN D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **55**, 541-555.
- BERESWILL S., HINKELMANN S., KIST M., SANDER A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 3159-3166.
- BERGSLAND K.J., HASELKORN R. Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the rpoC1 gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 3446-3455.

- BEZIRTOGLOU, E., MAIPA V., CHOTOURA N., APAZIDOU E., TSIOTSIAS A., VOIDAROU C., KOSTAKIS D., ALEXOPOULOS A. Occurrence of Bifidobacterium in the intestine of newborns by fluorescence in situ hybridization. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, **29**, 345-352.
- BIKANDI J., MILLAN R.S., REMENTERIA A., GARAZAR J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 2004, **20**, 798-799.
- BIRTLES R.J., RAOULT D. Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 891-897.
- BLACKWOOD C.B., OAKS A., BUYER J.S. Phylum- and Class-Specific PCR primers for general microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 6193-6198.
- BODOUR A.A., DREES K.P., MAIER R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 3280-3287.
- BOOM R., SOL C., WEEL J., LETTINGA K., GERRITS Y., VAN BREDA A., WERTHEIM-VAN DILLEN P. Detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in faeces. *J. Virol. Methods*, 2000, **84**, 1-14.
- BOUTTE C., GRUBISIC S., BALTHASART P., WILMOTTE A. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J. Microbiol. Methods*, 2006, **65**, 542-550.
- BOYER S.L., FLECHTNER V.R., JOHANSEN J.R. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 2001, **18**, 1057-1069.
- BREEN A., ROPE A.F., TAYLOR D., LOPER J.C., SFERRA P.R. Application of DNA amplification fingerprinting (DAF) to mixed culture bioreactors. *J. Ind. Microbiol.*, 1995, **14**, 10-16.
- BRENNAN N.M., WARD A.C., BERESFORD T.P., FOX P.F., GOODFELLOW M., COGAN T.M. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 820-830.
- BRIM H., HEUER H., KROGERECKLENFORT E., MERGEAY M., SMALLA K. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.*, 1999, **45**, 326-338.
- BULTREYS A., GILBERT V. Interest of tests based on phytotoxin and pyoverdinin production and of the rep-PCR and AP-PCR techniques for identifying and characterizing *Pseudomonas syringae* strains. *Parasitica*, 2003, **59**, 11-18.
- CARDENAS E., TIEDJE J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008, **19**, 544-549.
- CARROLL N.M., JAEGER E.E.M., CHOUDHURY S., DUNLOP A.A.S., MATHESON M.M., ADAMSON P., OKHRAVI N., LIGHTMAN S. Detection of and discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 1753-1757.
- CARSON J.K., ROONEY D., GLEESON D.B., CLIPSON N. Altering the mineral composition of soil causes a shift in microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **61**, 414-423.
- CASES I., DE LORENZO V. The grammar of (micro)biological diversity. *Environ. Microbiol.*, 2002, **4**, 623-627.
- CHENY., DUMONT M.G., NEUFELD J.D., BODROSSY L., STRALIS-PAVESE N., MCNAMARA N.P., OSTLE N., BRIONES M.J., MURRELL J.C. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. *Environ. Microbiol.*, 2008, **10**, 2609-2622.
- COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM-SYED-MOHIDEEN A.S., MCGARRELL D.M., BANDELA A.M., CARDENASE., GARRITY G.M., TIEDJE J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, D169-172.
- COLLINS R.E., ROCAP G. REPK: an analytical web server to select restriction endonucleases for terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, W58-62.
- CONNOR S.A., GIOVANNONI S.J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 3878-3885.
- CUSICK S.M., O'SULLIVAN D.J. Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2227-2231.
- DE WOLF H., BLUST R., BACKELJAU T. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2004, **566**, 249-262.
- DEAN F.B., NELSON J.R., GIESLER T.L., LASKEN R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.*, 2001, **11**, 1095-1099.
- DONG D., YAN A., LIU H., ZHANG X., XU Y. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *J. Microbiol. Methods*, 2006, **66**, 217-222.
- DORIGO U. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.*, 2005, **39**, 2207-2218.
- DUENNGAI K., SITHITHAWORN P., RUDRAPPA U.K., IDDYA K., LAHA T., STENSVOLD C.R., STRANDGAARD H., JOHANSEN M.V. Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 366-368.

- ELLSWORTH D.L., RITTENHOUSE K.D., HONEYCUTT R.L. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 1993, **14**, 214-217.
- FENICIA L., ANNIBALLI F., DE MEDICI D., DELIBATO E., AURELI P. SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 2891-2896.
- FINDLAY S., SINSABAUGH R.L. Large-scale variation in subsurface stream biofilms: a cross-regional comparison of metabolic function and community similarity. *Microb. Ecol.*, 2006, **52**, 491-500.
- FISCHER S.G., LERMAN L.S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1983, **80**, 1579-1583.
- FISHER M.M., TRIPLETT E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4630-4636.
- FLEISCHMANN R.D., ADAMS M.D., WHITE O., CLAYTON R.A., KIRKNESS E.F., KERLAVAGE A.R., BULT C.J., TOMB J.F., DOUGHERTY B.A., MERRICK J.M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, **269**, 496-512.
- FOGEL G.B., COLLINS C.R., LI J., BRUNK C.F. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.*, 1999, **38**, 93-113.
- FRAGA J., RODRIGUEZ J., FUENTES O., FERNANDEZ-CALIENES A., CASTEX M. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of Cuban Triatominae. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2005, **47**, 295-300.
- FRANKLIN R.B., GARLAND J.L., BOLSTER C.H., MILLS A.L. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 702-712.
- FREEMAN W.M., WALKER S.J., VRANA K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 1999, **26**, 112-122, 124-115.
- FRITSCH P.W. Phylogeny and biogeography of the flowering plant genus *Styrax* (*Styracaceae*) based on chloroplast DNA restriction sites and DNA sequences of the internal transcribed spacer region. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, **19**, 387-408.
- GONZALEZA., HIERRON., POBLET M., MAS A., GUILLAMON J.M. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, **102**, 295-304.
- GONZALEZ J.M., PORTILLO M.C., SAIZ-JIMENEZ C. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environ. Microbiol.*, 2005, **7**, 1024-1028.
- GONZALEZ N., ROMERO J., ESPEJO R.T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **55**, 91-97.
- GUEIMONDE M., LAITINEN K., SALMINEN S., ISOLAURI E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 2007, **92**, 64-66.
- HALET D., BOONN., VERSTRAETE W. Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, **101**, 297-302.
- HAYASHI K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.*, 1991, **1**, 34-38.
- HERRERA A., COCKELL C.S. Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction, *J. Microbiol. Methods*, 2007, **70**, 1-12.
- HERSCHLEB J., ANANIEV G., SCHWARTZ D.C. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc*, 2007, **2**, 677-684.
- HERTOGH G.D., AERSSSENS J., HOOGT R.D., PEETERS P., VERHASSELT P., EYKEN P.V., ECTORS N., VERMEIRE S., RUTGEERTS P., COULIE B., GEBOES K. Validation of 16S rDNA sequencing in microdissected bowel biopsies from Crohn's disease patients to assess bacterial flora diversity. *J. Pathol.*, 2006, **209**, 532-539.
- HIGGINS C.F., MCLAREN R.S., NEWBURY S.F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. *Gene*, 1988, **72**, 3-14.
- HOPFL P., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H., LARSEN N. The 23S ribosomal RNA higher-order structure of *Pseudomonas cepacia* and other prokaryotes. *Eur. J. Biochem.*, 1989, **185**, 355-364.
- HOSHINO Y.T., MATSUMOTO N. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, **39**, 434-444.
- HUANG X., FENG Q., QIAN Q., ZHAO Q., WANG L., WANG A., GUAN J., FAN D., WENG Q., HUANG T., DONG G., SANG T., HAN B. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res.*, 2009, **19**, 1068-1076.
- ISHOEY T., WOYKE T., STEPANAUSKAS R., NOVOTNY M., LASKEN R.S. Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2008, **11**, 198-204.
- JAMESON E., JOINT I., MANN N., MÜHLING M. Application of a novel rpoC1 -RFLP approach reveals that marine *Prochlorococcus* populations in the atlantic gyres are composed of greater microdiversity than previously described. *Microb. Ecol.*, 2007, **55**, 141-151.

- JAYARAO B.M., BASSAM B.J., CAETANO-ANOLLES G., GRESSHOFF P.M., OLIVER S.P. Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1347-1350.
- JENSEN M.A., WEBSTER J.A., STRAUS N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 945-952.
- JENSEN S.J., KUHL M., PRIEME A. Different bacterial communities associated with the roots and bulk sediment of the seagrass *Zostera marina*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **62**, 108-117.
- JONESC.M., THIESJ.E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **69**, 256-267.
- JONES S.E., SHADE A.L., MCMAHON K.D., KENT A.D. Comparison of primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of aquatic bacterial communities: an ecological perspective. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 659-662.
- KASSINEN A., KROGIUS-KURIKKA L., MAKIVUOKKO H., RINTTILA T., PAULIN L., CORANDER J., MALINEN E., APAJALAHTI J., PALVA A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, 2007, **133**, 24-33.
- KETO-TIMONEN R., NEVAS M., KORKEALA H. Efficient DNA fingerprinting of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 1148-1154.
- KIRK J.L., BEAUDETTE L.A., HART M., MOUTOGLIS P., KLIRONOMOS J.N., LEE H., TREVORS J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*, 2004, **58**, 169-188.
- KITTS C.L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2001, **2**, 17-25.
- KJELDSEN K.U., KJELLERUP B.V., EGLI K., FROLUND B., NIELSEN P.H., INGVOSEN K. Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district heating system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **61**, 384-397.
- KVIST T., AHRING B.K., LASKEN R.S., WESTERMANN P. Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **74**, 926-935.
- LAHTINEN S.J., AHOKOSKI H., REINIKAINEN J.P., GUEIMONDE M., NURMI J., OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2008, **46**, 693-698.
- LAI E., BIRREN B.W., CLARK S.M., SIMON M.I., HOOD L. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques*, 1989, **7**, 34-42.
- LALAM N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J. Theor. Biol.*, 2006, **242**, 947-953.
- LANE D.J., STAHL D.A., OLSEN G.J., HELLER D.J., PACE N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.*, 1985, **163**, 75-81.
- LASKEN R.S. Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, **10**, 510-516.
- LEE D.H., ZO Y.G., KIM S.J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 3112-3120.
- LIM, GONG J., COTTRILL M., YU H., DE LANGE C., BURTON J., TOPP E. Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **54**, 13-20.
- MAARIT NIEMI R., HEISKANEN I., WALLENIOUS K., LINDSTROM K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods*, 2001, **45**, 155-165.
- MACFARLANE S., MACFARLANE G.T., ALLEN I., LASKIN J.W.B.A.G.M.G. Bacterial diversity in the human gut. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004, **54**, 261-289.
- MANZ W. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Res.*, 1994, **28**, 1715-1723.
- MARCY Y., ISHOEY T., LASKEN R.S., STOCKWELL T.B., WALENZ B.P., HALPERN A.L., BEESON K.Y., GOLDBERG S.M., QUAKE S.R. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS Genet.*, 2007, **3**, 1702-1708.
- MARSH T.L., SAXMAN P., COLE J., TIEDJE J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 3616-3620.
- MATHIEU-DAUDE F., WELSH J., VOGT T., MCCLELLAND M. DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 2080-2086.
- MCCLELLAND M., WELSH J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Genome Res.*, 1994, **4**, S59-65.
- MCINERNEY J.O., WILKINSON M., PATCHING J.W., EMBLEY T.M., POWELL R. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 1646-1648.
- MEADE H.M., LONG S.R., RUVKUN G.B., BROWN S.E., AUSUBEL F.M. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 1982, **149**, 114-122.

- MEDINA A., MATEO R., LOPEZ-OCANA L., VALLE-ALGARRA F.M., JIMENEZ M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 4696-4702.
- MEN A.E., BORISOV A.Y., ROZOV S.M., USHAKOV K.V., TSYGANOV V.E., TIKHONOVICH I.A., GRESSHOFF P.M. Identification of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis-ineffective sym31 mutation of pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 1999, **98**, 929-936.
- MEUDT H.M., CLARKE A.C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.*, 2007, **12**, 106-117.
- MICHELLAND R., COMBES S., CAUQUIL L., GIDENNE T., MONTEILS V., FORTUN-LAMOTHE L. Characterization of bacterial communities in caecum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). In : proceedings of the 9th World Rabbit Congress, June 10-13, 2008, Verona. World Rabbit Science Association : Paris, 2008, 1025-1030.
- MOORE P.B., STEITZ T.A. The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, **72**, 813-850.
- MOYER C.L., DOBBS F.C., KARL D.M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 871-879.
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1986, **51 Pt 1**, 263-273.
- MULLIS K.B. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonucleic acid fusion. *PCR Methods Appl.*, 1991, **1**, 1-4.
- MUYZER G., DE WAAL E.C., UITTERLINDEN A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 695-700.
- MYERS R.M., FISCHER S.G., LERMAN L.S., MANIATIS T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**, 3131-3145.
- NAGASE N., SASAKI A., YAMASHITA K., SHIMIZU A., WAKITA Y., KITAI S., KAWANO J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.*, 2002, **64**, 245-250.
- NAGPAL M.L., FOX K.F., FOX A. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *J. Microbiol. Methods*, 1998, **33**, 211-219.
- NATARAJ A.J., OLIVOS-GLANDER L., KUSUKAWAN., HIGHSMITH W.E., JR. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 1999, **20**, 1177-1185.
- NOCKER A., BURR M., CAMPER A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.*, 2007, **54**, 276-289.
- NOLLER H.F. Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 119-162.
- OLSEN G.J., LANE D.J., GIOVANNONI S.J., PACE N.R., STAHL D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1986, **40**, 337-365.
- ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 2766-2770.
- OXFORD NANOPORE TECHNOLOGY Nanopore sequencing of genomes. [en ligne] Adresse url : <http://www.nanoporetech.com/sections/index/52>, consulté le 19/05/2009.
- PECCOUD J., JACOB C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys. J.*, 1996, **71**, 101-108.
- PEINADO M.A., MALKHOSYAN S., VELAZQUEZ A., PERUCHO M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, **89**, 10065-10069.
- PENG Y., JIN J., WU C., YANG J., LI X. Orthogonal array design in optimizing ERIC-PCR system for fingerprinting rat's intestinal microflora. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 2095-2101.
- PODAR M., ABULENCIA C.B., WALCHER M., HUTCHISON D., ZENGLER K., GARCIA J.A., HOLLAND T., COTTON D., HAUSER L., KELLER M. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 3205-3214.
- PRAVIN D., ATYA K., PUROHIT H.J. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2007, **14**, 7-11.
- PRIETO C., JARA C., MAS A., ROMERO J. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **115**, 348-355.
- QUELLE L.S., CATALANO M. Efficacy of two DNA fingerprinting methods for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2001, **39**, 215-223.
- RAGHUNATHAN A., FERGUSON

- H.R., JR., BORNARTH C.J., SONG W., DRISCOLL M., LASKEN R.S. Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 3342-3347.
- RAHALKAR M., SCHINK B. Comparison of aerobic methanotrophic communities in littoral and profundal sediments of Lake Constance by a molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 4389-4394.
- RANDEZZO C.L., HEILIG H., RESTUCCIA C., GIUDICI P., CAGGIA C. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **99**, 251-258.
- RANJARD L., POLY F., LATA J.C., MOUGEL C., THIOULOUSE J., NAZARET S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4479-4487.
- RICHARDS J.D., GONG J., LANGE C.F.M.D. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.*, 2005, **85**, 421-435.
- ROSA G.L., CAROLIS E.D., SALI M., PAPACCHINI M., RICCARDI C., MANSIA, PABA E., ALQUATI C., BESTETTI G., MUSCILLO M. Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rRNA gene sequencing and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Microbiol. Res.*, 2006, **161**, 150-157.
- RÖSCH C., EILMUS S., BOTHE H. Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, **34**, 169-173.
- ROSENBAUM V., RIESNER D. Temperature-gradient gel electrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem.*, 1987, **26**, 235-246.
- SADEGHIFARD N., GÜRTLER V., BEER M., SEVIOUR R.J. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 7311-7323.
- SATOKARI R.M., VAUGHAN E.E., SMIDT H., SAARELA M., MATTO J., DE VOS W.M. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003, **26**, 572-584.
- SAVELKOUL P.H.M., AARTS H.J.M., DE HAAS J., DIJKSHOORN L., DUIM B., OTSEN M., RADEMAKER J.L.W., SCHOOLS L., LENSTRA J.A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 3083-3091.
- SCHUURMAN T., DE BOER R., PATTY R., KOOISTRA-SMID M., VAN ZWET A. Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for a *Salmonella enterica* 5'-nuclease assay. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **71**, 238-245.
- SCHWIEGER F., TEBBE C.C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4870-4876.
- SCUPHAM A.J. Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **60**, 136-147.
- SELVAKUMAR N., DING B.C., WILSON S.M. Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *Biotechniques*, 1997, **22**, 604-606.
- SETTE L., SIMIONI K., VASCONCELLOS S., DUSSAN L., NETO E., OLIVEIRA V. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, **91**, 253-266.
- SHARKEY F.H., BANAT I.M., MARCHANT R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 3795-3806.
- SHARMA S., RADL V., HAI B., KLOOS K., MRKONJIC FUKA M., ENGEL M., SCHAUSS K., SCHLOTTER M. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **68**, 445-452.
- SHINZATO N., MURAMATSU M., MATSUI T., WATANABE Y. Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, **71**, 906-915.
- SINGH B.K., TATE K.R., KOLIPAKA G., HEDLEY C.B., MACDONALD C.A., MILLARD P., MURRELL J.C. Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5153-5161.
- SINGLETON D.R., FURLONG M.A., RATHBUN S.L., WHITMAN W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4374-4376.
- SIQUEIRA J.F., ROCAS I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections - Part 1: current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J. Endod.*, 2005, **31**, 411-423.
- SMALLA K., OROS-SICHLER M., MILLING A., HEUER H., BAUMGARTE S., BECKER R., NEUBER G., KROPF S., ULRICH A., TEBBE C.C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *J. Microbiol. Methods*, 2007, **69**, 470-479.
- SORENSEN K.B., TESKEA. Stratified communities of active *Archaea* in deep marine subsurface sediments.

- Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 4596-4603.
- SOULTOS N., MADDEN R.H. A genotyping investigation of the colonization of piglets by *Campylobacter coli* in the first 10 weeks of life. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **102**, 916-920.
- STAHL D.A., LANE D.J., OLSEN G.J., PACE N.R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**, 1379-1384.
- STEEMERS F.J., GUNDERSON K.L. Illumina, Inc. *Pharmacogenomics*, 2005, **6**, 777-782.
- STERNM.J., AMESG.F., SMITHN.H., ROBINSON E.C., HIGGINS C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 1984, **37**, 1015-1026.
- SUCHODOLSKI J.S., RUAUX C.G., STEINER J.M., FETZ K., WILLIAMS D.A. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 4702-4708.
- SUNDIN G.W., DOMEZAS D.H., BENDER C.L. Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 4421-4431.
- SWEENEY R.W., WHITLOCK R.H., MCADAMS S.C. Comparison of three DNA preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth in an automated broth culture system. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2006, **18**, 587-590.
- THIES F.L., KONIG W., KONIG B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *J. Med. Microbiol.*, 2007, **56**, 755-761.
- TOBES R., PAREJA E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC Genomics*, 2006, **7**, 62.
- TORSVIK V., DAAE F.L., SANDAA R.-A., OSLASH, VREAS L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.*, 1998, **64**, 53-62.
- TOTH I.K., AVROVA A.O., HYMAN L.J. Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4070-4076.
- VAN DE PEER Y., CHAPELLE S., DE WACHTER R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* 1996, **24**, 3381-3391.
- VAN DER VLIET G.M., SCHEPERS P., SCHUKKINK R.A., VAN GEMEN B., KLATSER P.R. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 1959-1965.
- VENTER J.C., REMINGTON K., HEIDELBERG J.F., HALPERN A.L., RUSCH D., EISEN J.A., WU D., PAULSEN I., NELSON K.E., NELSON W., FOUTS D.E., LEVY S., KNAP A.H., LOMAS M.W., NEALSON K., WHITE O., PETERSON J., HOFFMAN J., PARSONS R., BADEN-TILLSON H., PFANNKOCHE C., ROGERS Y.-H., SMITH H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, **304**, 66-74.
- VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**, 6823-6831.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ET AL. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995, **23**, 4407-4414.
- WANG P., LI X., XIANG M., ZHAI Q. Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors by 16S-rRNA analysis. *J. Biosci. Bioeng.*, 2007, **103**, 563-567.
- WANG Q., GARRITY G.M., TIEDJE J.M., COLE J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5261-5267.
- WELSH J., MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 7213-7218.
- WHITEHOUSE C.A., HOTTEL H.E. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol. Cell. Probes*, 2007, **21**, 92-96.
- WILLIAMS J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 6531-6535.
- WILSON I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3741-3751.
- YE N.F., LU F., SHAO L.M., GODON J.J., HE P.J. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 1055-1065.
- YU Z., MORRISON M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 4800-4806.
- ZENG Y., LIU W., LI H., YU Y., CHEN B. Effect of restriction endonucleases on assessment of biodiversity of cultivable polar marine planktonic bacteria by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Extremophiles*, 2007, **11**, 685-692.
- ZHANG B.W., LI M., MA L.C., WEI F.W. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochem. Genet.*, 2006, **44**, 503-512.
- ZHANGK., MARTINYA.C., REPPAS N.B., BARRY K.W., MALEK J., CHISHOLM S.W., CHURCH G.M. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 680-686.

OBJECTIFS

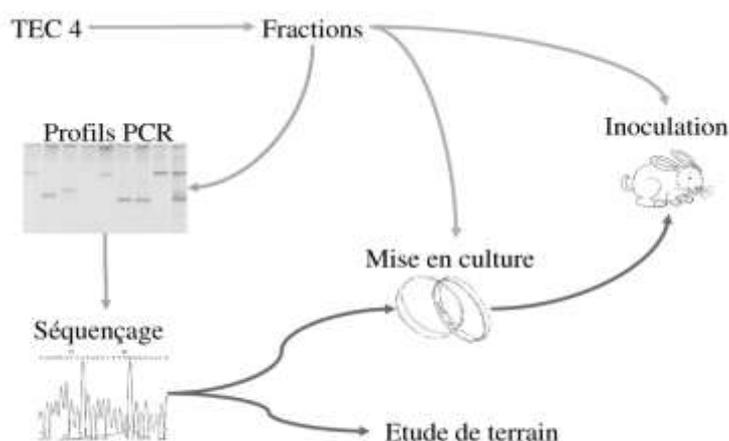
L'agent étiologique responsable de l'EEL semble être bactérien mais difficilement, voire non cultivable. D'un autre côté, les inoculums de référence (TEC) ont une flore bactérienne très riche puisqu'ils proviennent de contenu digestif. De plus, la seule méthode pour vérifier la présence de l'agent responsable de l'EEL est l'inoculation de lapins sensibles. Afin de pallier ces différentes contraintes, les schémas expérimentaux suivants ont été mis en place.

Premièrement l'étude de l'inoculum de référence TEC4 qui se divise en trois parties (figure 2)

- Tester différentes méthodes de fractionnement ou appauvrissement de l'inoculum TEC4 et vérifier la virulence et la composition bactérienne d'un point de vue qualitatif et quantitatif de ces fractions

- Comparer les fractions obtenues entre elles et avec des témoins négatifs grâce à des techniques de biologie moléculaires telles que les profils de restriction du gène 16SrDNA, les gels à gradient de dénaturant et les PCR aléatoires.

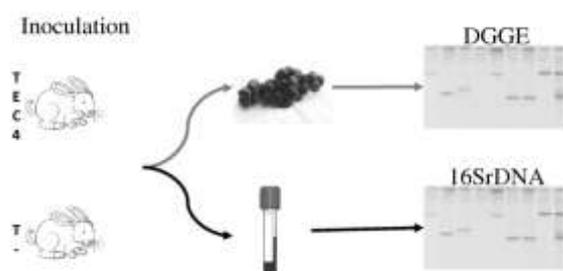
FIGURE 2 : SCHEMA EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DU TEC4



- Vérifier la présence des séquences d'intérêt obtenues à l'étape précédente sur le terrain, identifier les espèces porteuses de ces séquences et les inoculer à des lapins sensibles

Deuxièmement une étude comparative de prélèvements sanguins et fécaux réalisés pendant une inoculation de TEC4 sur les lapins inoculés et les lapins malades (figure 3) :

FIGURE 3 : SCHEMA EXPERIMENTAL DU PROTOCOLE AVANT-APRES



- Etudier par DGGE l'évolution de la flore fécale en cours d'inoculation

- Etudier la présence d'une bactériémie lors de la phase précoce de la maladie par amplification de séquences bactériennes dans le sang.

Troisièmement une étude comparative des inoculums virulents et non virulents grâce au pyroséquençage d'une fraction du gène 16SrDNA sur le Roche FLX Genome Sequencer.

PARTIE EXPERIMENTALE

Ce chapitre sera présenté en trois parties : une comparaison du TEC4 et des ses fractions par la bactériologie classique, les tentatives d'identification de l'agent grâce à la génétique moléculaire par PCR (différentes approches) et une comparaison de différentes fractions par pyroséquençage.

I. COMPARAISON DU TEC4 ET DE SES FRACTIONS PAR LA BACTERIOLOGIE CLASSIQUE

Comme décrit dans l'introduction, l'inoculum de référence TEC4 provient de contenu caecal et a donc une flore bactérienne très riche. Des méthodes de fractionnements ont déjà été utilisées : filtrations, centrifugations, ultracentrifugations, traitements thermiques, traitements au chloroforme-éthanol et centrifugations sur gradient discontinu de sucrose. Cette dernière méthode prometteuse a été appliquée au TEC4 pour cette étude. Ce premier traitement a été suivi par un test d'adhérence sur culture cellulaire. Enfin, de nouvelles techniques de fractionnement ont également été appliquées au TEC4: le traitement aux antibiotiques et le traitement à l'acide.

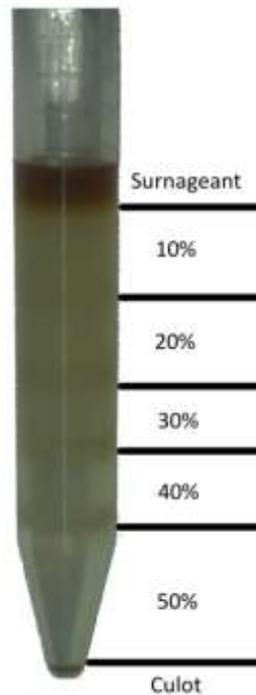
Les différentes fractions ont été systématiquement analysées grâce à des techniques de bactériologie classique : identification des espèces cultivables sur milieux usuel, comptage des UFC/mL et comptages des bactéries morphologiquement différentes sur des colorations de Gram. Elles ont également été inoculées à des lapins sensibles afin de confirmer leur pouvoir de virulence.

1. FRACTIONNEMENTS

a. CENTRIFUGATION SUR GRADIENT DISCONTINU DE SUCROSE

Le TEC4 a été fractionné par centrifugation sur coussin de sucrose en suivant la méthode développée par Szalo et al (2007). Cinq solutions de sucrose (10 %, 20 %, 30 %, 40 % et 50 % poids/volume) sont préparées dans de l'eau distillée, puis stérilisées par filtration au travers d'une membrane de 0,2µm. Les différentes solutions sont délicatement superposées dans un tube de 15mL, les fractions les plus denses en dessous. Un millilitre de TEC4 est déposé par-dessus. Le tube est ensuite centrifugé à 1780g pendant 20 minutes à 4°C. Les fractions « surnageant, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % et culot » sont séparées (figure 4). Elles sont ensuite centrifugées à 20 000g pendant 3 minutes à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots re-suspendus dans 2mL de NaCl à 0,9 %. Deux lavages sont réalisés (centrifugation 20 000g, 3 min, 4°C, re-suspension dans 2mL de NaCl à 0,9 %). Les culots sont finalement re-suspendus dans 0,5mL de NaCl à 0,9%.

FIGURE 4: RESULTAT D'UNE CENTRIFUGATION DE TEC4 SUR GRADIENT DISCONTINU DE SUCROSE



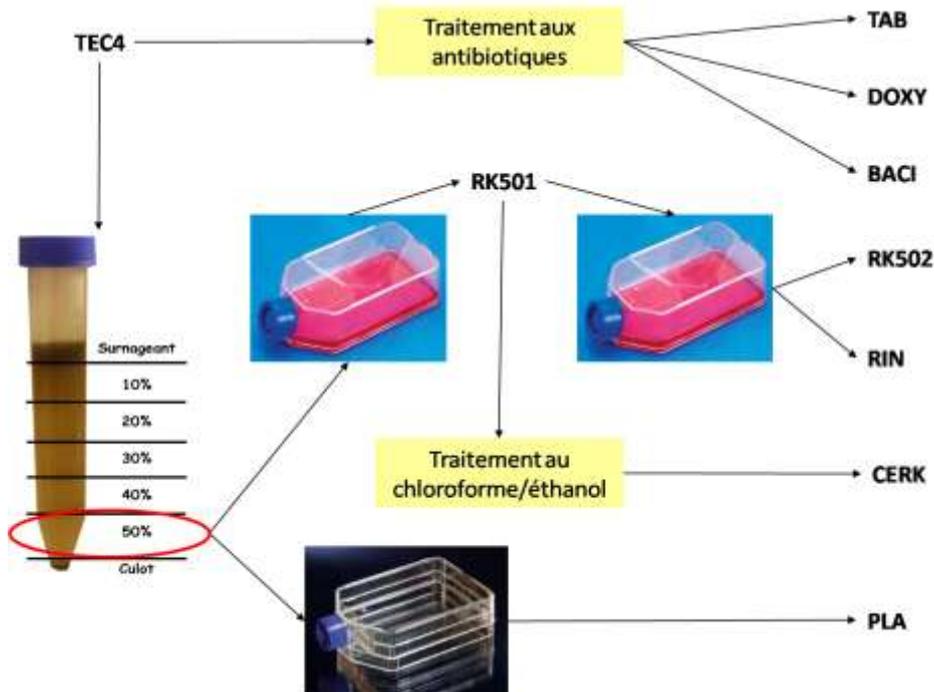
b. ADHÉRENCE CELLULAIRE

Pour ce mode de fractionnement, une boîte de culture de cellules de reins de lapins (RK13) de 75cm² à confluence est utilisée. Vingt-quatre heures avant l'inoculation, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans antibiotique après un double rinçage au phosphate buffer saline (PBS) stérile. Après 24h, le milieu sans antibiotique est éliminé, puis les boîtes sont inoculées au moyen d'un millilitre de la fraction 50% obtenue par centrifugation sur gradient de sucrose. Après 4h d'incubation à 37°C, l'inoculum est aspiré et le tapis cellulaire est rincé trois fois au PBS stérile. Les cellules et les bactéries adhérentes sont raclées et suspendues dans 1mL de milieu de culture sans antibiotique, puis congelées afin de lyser les cellules. L'inoculum obtenu est dénommé "RK501".

Un second passage identique est ensuite réalisé en utilisant la fraction RK501 comme inoculum permettant d'obtenir la fraction "RK502". Le dernier liquide du rinçage (2mL) au PBS stérile est conservé comme témoin : cet inoculum est appelé RIN. Afin de vérifier les capacités potentielles d'adhérence de l'agent au plastic polarisé de la boîte de culture, un fractionnement témoin a été réalisé de manière identique sur des boîtes de culture cellulaire vides. Un seul passage a été effectué pour réaliser l'inoculum "PLA".

Ces deux premières méthodes de fractionnement sont résumées à la figure 5.

FIGURE 5 : SCHEMA DE DIFFERENTS FRACTIONNEMENTS REALISES



La lignée cellulaire RK13 est cultivée à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté avec 100,000 unités/L de pénicilline, 100 mg/L de streptomycine sulfate, 5mL/L de MEM (100x) acides aminés non essentiels (Invitrogen), 2,5 mg/L de natamycine et 5% de sérum fœtal bovin décomplémenté.

Pour répliquer les cellules RK13, des tapis cellulaires à confluences sont mis en suspension après trypsination (1mL de trypsine à 0,25% pour 75cm² pendant 5min) dans du milieu de culture puis réparti dans les flacons de culture à raison de ½ volume pour obtenir un tapis cellulaire à confluence en 24H, ⅓ du volume pour l'obtenir en 72H ou 1/5 du volume pour l'obtenir en 7 jours.

C. TRAITEMENT AU CHLOROFORME ÉTHANOL

La fraction RK501 a été traitée au moyen d'une solution de CHCl₃ / éthanol (25 / 75%) dans un rapport volume / volume de 1 / 2. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 1 heure sous agitation constante. Après lavage, les bactéries ont été remises en suspension dans du PBS. L'inoculum obtenu a été appelé CERK.

d. ANTIBIOGRAMMES

Les antibiogrammes ont été réalisés sur boîtes de gélose Columbia au sang de mouton, car une différence dans la croissance des flores bactériennes a été observée par rapport au milieu de Mueller-Hinton qui semble plus sélectif. Les boîtes de gélose Columbia ont été ensemencées avec 10µL de TEC4 (dilué 10 fois), 50% et RK501. Les pastilles d'antibiotiques (tableau 3) ont été déposées sur les géloses. Les boîtes ont été incubées 24h en aérobie et anaérobie. Les diamètres des zones d'inhibition présentés dans le tableau 3 permettent de classer l'effet d'appauvrissement potentiel des différents antibiotiques sur le TEC et ses fractions. Parmi les antibiotiques les plus actifs se trouvent : l'ampicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, la cefquinome, la tylosine, la tétracycline, la doxycycline, la marbofloxacin, le chloramphénicol et le florfénicol. À l'exception de la tylosine et

Partie expérimentale

de la doxycycline, aucun de ces antibiotiques n'est employé en élevage. Les zones d'inhibition observées avec la bacitracine, seul antibiotique efficace contre l'EEL, sont de faibles diamètres (maximum 14mm).

TABLEAU 3: DIAMETRES D'INHIBITION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE PAR LA METHODE DE DIFFUSION DE DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES SUR TEC4, 50% ET RK501

Molécule	TEC4		50%		RK501	
	anaéro	aéro	anaéro	aéro	anaéro	aéro
Acide nalidixique (30µg)	6	6	6	6	6	6
Amikacine (30µg)	6	6	6	6	6	6
Amoxicilline / ac clavulanique (30µg)	22	27	19	21	30	30
Ampicilline (10µg)	25	22	11	17	22	20
Bacitracine (10UI)	8	14	12	6	14	13
Cefquinome (10µg)	20	8	14	8/22	25	30
Ceftiofur (30µg)	14	6	6	6	6	6
Cefuroxim (30µg)	6	6	6	6	6	6
Céphalothin (30µg)	19	20	6	6	6	6
Chloramphénicol (30µg)	26	20	10/21	21	22	30
Clindamycine (2UI)	6	14	6	11	15	15
Colistine (50µg)	6	6	6	6	6	6
Doxycycline (30µg)	22	8	20	30	30	30
Enrofloxacin (5µg)	6	30	6	13	17	18
Erythromycine (15UI)	6	14	6/20	11	24	26
Florfenicol (30µg)	30	30	24	30	30	30
Gentamicine (10µg)	6	14	6	13	6	17
Kanamycine (30UI)	6	15	6	6	6	6
Lincomycine (5µg)	6	10	7	14	16	20
Marbofloxacin (5µg)	18	30	14	13	14	20
Néomycine (30µg)	6	12	7	14	6	17
Novobiocine (30µg)	15	14	11	20	16	14
Pénicilline (10µg)	20	14	6	6	16	14
Spiramycine (100µg)	6	19	15	20	20	30
Streptomycine (10µg)	6	21	6	6	6	6
Trimetoprim / Sulfamidés (30µg)	6	6	6	6	6	6
Tétracycline (25µg)	17	10	14	30	30	30
Tylosine (30µg)	8/31	30	8/30	30	8/30	30
Vancomycine (30µg)	17	26	16	16	20	20

e. TRAITEMENT AUX ANTIBIOTIQUES

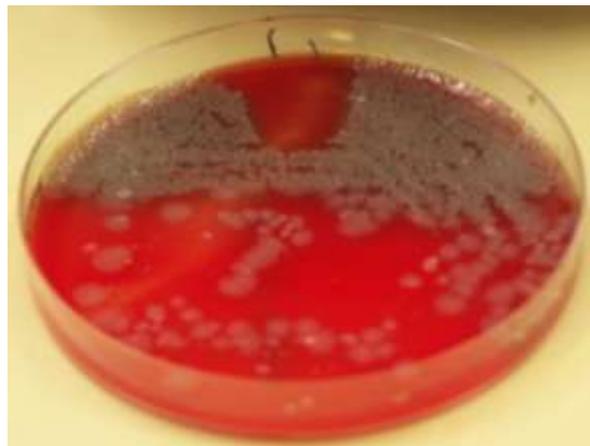
Le TEC4 a été suspendu dans du milieu de Schaedler, liquide enrichi en sérum de cheval (50 mL/L) dans un rapport 1/1 V / V, puis conservé 3h à 37°C. Les antibiotiques ont ensuite été ajoutés selon les concentrations données dans le tableau 4. La suspension a été incubée pendant 24h à 37°C puis centrifugée 3min à 20 000g à 4°C ; le surnageant est éliminé et le culot bactérien re-suspendu dans du liquide physiologique au volume initial avant de subir un double lavage selon la même méthode afin d'éliminer les traces d'antibiotiques. Huit antibiotiques ont été employés (tableau 4), un inoculum témoin positif (TAB) a subi le même traitement sans antibiotique.

TABLEAU 4: ANTIBIOTIQUES ET CONCENTRATIONS UTILISES POUR L'APPAUVRISSMENT DU TEC4

Antibiotique	Concentration (µg/mL)	Nom de la fraction
Amoxicilline / acide clavulanique	3/5	AMC
Ceftiofur	3	CEF
Streptomycine	9	STREP
Tylosine	2	TYL
Doxycycline	2	DOX
Vancomycine	5	VAN
Bacitracine	3	BACI
Novobiocine	2	NOVO

Eu égard à l'effet limité du traitement aux antibiotiques observés lors des premiers essais, le protocole a été modifié pour tenter d'en améliorer le rendement. La concentration en vancomycine a été augmentée aux doses de 10µg/mL, 25µg/mL et 50µg/mL. Aucun des différents traitements n'a permis de mettre en évidence une diminution significative des bactéries Gram positives. Pourtant, malgré les trois lavages par centrifugation, les concentrations d'antibiotiques restant dans les inoculums traités avec 25µg/mL et 50µg/mL de vancomycine sont suffisantes pour induire un effet bactéricide, comme le montre la zone d'inhibition des bactéries poussant sur la gélose (figure 6).

FIGURE 6 : EFFET BACTERICIDE DES RESTES D'ANTIBIOTIQUE PRESENTS DANS LE TEC4 TRAITÉ AVEC 50µg/ML DE VANCOMYCINE



La durée du traitement a également été augmentée à 48h, 96h et 192h pour deux antibiotiques (vancomycine et doxycycline). Ces nouveaux inoculums ont été comparés selon les techniques décrites au point 3 de ce chapitre (page 59).

Les dénombrements des UFC sont présentés aux tableaux 5 et 6. Aucune différence significative des UFC en fonction du traitement n'a pu être mise en évidence même lorsque la durée du traitement était de 8 jours. De même, aucune différence significative n'a été observée selon le milieu d'incubation utilisé (Schaedler ou liquide physiologique).

TABLEAU 5 : UFC EN AEROBIOSE DES DIFFERENTS PROTOCOLES TESTES POUR OPTIMISER LES TRAITEMENTS AUX ANTIBIOTIQUES

Milieu de traitement	Liquide physiologique (UFC/mL)			Schaedler (UFC/mL)		
	Physio	Vancomycine	Doxycycline	Physio	Vancomycine	Doxycycline
Traitement						
24h	$5,5 \cdot 10^7$	$1,12 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^7$	$1,26 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^4$
48h	$5,4 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^4$	$5,8 \cdot 10^7$	$1,34 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^4$
96h	$5,7 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^7$	10^4	$5,5 \cdot 10^7$	$1,02 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^4$
192h	$5,1 \cdot 10^7$	$1,16 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^7$	$1,17 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^4$

TABLEAU 6 : UFC EN ANAEROBIOSE DES DIFFERENTS PROTOCOLES TESTES POUR OPTIMISER LES TRAITEMENTS AUX ANTIBIOTIQUES

Milieu de traitement	Liquide physiologique (UFC/mL)			Schaedler (UFC/mL)		
	Physio	Vancomycine	Doxycycline	Physio	Vancomycine	Doxycycline
Traitement						
24h	$>5 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$>10^9$	$>10^8$	$2,8 \cdot 10^7$
48h	$>5 \cdot 10^8$	10^7	$2 \cdot 10^7$	$>10^9$	$>10^8$	$3 \cdot 10^7$
96h	$>5 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^7$	10^7	$>10^9$	$>10^8$	$1,6 \cdot 10^7$
192h	$>5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	$>10^9$	$1,3 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$

En conclusion, peu importe la durée du traitement antibiotique et le milieu dans lequel il est effectué, cette méthode de fractionnement ne permet pas un appauvrissement net de la flore des inoculums. Les bactéries en « dormance » ne sont apparemment pas détruites par l'antibiotique, même si celui-ci est actif sur une gélose, comme le montre l'expérience avec les concentrations élevées de vancomycine.

f. TRAITEMENT PAR ACIDIFICATION

MISE AU POINT

Deux protocoles d'acidification ont été testés : l'adjonction directe de HCl 37% dans du contenu caecal de lapin sain (TEM2) jusqu'à l'obtention d'un pH 2,2 ou la dilution en tampon phosphate-citrate ($C_3H_5O(COOH)_3 + Na_2HPO_4 \rightleftharpoons C_3H_5O(COO)_3^{3-} + PO_4^{3-} + 4H^+ + 2Na^+$) au rapport $\frac{1}{4}$ de TEM2 et $\frac{3}{4}$ de tampon. Ce dernier était préparé par mélange de 1,60mL de phosphate disodique (Na_2HPO_4) à 0,5M et de 39,20mL d'acide citrique ($C_3H_5O(COOH)_3$) à 0,5M afin d'obtenir un pH égal à 2,2. Les contenus caecaux traités ainsi qu'un témoin négatif contenant uniquement du TEM2 ont été conservés à 37°C et 20°C pendant 1h, 2h, 4h, 8h, 24h et 48h puis lavés deux fois par centrifugation (3 min à 20 000g à 4°C) et re-suspendus dans du liquide physiologique.

Dix microlitres de chaque fraction ont été fixés sur lame et colorés par la technique de Gram. Une estimation de la quantité de débris, de bactéries et la qualité de celles-ci a été réalisé pour chaque fraction. Ces inoculums ont été comparés selon les techniques décrites au point 3 de ce chapitre (page 59).

Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux températures et les deux traitements (HCl 37% et tampon citrate-phosphate) testés. Après une heure, l'examen microscopique des fractions traitées avec le HCl et le tampon citrate-phosphate montrent la présence de plus de débris bactériens que dans les témoins, mais la flore est semblable. Les prélèvements à 2h, 4h, 7h et 24h donnent une image assez semblable : bactéries en amas, présence de nombreux débris et quantité de bactéries fixées plus faible. Les membranes des bactéries présentes dans les inoculums traités au HCl sont déformées, laissant supposer une certaine souffrance ; ce phénomène n'est pas observé

dans les inoculums traités au tampon citrate-phosphate. L'apparition de débris est plus flagrante après 4h d'incubation aux quatre températures testées. Après 24h, le témoin contient beaucoup plus de spores (environ 30 à 40 par champ) par rapport aux fractions traitées (0 à 5 par champ). Après 48h, la flore des inoculums traités ne diffère plus de celle du témoin. Le traitement à l'HCl a été abandonné, de même que les fractions gardées 2h, 4h, 7h et 48h. Les dénombrements des UFC sont présentés au tableau 7.

TABEAU 7 : UFC/ML DE DIFFERENTS PROTOCOLES TESTES POUR OPTIMISER LES ACIDIFICATIONS DU TEC4

	UFC/mL moyen en aérobiose		UFC/mL moyen en anaérobiose	
	Tampon	HCl	Tampon	HCl
4h	1,11.10 ⁶	1,29.10 ⁶	1,95.10 ⁷	1,63.10 ⁷
24h	5,6.10 ⁵	7,2.10 ⁵	1,17.10 ⁷	1,06.10 ⁷

TRAITEMENT RETENU

Cinq millilitres d'inoculum ont été dilués dans 15mL de tampon phosphate-citrate ($C_3H_5O(COOH)_3 + Na_2HPO_4 \rightleftharpoons C_3H_5O(COO)_3^- + PO_4^{3-} + 4H^+ + 2Na^+$) préparé tel que décrit plus haut et conservé pendant 24h à 37°C. Les bactéries ont ensuite été lavées deux fois par centrifugation (3min à 20 000g à 4°C) et re-suspendues dans 5mL de liquide physiologique et stockées à -20°C. Le TEC4 et la fraction 50% traités à l'acide ont été appelés respectivement TEPH et 50PH.

2. INOCULATIONS

A l'exception de l'inoculation des fractions antibiotiques qui a été réalisée dans les animaleries du Secteur Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes (CARL), toutes les inoculations ont été réalisées à l'unité de recherche en Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Tours. Les animaux étaient maintenus dans les conditions environnementales recommandées par le comité d'éthique animale de l'ULg pour le CARL (n° 373) et par le comité consultatif commun d'éthique Inra-Cirad pour l'IASP (n°4587).

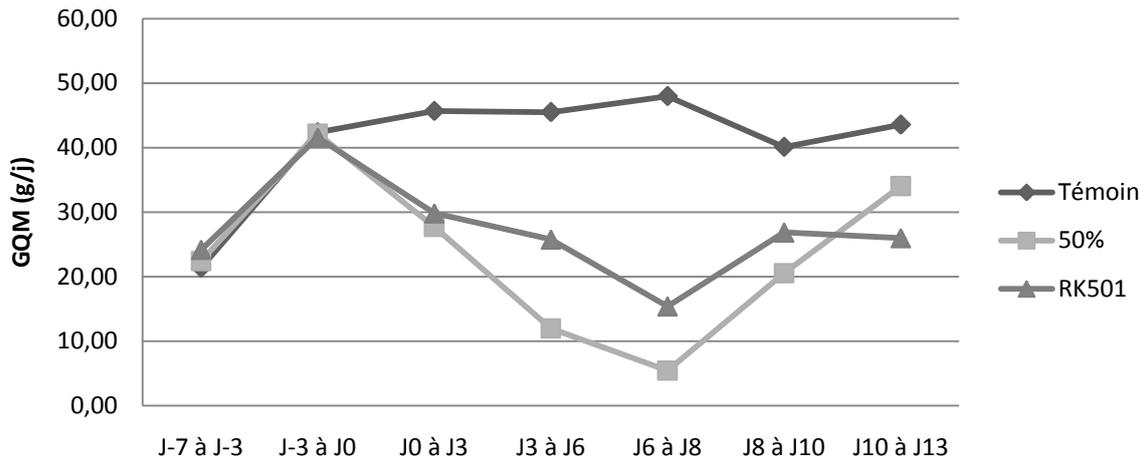
a. 50% ET RK501

Cinquante-quatre lapereaux néo-zélandais EOPS de 4 semaines ont été répartis en trois lots de 18 animaux à raison de 6 groupes de 3 lapins par cage. Dix-huit lapins ont été inoculés per os avec 100µL de la fraction 50% par animal, dix-huit avec 100µL de la fraction RK501 par animal et dix-huit avec 100µL de contenu caecal de lapin EOPS par animal. Ce dernier groupe a servi de témoin négatif. Tous les animaux ont été pesés 7 et 4 jours avant l'inoculation puis à J0, J3, J6 et J8 après inoculation. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et sur base du taux de mortalité.

Les signes cliniques et les lésions classiques ont été reproduits dans les deux lots. La mortalité et la morbidité ont été respectivement de 28% et 94% pour le lot 50% et de 11% et 94% pour le lot RK501. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus lors d'une inoculation de TEC4. La courbe d'évolution du GQM est présentée à la figure 7.

Partie expérimentale

FIGURE 7 : EVOLUTION DES GQM LORS DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES AVEC LES FRACTIONS RK501 ET 50%

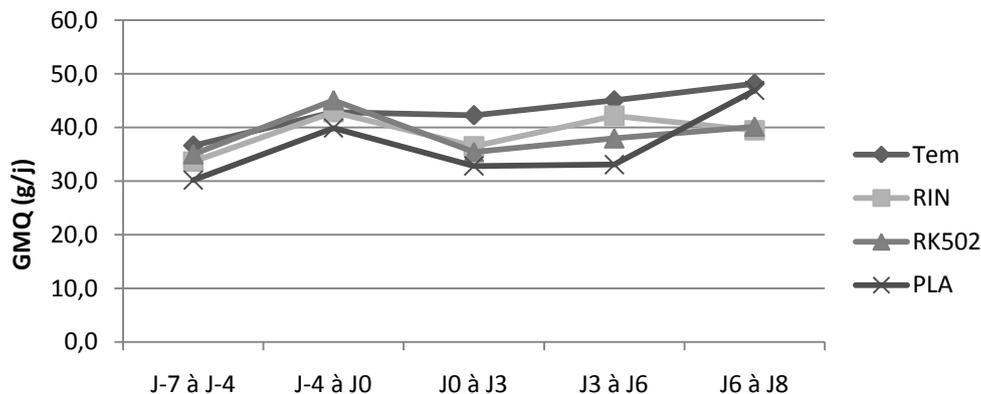


b. RK502, PLA, RIN

Septante-six lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 4 à 6 semaines ont été inoculés. Dix-huit lapins ont été inoculés par voie orale au moyen de 100 μ L de contenu caecal de lapin EOPS par animal (groupe témoin), 21 lapins au moyen de 200 μ L de RIN par animal, 18 lapins au moyen de 100 μ L de RK502 par animal et 19 lapins au moyen de 100 μ L de PLA par animal. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés 7 et 4 jours avant l'inoculation puis à J0, J1, J2, J3, J6 et J8 après inoculation.

La courbe d'évolution des GQM est présentée à la figure 8. Une chute générale du GQM est remarquée dans tous les lots, mais aucun lapin n'a présenté de chute importante pendant plusieurs jours. Deux mortalités ont été observées, une dans le lot inoculé avec la fraction RK502 et une dans le lot inoculé avec la fraction PLA. Les lésions typiques d'EEL n'ont été retrouvées que chez le lapin inoculé avec RK502.

FIGURE 8 : EVOLUTION DES GQM DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES AVEC LES FRACTIONS RK502, PLA ET RIN



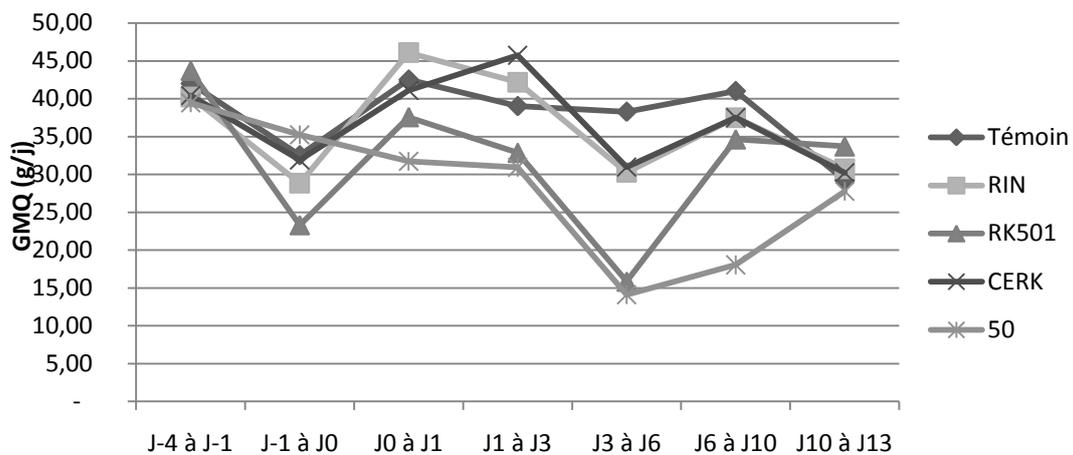
c. 50%, RK501, CERK, RIN

Nonante-six lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 4 à 6 semaines ont été inoculés. Dix-neuf lapins ont été inoculés par voie orale au moyen de 100 μ L de contenu caecal de lapin EOPS par animal

(groupe témoin), dix-neuf lapins au moyen de 200 μ L de RIN par animal, dix-neuf lapins au moyen de 100 μ L de CERK par animal, vingt lapins au moyen de 100 μ L de 50% par animal et dix-neuf lapins au moyen de 100 μ L de RK501 par animal. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés 7 et 4 jours avant l'inoculation puis à J0, J1, J3, J6, J10 et J13 après inoculation.

Les signes cliniques et les lésions classiques ont à nouveau été reproduits dans les lots 50% et RK501, la mortalité était de 5% pour les deux lots. Aucune différence significative n'a été démontrée entre les inoculums RIN, CERK et le lot témoin. La courbe d'évolution du gain quotidien moyen est présentée à la figure 9.

FIGURE 9 : EVOLUTION DES GQM DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES AVEC LES FRACTIONS RK501, RIN, CERK ET 50%

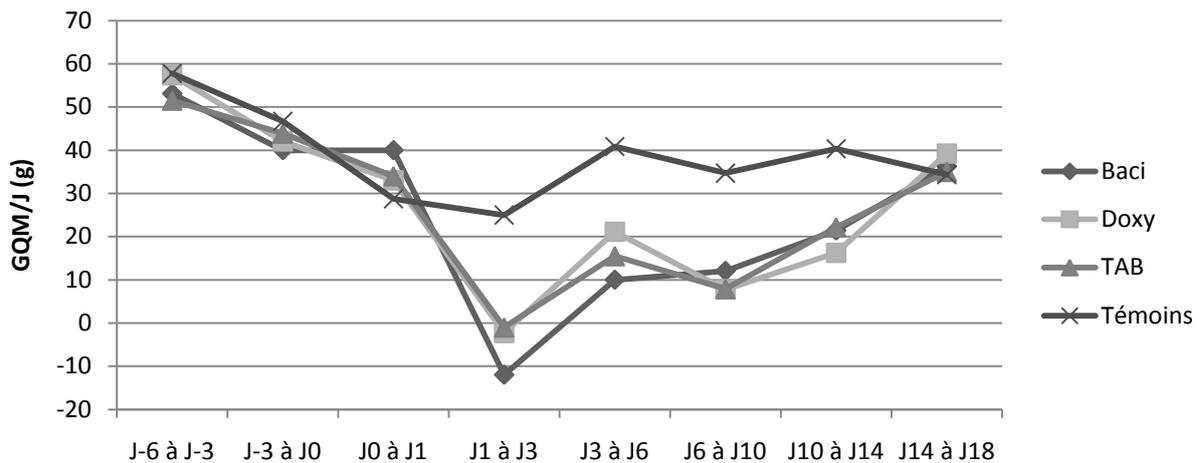


d. FRACTIONS ANTIBIOTIQUES

Trente-quatre lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 5 semaines ont été inoculés. Quatre lapins ont été inoculés par voie orale au moyen de 100 μ L de contenu caecal de lapin EOPS par animal (groupe témoin), dix lapins au moyen de 100 μ L de TAB par animal, dix-neuf lapins au moyen de 100 μ L de DOX par animal et dix lapins au moyen de 100 μ L de BACI par animal. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée ou de ballonnement et sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés quotidiennement entre le 7^{ème} jour précédant l'inoculation et le 21^{ème} jour post-inoculation (PI).

Les signes cliniques et les lésions macroscopiques classiques ont été reproduits dans les lots BACI, DOX et TAB. La morbidité et la mortalité ont été respectivement de 90% et 20% pour le lot BACI, 100% et 20% pour le lot DOX, et 80% et 30% pour le lot TAB. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors d'une inoculation de TEC4. La courbe d'évolution des GQM est présentée à la figure 10.

FIGURE 10 : EVOLUTION DES GQM LORS DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES AVEC LES FRACTIONS BACI, DOXY ET TAB



e. FRACTIONS ACIDES

Cinquante-sept lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 5 semaines ont été inoculés. Dix-huit lapins ont été inoculés avec 100µL de TEPH, 20 lapins avec 100µL de 50PH et 19 autres lapins ont servi de témoins négatifs en recevant 500µL de contenu caecal de lapin sain. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés 8 et 2 jours avant l'inoculation puis à J0, J1, J2, J5, J8 et J12 après inoculation.

Les signes cliniques et les lésions macroscopiques classiques ont été reproduits dans le lot TEPH. La courbe d'évolution des GQM est présentée à la figure 11. Une différence significative ($p < 0,001$) des GQM entre les lots inoculés avec TEPH et 50PH et le lot témoin a été remarquée. Une différence significative a également été remarquée entre les lots 50PH et TEPH. Si le lot inoculé avec TEPH montre une chute significative de J1 à J2 ($p < 0,001$), il n'en est pas de même pour le lot inoculé avec 50PH. La morbidité et la mortalité ont été respectivement de 83% et 27% pour le lot TEPH et de 44% et 5% pour le lot 50PH.

FIGURE 11 : EVOLUTION DES GQM LORS DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES AVEC TEPH ET 50PH

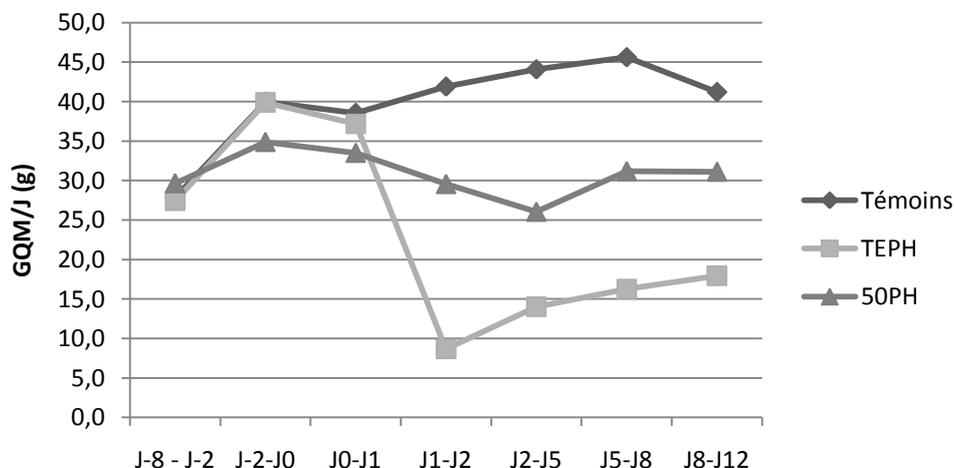


TABLEAU 8 : RESUME DES DIFFERENTES FRACTIONS INOCULEES, TAUX DE MORTALITE, MORBIDITE ET VIRULENCE.

Nom de la fraction	Méthode	Taux de morbidité	Taux de mortalité	Virulence
DOX	TEC4 traité à la doxycycline	100%	20%	+++
BACI	TEC4 traité à la bacitracine	90%	20%	+++
TAB	Témoin du traitement antibiotique	80%	30%	+++
TEPH	TEC4 traité à l'acide (pH = 2,2)	83%	27%	+++
50%	centrifugation sur gradient discontinu de sucrose (coussin 50%)	37 - 94%	16 - 28%	++
RK501	adhérence de la fraction 50 % sur des cellules RK13 (un passage)	40 - 94%	10 - 11%	++
50PH	50% traité à l'acide (pH = 2,2)	44%	5%	+/-
RK502	adhérence de la fraction 50 % sur des cellules RK13 (deux passages)	5,5%	5,5%	+/-
RIN	liquide de rinçage lors du fractionnement par adhérence cellulaire	0%	0%	-
PLA	adhérence de la fraction 50 % sur boîte de culture cellulaire vide	0%	0%	-
CERK	RK501 traité au chloroforme/éthanol	0%	0%	-

3. ETUDE BACTÉRIOLOGIQUE CLASSIQUE

a. BACTÉRIOSCOPIE

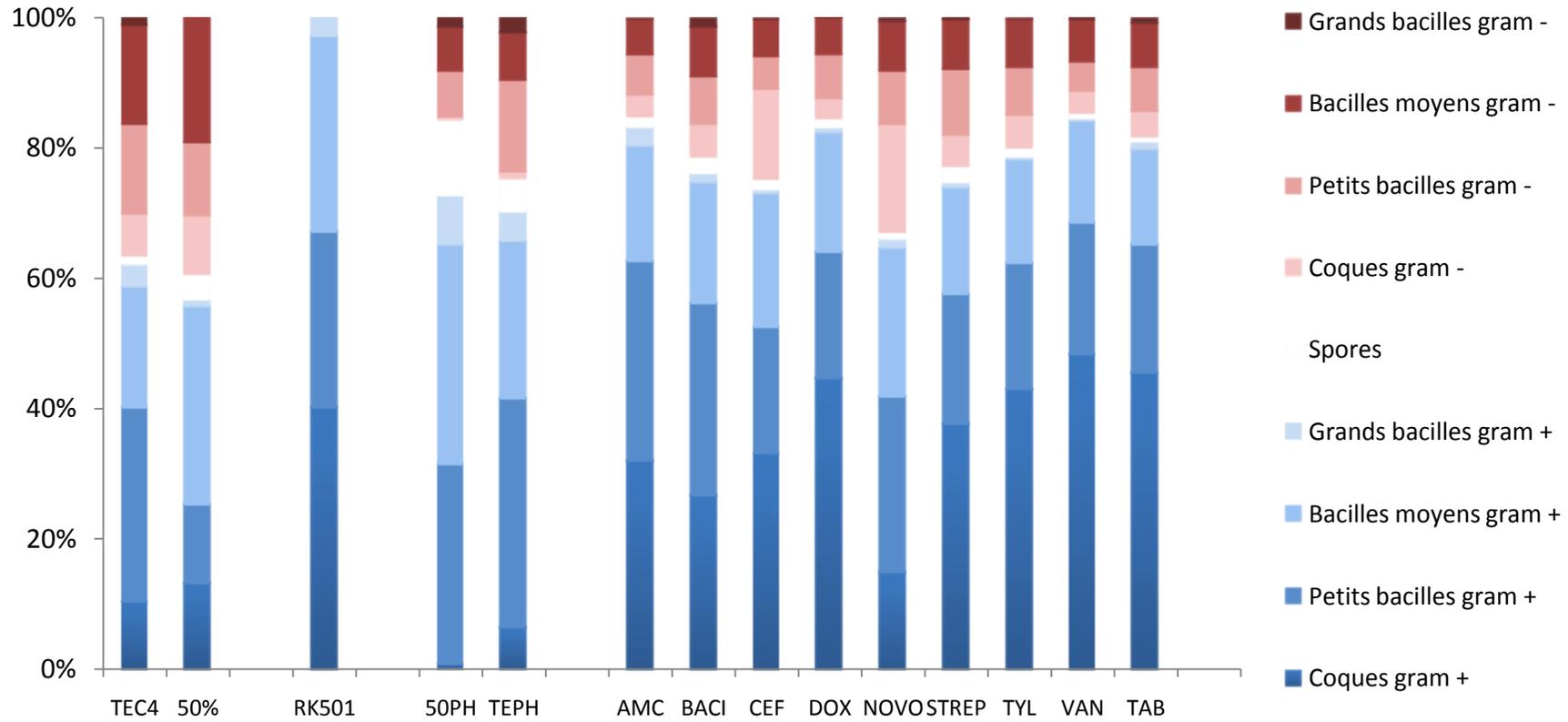
Une coloration de Gram a été effectuée sur 10 µl de chaque fraction. Quatre images ont été capturées au hasard pour chaque lame à un grossissement de 1000 fois. Toutes les bactéries présentes sur les photos ont été comptées et réparties en fonction de leurs caractéristiques tinctoriales (réaction positive ou négative à la coloration de Gram) et de leur forme (coque, bacille de petite, moyenne ou grande tailles et spores), selon le protocole décrit par Szalo et collaborateurs (2007). Une répartition moyenne en pourcentage des différents types bactériens a été calculée à partir des quatre comptages.

Les analyses bactérioscopiques des fractions permettent de comparer leurs compositions sans passer par une sélection sur boîte de culture (figure 12). La fraction 50% présente un profil très semblable à celui du TEC4 avec néanmoins plus de spores ce qui pourrait être lié au temps supplémentaire passé en aérobiose pendant le fractionnement. L'inoculum RK501 ne semble contenir que des bactéries réagissant positivement à la réaction de Gram, les spores et les bactéries réagissant négativement à la coloration de Gram n'étant pas observées.

Les fractions TEPH et 50PH sont beaucoup plus riches en bactéries Gram positives et en spores. Une prolifération importante de coques Gram positifs est remarquée dans toutes les fractions traitées aux antibiotiques, à l'exception de celle traitée à la novobiocine, et dans le témoin de ce traitement. Peu de différences sont remarquées entre les différentes fractions antibiotiques.

Partie expérimentale

FIGURE 12 : ANALYSE BACTERIOSCOPIQUE DU TEC4, DES FRACTIONS ET DU TEMOIN TEM4



b. MISE EN CULTURE SUR MILIEUX CONVENTIONNELS

Les bactéries cultivables en aérobiose (gélose au sang de mouton et MacConkey) et en anaérobiose (géloses Columbia et Schaedler au sang de mouton) dans les fractions ont été identifiées au genre et à l'espèce selon le protocole suivant. Dix microlitres de chaque fraction ont été inoculés sur les boîtes qui ont été ensuite incubées (37°C pendant 24h). Les différentes colonies ont été pré-identifiées sur base de leur morphologie, puis repiquées et identifiées selon des procédures standards (Barrow et Feltham, 1993). Des identifications précises ont été obtenues par les galeries API® 20NE, API® Coryne, API® 20 Strep et Rapid ID 32A (BioMérieux) selon les instructions du fabricant.

L'inventaire des flores bactériennes cultivables en aérobiose et en anaérobiose est présenté au tableau 9. Au total, 29 espèces différentes ont été identifiées dans le TEC4, ses différentes fractions, le TEC3 et le TEM4. Tous ces inoculum contiennent *Enterococcus faecium* à l'exception de CERK, TEPH et 50PH. Aucune fraction dérivée du TEC4 ne contient *Enterococcus faecalis*. Les clostridies sont présentes dans toutes les fractions à l'exception de celle traitée à la tylosine et du TEM4. Une série d'espèces n'avaient pas été identifiées à partir du TEC3 : *Bacteroides distasonis*, *Brevibacterium sp*, *Brevundimonas vesicularis*, *Cellulomonas sp*, *Corynebacterium bovis*, *Fusobacterium necrogenes*, *Gemella moribillorum*, *Mannheimia haemolytica*, *Pseudomonas luteola*, *Sphingobacterium spiritivorum*. *Bacteroides distasonis* fait partie de la flore digestive normale du lapin (Pacini *et al.*, 1989) tandis que *Mannheimia haemolytica* est un pathogène avéré en médecine bovine (Euzéby, 1998). Les autres espèces sont des bactéries ubiquistes pathogènes opportunistes à l'exception de *Fusobacterium necrogenes* qui n'a jamais été mis en évidence comme pathogène opportuniste.

c. RECHERCHE D'ENTÉROBACTÉRIES

Cent microlitres de TEC4 ont étéensemencés dans 5mL de milieu d'enrichissement : Luria Broth, Mac Conkey et Sélénite et incubé 37°C. Cent microlitres de bouillon d'enrichissement ont étéensemencés sur gélose Gassner après 48h et 7j d'incubation en milieu d'enrichissement, et incubés 7j à 37°C.

Bien qu'une croissance bactérienne ait été mise en évidence dans les milieux d'enrichissement pendant l'incubation, aucune colonie n'a pu être mise en évidence lors des différents étalements sur gélose Gassner.

d. RECHERCHE DE CAMPYLOBACTER

Cent microlitres de TEC4 ont étéensemencés sur une gélose pour Campylobacter avec charbon de bois, désoxycholate et supplément (CCDA, OXOID®) incubés à 37°C dans des conditions de microaérophilie dans une jarre grâce au système de génération d'atmosphère CampyGen™ (OXOID®).

Aucune colonie n'a pu être mise en évidence sur le milieu spécifique.

Partie expérimentale

TABEAU 9 : INVENTAIRE DES FLORES BACTERIENNES CULTIVABLES SUR GELOSES STANDARD PRESENTES DANS LE TEC4, LES FRACTIONS ET LE TEMOIN TEM4

Espèce	TEC3	TEC4	50%	RK501	CERK	TEPH	50PH	AMC	BACI	CEF	DOX	NOVO	STREP	TYL	VAN	TAB	TEM4	Total
Enterococcus faecium	✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	14
<i>Enterococcus faecalis</i>	✓																✓	2
Bacillus sp	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15
<i>Bacillus circulans</i>												✓						1
<i>Bacillus licheniformis</i>						✓						✓						2
<i>Bacillus firmus</i>								✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	6
Clostridium sp	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		15
<i>Clostridium acetobutylicum</i>			✓															1
<i>Clostridium bifermentans</i>			✓		✓													1
<i>Clostridium baratii</i>					✓				✓		✓		✓			✓		5
<i>Clostridium butyricum</i>					✓	✓				✓								3
<i>Clostridium clostridiforme</i>												✓			✓			2
<i>Clostridium fallax</i>		✓	✓	✓			✓	✓										5
<i>Clostridium glycolicum</i>		✓	✓		✓	✓	✓								✓			6
<i>Clostridium histolyticum</i>			✓							✓								2
<i>Clostridium paraputrificum</i>		✓											✓					2
<i>Clostridium perfringens</i>		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓							8
<i>Clostridium septicum</i>			✓	✓	✓													3
<i>Clostridium sordelli 2</i>	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		6
<i>Clostridium sporogenes</i>	✓		✓															2
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>			✓															1
<i>Bacteroides distasonis</i>											✓							1
<i>Brevibacterium sp</i>	✓		✓								✓						✓	3
<i>Brevundimonas vesicularis</i>			✓				✓											2
<i>Cellulomonas spp</i>	✓		✓									✓			✓		✓	4
<i>Corynebacterium bovis</i>							✓											1
<i>Fusobacterium necrogenes</i>															✓			1
<i>Gemella moribillorum</i>				✓														1
<i>Mannheimia haemolytica</i>			✓															1
<i>Pseudomonas luteola</i>						✓	✓										✓	3
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>				✓														1
Total	7	7	15	6	7	6	8	5	4	5	6	7	5	2	6	4	5	

e. CALCUL DES UNITÉS FORMANT COLONIES

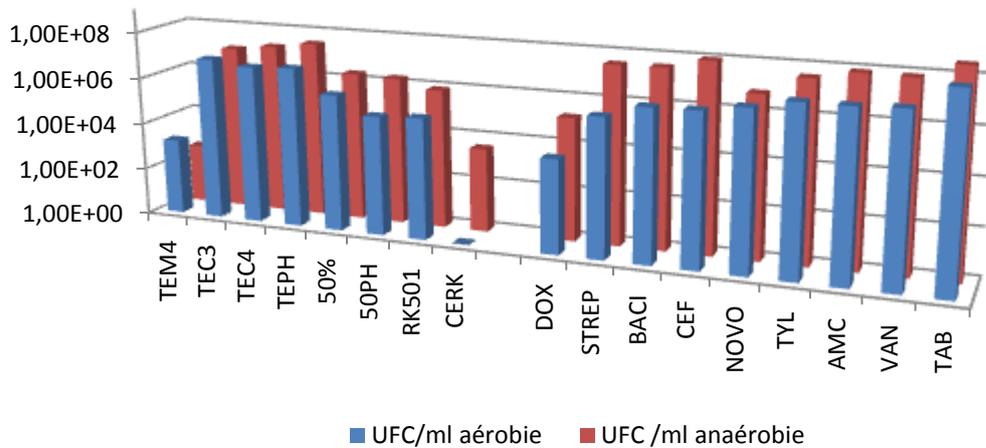
Le nombre d'UFC moyen par millilitre de fraction ont été déterminées par comptages des colonies sur les différents milieux utilisés (gélose Columbia au sang de mouton en aérobie et anaérobie, Schaedler au sang de mouton en anaérobie).

Les nombres moyens d'UFC des différents inoculums sont présentés au tableau 10 et à la figure 13. Les inoculums n'ayant pas subi la centrifugation sur gradient de sucrose ont des UFC entre 10^6 et 10^7 mL/L sauf le TEM4 qui semble avoir une flore cultivable très pauvre. La centrifugation appauvrit 10 fois les UFC tandis que le fractionnement par l'acide n'entraîne aucun changement significatif des UFC. Les traitements aux antibiotiques par contre entraînent des changements variables selon l'antibiotique utilisé bien que la doxycycline soit le seul antibiotique qui permette une diminution significative des UFC. L'augmentation des UFC dans certaines fractions traitées aux antibiotiques par rapport au TEC4 est due au temps d'incubation dans le milieu Schaedler liquide. Le CERK est la seule fraction ne présentant aucune espèce croissant en aérobie, c'est également une des fractions les plus pauvres en anaérobie.

TABLEAU 10 : UFC/ML MOYEN DE TEC3, TEC4 ET DE DIFFERENTES FRACTIONS ET TEMOINS

	UFC/mL aérobie	UFC/mL anaérobie
TEM4	$1,7.10^3$	$3,2.10^2$
TEC3	$8,7.10^6$	$1,1.10^7$
TEC4	$5,5.10^6$	$1,8.10^7$
TEPH	$6,7.10^6$	$3,2.10^7$
50%	6.10^4	$5,5.10^4$
50PH	$1,2.10^5$	$2,9.10^6$
RK501	$1,5.10^5$	$1,5.10^5$
CERK	0	$3,7.10^3$
AMC	$1,2.10^7$	$8,5.10^7$
BACI	$2,6.10^6$	$3,9.10^7$
CEF	$2,8.10^6$	10^8
DOX	10^4	$1,7.10^5$
NOVO	$5,2.10^6$	$6,8.10^6$
STREP	$7,6.10^5$	$3,7.10^7$
TYL	$1,2.10^7$	$3,9.10^7$
VAN	$1,4.10^7$	8.10^7
TAB	$1,2.10^8$	$3,2.10^8$

FIGURE 13: UFC/ML MOYEN DE TEC3, TEC4 ET DE DIFFERENTES FRACTIONS ET TEMOINS



f. VISUALISATION DES BACTERIES ET CELLULES SUR LAMES LAB-TECK®

Les résultats obtenus lors d'inoculation des fractions passées sur cellules laissent entendre que l'agent étiologique responsable de l'EEL adhère aux cellules RK13. Les lames Lab-Teck® permettent de cultiver des cellules sur une lame de microscope, permettant ensuite une coloration et observation directe de ces bactéries adhérant aux cellules.

Des cellules RK13 ont été cultivées sur lames Lab-Teck® Chamber Slide de 8 puits (NUNC®) et inoculées avec la fraction 50% et la fraction RK501 au même rapport surface/volume et selon le même protocole que lors de la fabrication des inoculums. Les cellules ont ensuite été fixées avec une solution d'acétone/éthanol (v/v) à (-20°C) pendant 12h, puis soumises à une coloration de Gram. Six champs ont été pris au hasard, les bactéries en contact direct avec des cellules et celles n'ayant aucun contact avec les cellules ont été comptées. Un rapport entre les bactéries « adhérentes » et non adhérentes a été calculé.

Les comptages sont analogues entre les fractions, 79% des bactéries sont en contact direct avec les cellules pour RK501 contre 82,4% pour RK502.

II. GENETIQUE MOLECULAIRE PAR PCR (DIFFERENTES APPROCHES)

Parallèlement aux analyses de bactériologie classique, des profils de PCR ont été réalisés sur quatorze fractions : les deux inoculums de référence (TEC3 et TEC4), les 7 fractions obtenues par centrifugation sur gradient discontinu de sucrose (SUR, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% et Culot), les fractions passées sur cellules (RK501 et RK502), ainsi que trois contrôles négatifs (contenus caecaux d'un lapin EOPS <TEM1>, d'un lapin de compagnie non mort de pathologie digestive <TEM2> et d'un lapin d'élevage non contaminé par l'EEL <TEM3>). Les autres fractions ayant été créées après le début des profils et n'ayant aucun avantage technique ou niveau de virulence plus intéressant, elles n'ont pas été intégrées dans les profils suivants.

Trois types de profils ont été réalisés : tout d'abord des profils de restriction du gène 16SrDNA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ou ARDRA), puis des profils sur gel avec gradient d'un agent dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou DGGE) sur les régions V3 ainsi que V6-V8 du gène 16SrDNA et, enfin, différents profils de PCR aléatoires (Random Amplified Polymorphic DNA ou RAPD).

Le but de ces trois approches était de mettre en évidence des bandes d'intérêt c'est-à-dire des bandes présentes dans les fractions reproduisant la maladie mais absentes ou d'intensité plus faible dans les fractions ne la reproduisant pas et dans les témoins négatifs. Ces bandes d'intérêt devaient ensuite être séquencées pour identifier une ou plusieurs séquences d'intérêt.

1. ARDRA

Toutes les extractions d'ADN total ont été réalisées en utilisant le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®) selon les recommandations du fabricant. Le gène 16SrDNA a été amplifié par PCR en utilisant des amorces universelles des eubactéries : 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' et 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5 minutes à 94°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à 61,5°C et 90s à 72°C, suivie par une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été dialysés sur membrane millipore (0,025 µm). La quantité d'ADN obtenue a été quantifiée par spectrophotométrie à 260 nm.

Les différents échantillons ont été digérés par 22 enzymes de restriction différentes : *Acc I*, *Alu I*, *Ava II*, *Cfo I*, *Cla I*, *Cvia II*, *EcoR I*, *Fat I*, *Hae III*, *Hha I*, *Hinc II*, *Hinp1 I*, *Hpa I*, *Mse I*, *Msp I*, *Nla III*, *Pvu II*, *Rsa I*, *Sau3A I*, *Sma I*, *Sal I*, *Taq I*. Un microgramme d'ADN purifié a été mis en contact avec une unité (U) d'enzyme dans un volume total de 20µL d'eau contenant 2µL de tampon spécifique à l'enzyme, pendant une heure aux températures d'activités spécifiques de l'enzyme.

Sur les 22 enzymes utilisées, seule *Acc I* a permis de mettre en évidence une bande présente dans les fractions reproduisant la maladie, mais absente ou en quantité faible dans les témoins négatifs et les fractions non virulentes (figure 14). Malheureusement, les résultats obtenus avec l'enzyme *Acc I* n'ont pu être reproduits malgré plusieurs tentatives. Les profils observés avec les 21 autres enzymes ne permettaient pas une distinction entre les inoculums et les témoins négatifs (exemple figure 15 pour *Rsa I*).

FIGURE 14: PROFIL DE RESTRICTION D'ACC I SUR LES DIFFERENTES FRACTIONS DU TEC4, TEC3 ET LES TEMOINS NEGATIFS

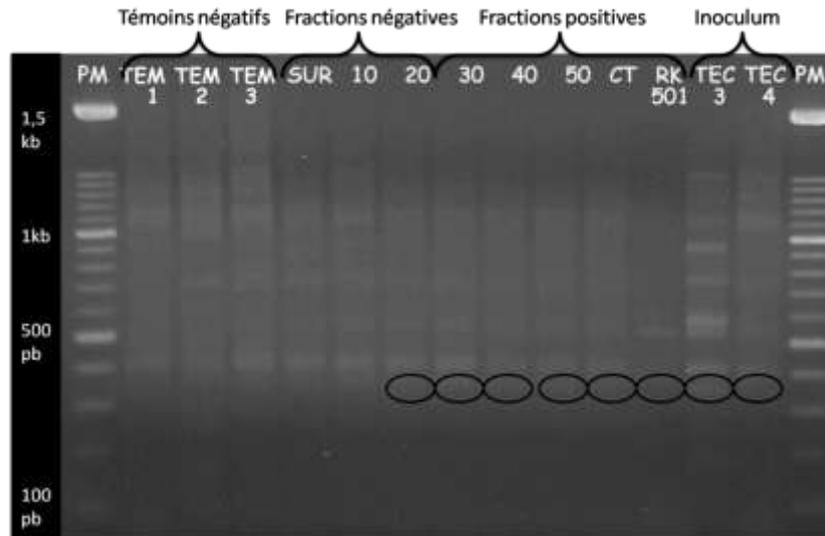
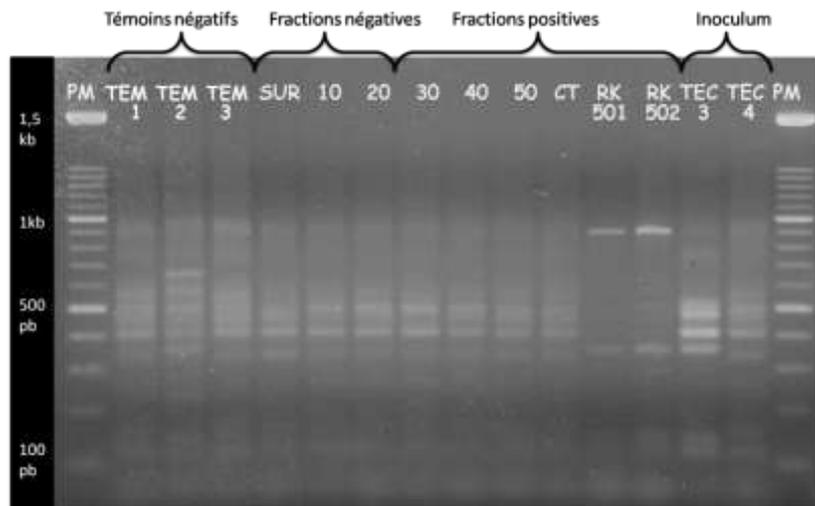


FIGURE 15 : PROFIL DE RESTRICTION DE RSA I SUR LES DIFFERENTES FRACTIONS DU TEC4, TEC3 ET LES TEMOINS NEGATIFS



2. DGGE

La DGGE est une technique permettant de séparer sur un gel dénaturant de polyacrylamide des amplicons de même taille, mais de compositions différentes. Ces analyses ont été effectuées à l'université de Liège, Centre d'Ingénierie de Protéines, laboratoire des cyanobactéries sur l'appareil DCode System (Bio-Rad® Laboratoires). Diverses régions hypervariables du gène 16SrDNA ont été ciblées par cette approche : la région V3, d'une part, et les régions V6-V8, d'autre part. Toutes les extractions ont été réalisées en utilisant le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®) selon les recommandations du fabricant.

a. RÉGION HYPERVARIABLE V3

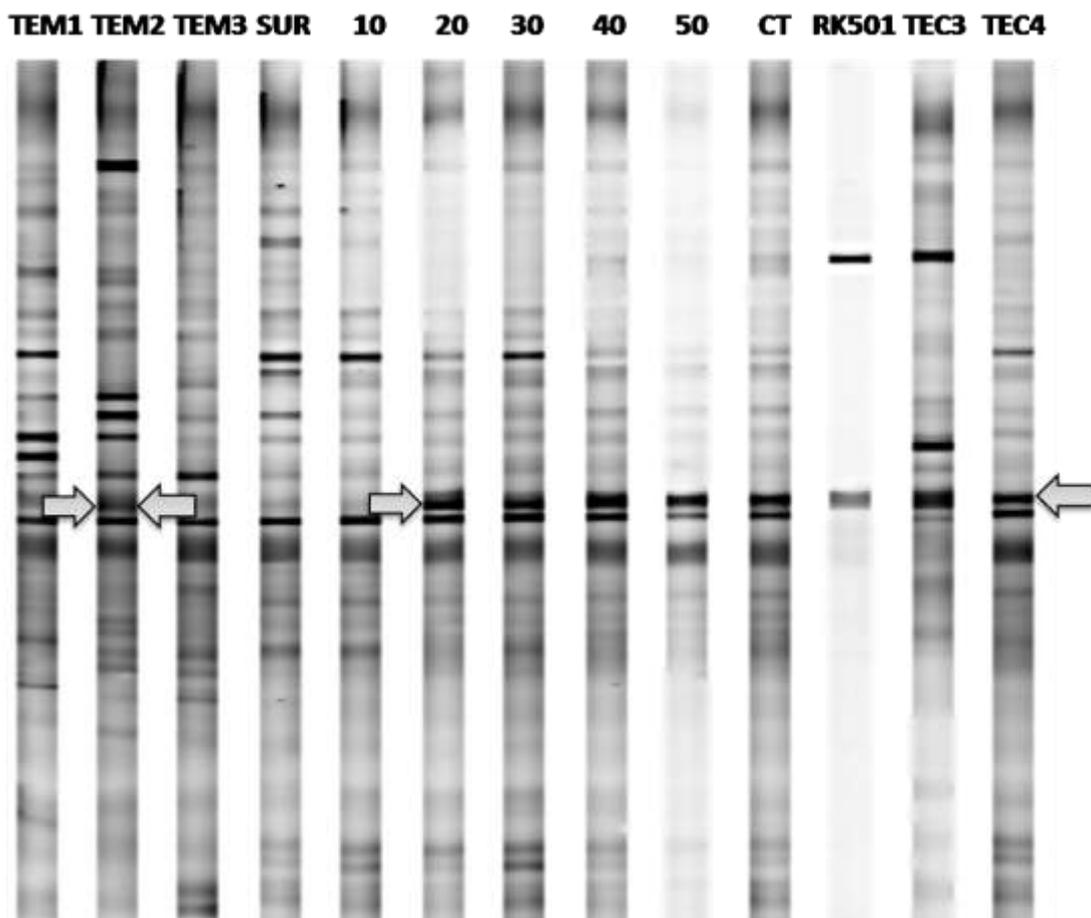
La région V3 du gène 16SrDNA a été amplifiée par une PCR nichée. Le gène 16SrDNA a été amplifiée en entier par PCR en utilisant des amorces universelles des eubactéries : 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' et 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5min à 94°C suivi par 17 cycles de 30s à 94°C, 30s à 61,5°C et 90s à 72°C, suivie par une élongation finale de 5min à 72°C. La seconde PCR a été réalisé sur les amplicon de la première PCR en

utilisant les amorces 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' et 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' de la région V3. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5min à 94°C suivi par 35 cycles de 30s à 94°C, 30s à 55°C et 60s à 72°C, suivie par une élongation finale de 5min à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose à 2% coloré par du bromure d'éthidium.

Pour la DGGE, un gel à 8% de polyacrylamide en tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) avec un gradient de dénaturant de 35 à 55% (100% de dénaturant = 7 M urée et 40% (v/v) formamide désionisée) a été utilisé. Quarante microlitres des produits de PCR ont été chargés sur le gel. Une durée de migration de 5h à température et voltage constants (60°C et 130V) a été utilisée. Les fragments génomiques ont été révélés au GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (2µL dans 15mL d'eau distillée). Les bandes d'intérêt ont été excisées et conservées dans 20µL de tampon Tris-EDTA (TE) à 4°C pendant 24h pour permettre la diffusion de l'ADN, puis stockée à -20°C.

La DGGE sur la région V3 (figure 16) a permis de mettre en évidence d'une bande d'intérêt présente dans les fractions 20% à culot, RK501, TEC3 et TEC4. Elle est également présente en faible quantité dans TEM2.

FIGURE 16 : PROFIL DGGE DE LA REGION V3 DE TEC3, TEC4, DES FRACTIONS DE TEC4 ET DE TEMOINS NEGATIFS



b. RÉGIONS HYPERVARIABLES V6-V8

Les régions V6-V8 du gène 16SrDNA ont été amplifiées par une touchdown-PCR grâce aux amorces 954f contenant la pince GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG

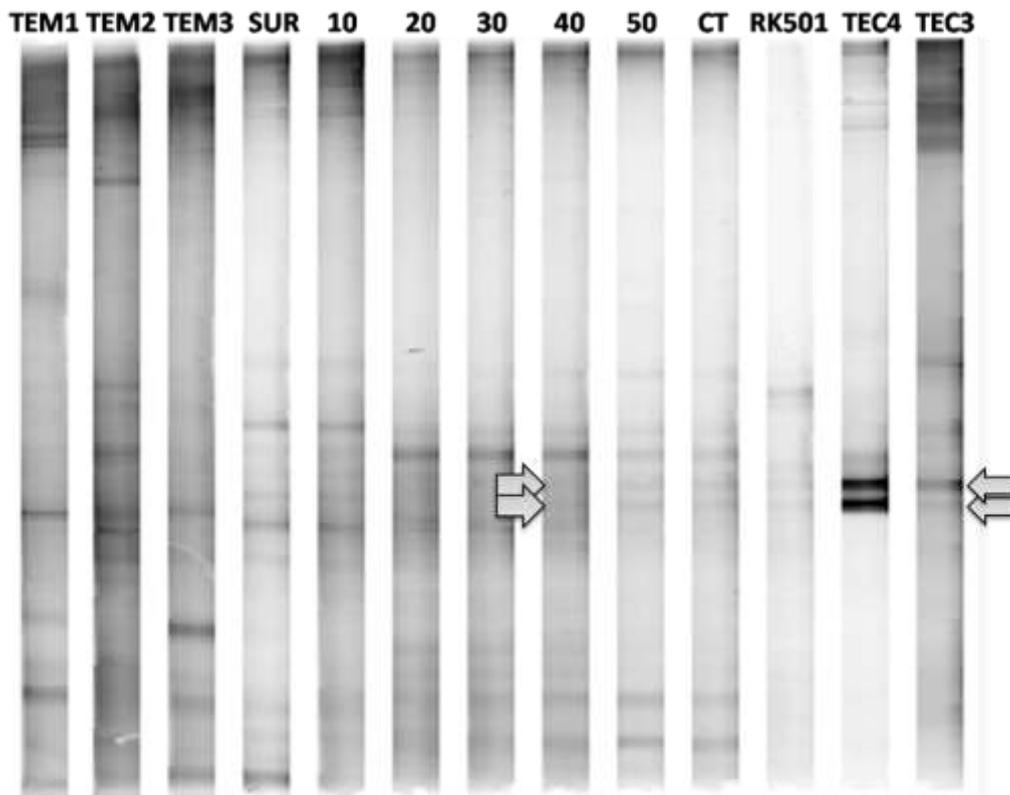
Partie expérimentale

GGG GGC ACA AGC GGT GGA GCA TGT GG-3') et 1369r (5'-GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG-3'). La première étape de la PCR comprend 10 cycles (dénaturation de 30s à 94°C, annealing 30s à 61°C, élongation d'une minute à 72°C) avec, à chaque cycle, une diminution de la température d'annealing de 0,5°C jusqu'à 56°C. La seconde étape de la PCR comprend 20 cycles : dénaturation de 30s à 94°C, annealing 30s à 56°C, élongation d'une minute à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% coloré par du bromure d'éthidium.

Le gel de DGGE utilisé contenait 6,5% de polyacrylamide dans du tampon TAE avec un gradient de dénaturant de 35-60% et 40-50% (100% de dénaturant = 7 M urée et 40% (v/v) formamide désionisée). Quarante microlitres des produits de PCR ont été chargés sur le gel. La migration a duré 5h, à température et voltage constants (60°C et 130V). Le gel a été révélé au GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (2µL dans 15mL d'eau distillée). Les bandes d'intérêt ainsi que toutes les bandes visibles des inoculums TEC4, SUR, RK501 et TEM2 ont été excisées et conservées dans 20µL de tampon TE à 4°C pendant 24h pour permettre la diffusion de l'ADN, puis stockée à -20°C.

Tout comme la DGGE sur la région V3, celle des régions V6 à V8 (figure 17) a également permis de mettre en évidence deux bandes d'intérêt dans les fractions 40%, 50%, culot, RK501, TEC3 et TEC4, qui semblent néanmoins absentes de la fraction 30%, fraction reproduisant aussi la pathologie.

FIGURE 17 : PROFIL DGGE DE LA REGION V6-V8 DE TEC3, TEC4, DES FRACTIONS DE TEC4 ET DE TEMOINS NEGATIFS



3. RAPD

Toutes les extractions ont été réalisées en utilisant le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®) selon les recommandations du fabricant. Douze amorces différentes ont été utilisées permettant l'obtention de 12 profils de comparaison (tableau 11). A l'exception des températures d'annealing

qui variaient avec les amorces, toutes les PCR ont été réalisées selon des conditions identiques, à savoir : une étape de dénaturation initiale de 5min à 94°C suivie par 35 cycles d'une minute à 94°C, 30s à la température d'annealing choisie et 2min à 72°C, puis d'une dernière élongation de 5min à 72°C. La fraction RK501 est constituée majoritairement d'ADN eucaryote (cellules RK13), cette manipulation ne permet donc pas de comparer la population bactérienne de RK501 avec celle des autres fractions.

TABLEAU 11: PRESENTATION DES AMORCES ET TEMPERATURES D'ANNEALING EMPLOYEES POUR LES RAPD

Nom de la séquence	Séquence 5' → 3'	T° d'annealing
RAPD1	GGT GCG GGA A	40°C
RAPD2	GTT TCG CTC C	35°C et 45°C
RAPD3	GTA GAC CCG T	40°C
RAPD4	AAG AGC CCG T	35°C
RAPD5	AAC GCG CAA C	45°C
RAPD6	CCC GTC AGC A	35°C et 45°C
OPB-6	TGC TCT GCC C	45°C
OPB-7	GGT GAC GCA G	45°C
AK2	GAT CCT GCA G	40°C
AK1	ATC ACT ATG A	35°C et 45°C
AP3	TCA CGA TGC A	35°C et 45°C
AP5	TCA CGC TGC G	35°C et 45°C

Deux amorces (RAPD6 à 45°C et AP5 à 35°C) ont permis la mise en évidence d'une bande d'intérêt. La première est d'une taille d'environ 400pb (figure 18), est présente dans les fractions 20% à culot, TEC3 et TEC4 mais est absente des fractions 10%, surnageant, RK501 et des témoins négatifs. La seconde est d'une taille d'environ 800pb (figure 19), est présente dans les fractions 30% à culot, TEC3 et TEC4 mais est absente des fractions 10%, 20%, surnageant, RK501 et des témoins négatifs.

Au vu de la faible reproductivité de la technique, les manipulations ont été réalisées 3 fois. Les bandes d'intérêt ont été retrouvées lors des trois manipulations.

FIGURE 18 : PROFIL RAPD DE L'AMORCE RAPD6 DE TEC3, TEC4, DES FRACTIONS DE TEC4 ET DE TEMOINS NEGATIFS

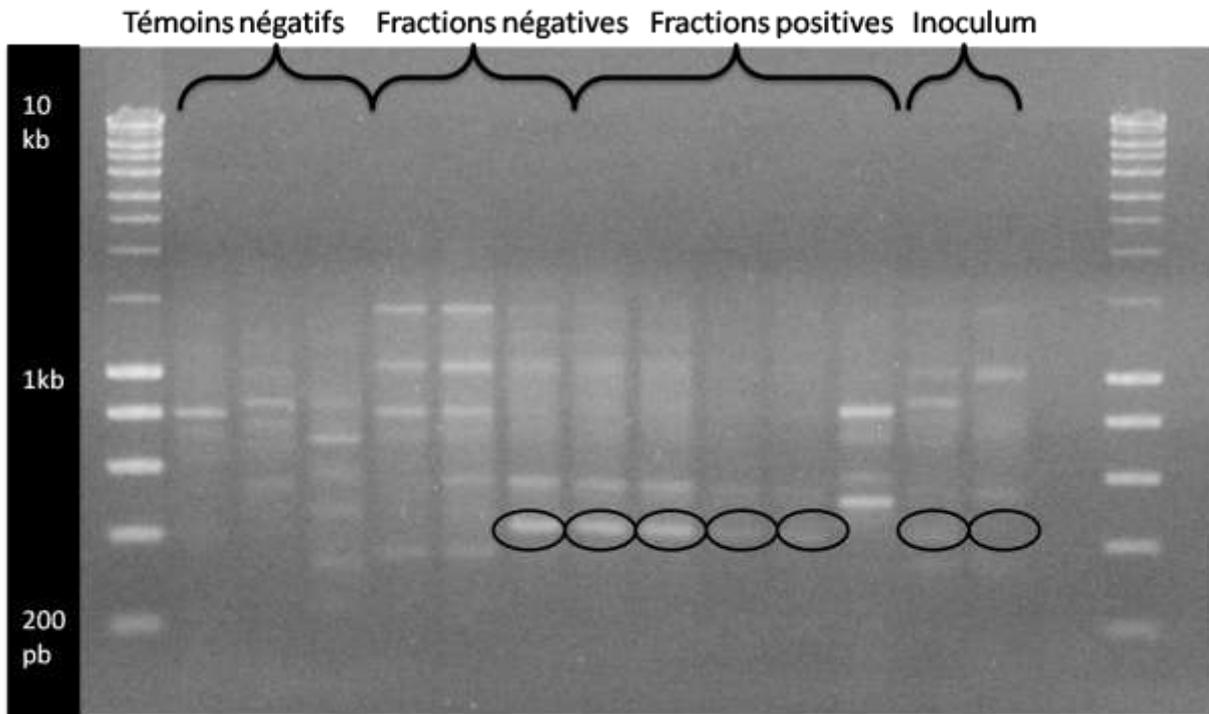
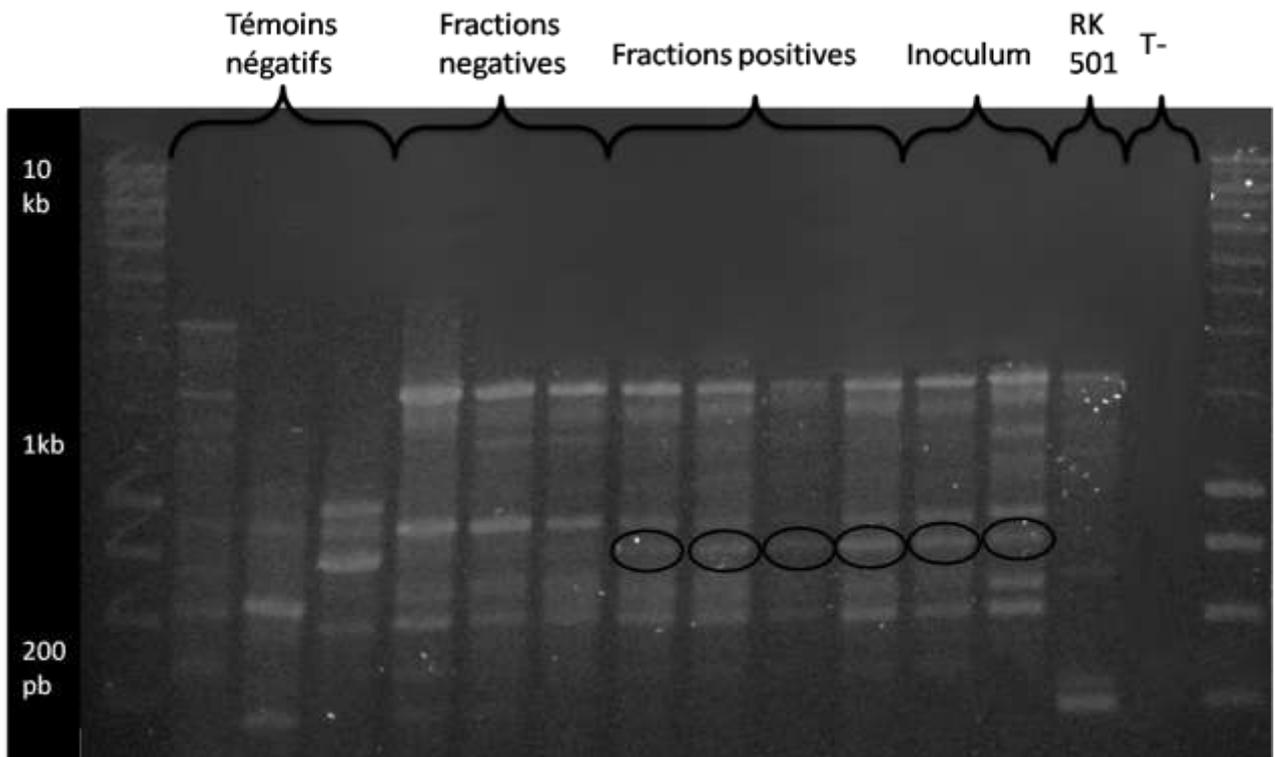


FIGURE 19 : PROFIL RAPD DE L'AMORCE AP5 DE TEC3, TEC4, DES FRACTIONS DE TEC4 ET DE TEMOINS NEGATIFS



4. CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DES BANDES D'INTÉRÊT

a. MATÉRIEL ET MÉTHODE DE CLONAGE

Le kit commercial pGEM[®]-T Easy Vector Systems (PROMEGA[®]) a été employé pour le clonage de toute les bandes d'intérêt à l'exception de la bande d'intérêt du profil RAPD AP5. Pour cette dernière, le kit commercial ClonJET[®] PCR cloning Kit a été employé.

KIT COMMERCIAL PGEM[®]-T EASY VECTOR SYSTEMS (PROMEGA)

Le vecteur linéarisé se termine par des thymines aux extrémités ce qui permet la ligation des amplicons de PCR classiques qui possèdent deux extrémités adénine. La cassette de résistance à l'ampicilline et celle de l'enzyme β -galactosidase permet de sélectionner les clones possédant le vecteur (résistant à l'ampicilline) et l'insert (déficient en β -galactosidase) sur un milieu supplémenté à l'ampicilline, à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside et au 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, car les colonies sont de couleur blanche.

Les colonies blanches ont été repiquées dans du milieu Luria Broth (LB) liquide avec ampicilline et conservées à -80°C avec 50% de glycérol. Les clones conservés ont été testés pour vérifier la présence de l'insert. Une PCR sur colonie a été réalisée en utilisant les amorces : 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' et 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'. Les conditions d'amplification étaient un cycle de 3 minutes à 96°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 1min à 54°C et 1min à 72°C et par une élongation finale de 5min à 72°C.

KIT COMMERCIAL CLONEJET[®] PCR CLONING KIT (FERMENTAS)

Tout comme le Kit PGEM[®]-T Easy Vector Systems, le vecteur linéarisé se termine par des thymines aux extrémités ce qui permet la ligation des amplicons de PCR classique qui possèdent deux extrémités adénine. Le vecteur contient une cassette de résistance à l'ampicilline et un gène létal au niveau de l'insert. Les clones possédant le vecteur et l'insert sont donc les seules colonies visibles sur un milieu supplémenté en ampicilline.

La souche bactérienne *E. coli* DH10B a été utilisée pour la transformation après avoir été rendue thermocompétente par traitement au chlorure de calcium (CaCl₂). La solution de CaCl₂ est composée de 60mM de CaCl₂ et de 10mM PIPES. Une culture liquide d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance a été mise sur glace 10 minutes puis centrifugée 7 minutes à 3000rpm à 4°C. Elle a ensuite été suspendue dans la solution de CaCl₂ à 4°C et à nouveau centrifugée (5min à 2500rpm à 4°C) et re-suspendue dans la solution de CaCl₂ deux fois. La solution a été aliquotée et congelée à -80°C après adjonction de 30% de glycérol dans les aliquotes.

Les clones conservés ont été testés pour vérifier la présence de l'insert. Une PCR sur colonie a été réalisé avec les amorces commerciales pJET1.2 forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') et reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'). Les conditions d'amplification étaient un cycle de 3 minutes à 95°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à 60°C et 1min/kb à 72°C, suivi par une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

b. ANALYSE DES SÉQUENCES

Deux clones par bande ont été séquencés. Tous les séquençages ont été réalisés à la plateforme de Géno Transcriptomique du GIGA de l'université de Liège. Les séquences ont été obtenues par la méthode de Sanger (Big Dye) sur un 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Les séquences « forward et reverse » obtenues pour chaque bande en séquençage direct ont été alignées grâce au programme ContigExpress, un composant de Vector NTI advance 10.3.0 (INVITROGEN) (Lu et Moriyama, 2004). Les clones séquencés pour chaque bande ou échantillon ont également été alignés par ContigExpress. Les séquences consensus ont ensuite été comparées dans des bases de données : « The Ribosomal Database Project » (Cole *et al.*, 2007) et GenBank (Benson *et al.*, 2007) par l'algorithme BLASTn (Altschul *et al.*, 1990).

Les séquençages directs des bandes d'intérêt de la DGGE de la région V3 n'ont pas permis de mettre en évidence une séquence de bonne qualité (présence d'un nombre important de doubles pics sur le chromatogramme et/ou une $E\text{-value} > e^{-5}$). A l'inverse, les séquences obtenues directement à partir des bandes d'intérêt de la DGGE sur les régions V6 à V8 possèdent des chromatogrammes réguliers, sans double pic et une E-value proche de zéro.

Les séquences mises en évidence dans les bandes d'intérêt sont différentes en fonction des fractions. Aucune séquence spécifique aux inoculums positifs n'a été mise en évidence lors des séquençages des bandes d'intérêt. Les bactéries représentées dans ces différentes bandes sont des représentants des familles: *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae* et *Enterococcaceae* (tableau 12).

Toutes les bandes séquencées à partir du profil de TEC4 montrent une identité élevée avec la famille *Clostridiaceae*, à l'exception d'une séquence d'entérobactérie. Le profil de RK501 était constitué uniquement de séquence d'*Enterococcus* et celui du surnageant uniquement de la famille *Clostridiaceae*. Le profil de TEM2 était quand à lui composé de diverses séquences, essentiellement de la famille *Bacteroidae* et des entérobactéries.

Les six bandes de RAPD6 séquencées après clonage ont permis la mise en évidence d'une séquence commune à toutes les bandes (numéro GenBank GQ202543). Comparée dans GenBank, cette séquence s'avère faire partie du gène *yijP*, gène très conservé chez *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria sp.*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* et *Shigella boydii*. Ce gène code pour une protéine contenant trois domaines : un premier localisé dans la membrane cytoplasmique, un deuxième à fonction enzymatique de sulfatase et un troisième à fonction inconnue. La séquence mise en évidence (392pb) représente le deuxième tiers du gène. Cinq phases ouvertes de lecture sont présentes dans cette séquence mais une seule a une correspondance dans les banques de données. Il s'agit d'une séquence de 87 acides aminés (aa) qui correspond à la protéine *yijP*.

Les six bandes d'intérêt de la RAPD AP5 séquencées après clonage ont permis la mise en évidence d'une séquence de 823pb commune à toutes les bandes (numéro GenBank GU951517). Cette séquence n'a aucune correspondance dans GenBank. Neuf phases ouvertes de lectures sont présentes dans cette séquences mais une seule a une correspondance dans les banques de données protéiques. Il s'agit d'une séquence de 112aa qui correspond à une hypothétique protéine d'*Eggerthella lenta*.

TABLEAU 12 : FAMILLES BACTERIENNES (ET ESPECE LA PLUS PROCHE D'APRES GENBANK) ASSOCIEES AUX BANDES D'INTERET DES PROFILS DE DGGE

	TEM2	20%	30%	40%	50%	CT	RK501	TEC4	TEC3
Région V3	(FJ367521 Uncultured bacterium)	Enterobacteriaceae (EU876657.1 Uncultured Burkholderia sp)	Enterobacteriaceae (DQ905450.2 Uncultured bacterium)	Enterobacteriaceae (DQ905450.2 Uncultured bacterium)	Planococcaceae (AM934693.1 Bacillus sp.)	(FJ517041.1 Uncultured Cytophagales)		Enterobacteriaceae (CP000946.1 Escherichia coli)	Bacillaceae (EU146061.1 Streptomyces clavuligerus)
Région V6-V8 Bande 1				Enterobacteriaceae (EF604150.1 Uncultured bacterium)	Enterobacteriaceae (DQ818722.1 Uncultured bacterium)	Enterobacteriaceae (DQ818722.1 Uncultured bacterium)	Enterococcaceae (EU034531.1 Enterococcus sp.)	Clostridiaceae (AF227826.1 Clostridium sp.)	Bacillaceae (AY647284.1 Bacillus bataviensis)
Région V6-V8 Bande 2				Enterobacteriaceae (EF604150.1 Uncultured bacterium)	Enterobacteriaceae (DQ818722.1 Uncultured bacterium)	Enterobacteriaceae (DQ818956.1 Uncultured bacterium)	Enterococcaceae (EU034531.1 Enterococcus sp.)	Clostridiaceae (AB298770.2 Clostridiaceae bacterium)	Bacillaceae (AY647284.1 Bacillus bataviensis)

5. IDENTIFICATION DES SÉQUENCES D'INTÉRÊT DANS DES ÉCHANTILLONS DE TERRAIN

Grâce aux comparaisons des différentes fractions par PCR aléatoire (RAPD) deux séquences d'intérêt ont été mises en évidence, R6B (396pb) et AP5 (788pb). Bien que ces séquences soient spécifiques aux inoculums de référence, leur lien étiologique avec l'EEL n'est en rien démontré. Une recherche de ces séquences sur des animaux de terrain présentant ou non des signes cliniques et lésions d'EEL ainsi que la recherche des bactéries porteuses de ses séquences devaient être réalisées. Une fois identifiée, la souche porteuse d'une de ces séquences a été inoculée à des lapins sensibles. De plus, les séquences bordant la séquence R6B ont été séquencées grâce à deux techniques de PCR.

a. MISE AU POINT DES PCR POUR LES SEQUENCES R6B ET AP5 ET POUR LE GENE *yijP*

Les présences de la séquence R6B et du gène *yijP* ont également été recherchées par PCR dans les différentes fractions de TEC4 ainsi que chez les témoins négatifs. Les souches *E. coli* DH10B et HS ont été employées comme témoins positifs et la souche *Staphylococcus aureus* N315 comme témoin négatif pour la mise au point des deux PCRs. Le génome complet de ces souches étant disponible, la mise au point de la PCR *in silico* était possible. Pour la séquence R6B, les séquences des amorces ont été déterminées et testées grâce au programme Vector NTI (INVITROGEN) : 5' TGG TAT TGC GGG CGG TCA TC 3' et 5' ATA ATG CCT TGC CGC CGC TG 3'. Les conditions d'amplification étaient un cycle de 5 minutes à 94°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à 68°C et 40s à 72°C, suivi par une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Pour le gène *yijP* les amorces employées sont celles décrites par Kim *et al.* (2006) à savoir : 5' GTT CTT ACT ATG AAT TCC ACA GAA G 3' et 5' GCG TCA AGC TTC GCA TCC GGC AAA T 3'. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5 minutes à 94°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 1min à 65°C et 2min à 72°C, suivi par une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

Le gène complet *yijP* (environ 1800pb) n'a été retrouvé que dans TEM2, un témoin négatif. Bien entendu, cet échantillon positif pour le gène *yijP* complet l'était également pour la séquence R6B mais les fractions permettant la reproduction de la maladie ont également répondu positivement à la recherche de R6B, proportionnellement avec l'intensité des bandes présentes lors de la RAPD.

La présence de la séquence AP5 a été recherchée par PCR dans les différentes fractions de TEC4 ainsi que chez les témoins négatifs. La souche *Staphylococcus aureus* N315 a été utilisée comme témoin négatif et un clone de la bande d'intérêt du profil RAPD a été utilisé comme témoin positif pour la mise au point. Les séquences des amorces ont été déterminées et testées grâce au programme Vector NTI (INVITROGEN) : 5' TGC GTG GTC AAG GCC GTT GT 3' et 5' TGA GCG ACG TTC TTG CCG CT3'. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5 minutes à 94°C suivi par 35 cycles de 30s à 94°C, 30s à 65°C et 1min à 72°C, suivi par une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

La séquence AP5 a été amplifiée par la PCR dans toutes les fractions du TEC4 y compris les non virulentes et dans TEM2.

b. ECHANTILLONS

Cent septante-six prélèvements de 25g de contenus caeaux ont été effectués sur des animaux d'élevage autopsiés dans le Secteur Clinique Aviaire, des Rongeurs et Lagomorphes qu'ils présentent ou non des lésions d'entéropathie épizootique du lapin. Les données concernant la

présence d'EEL (dilatation gazeuse du tractus digestif y compris l'estomac), de pathologie digestive autre que l'EEL (autres lésions du tractus digestif), la présence de *Clostridium spiroforme* (plus de 3 champs sur 5 lors d'une observation de la flore digestive par coloration de Gram), d'*Escherichia coli* (colibacillose ou colidysbactériose) ou de plus de 5000 ookystes d'*Eimeria* spp par gramme de matière fécale ont été relevées et sont présentées au tableau 13. Les prélèvements ont été stockés à -20°C dans des conditions connues pour préserver le (s) agent (s) infectieux responsable (s) de l'EEL. La présence du gène *yijP* ainsi que des séquences R6B et AP5 a été recherchée dans 176 prélèvements par PCR selon les méthodes décrites plus haut.

TABEAU 13 : RESUME DES DIFFERENTES LESIONS ET PATHOGENES RETROUVES LORS DES AUTOPSIES SUR LES ANIMAUX PRELEVES

	EEL clinique	Autres lésions digestives	<i>E. coli</i>	<i>Eimeria</i> spp	<i>Clostridium spiroforme</i>	Autres lésions*
Nombre d'animaux atteints	46	76	92	60	33	5

* Autres lésions = pneumonie, péricardite, emphysème et péritonite

La présence des séquences R6B (en absence de *yijP*) et AP5 ont été comparées par des tests de chi carré avec les autres paramètres enregistrés à savoir : présence d'EEL, présence de pathologie digestive autre que l'EEL, présence d'*E. coli*, présence de *Clostridium spiroforme* et plus de 5000 ookystes/g de matière fécale (tableau 14). La présence d'AP5 est moins souvent remarquée chez les animaux ne souffrant pas de pathologie digestive. L'absence de R6B est plus fréquente chez les lapins porteurs de *Clostridium spiroforme*. La présence de R6B en l'absence de *yijP* est plus souvent remarquée lorsque le lapin est porteur d'*E. coli*.

TABEAU 14 : RELATIONS ENTRE LA PRESENCE DES SEQUENCES D'INTERET ET LA PRESENCE DE L'EEL, D'AUTRES PATHOLOGIES DIGESTIVES ET DE CERTAINS PATHOGENES.

	AP5	R6B
EEL	NS	NS
Pathologie digestive autre que EEL	P= 0,0341	NS
<i>Escherichia coli</i> (> à 10⁵ CFU/g)	NS	P<0,001
<i>Eimeria</i> spp > 5000 ookystes/g de matière fécale	NS	NS
<i>Clostridium spiroforme</i> (> à 3 champs/5)	NS	P= 0,0011

NS : non significatif

Il n'y a cependant aucun lien significatif entre la présence des séquences AP5 ou R6B avec l'EEL comme montré aux tableaux 15 et 16.

TABEAU 15 : REPARTITION DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LA PRESENCE D'EEL ET DES SEQUENCES D'INTERET AP5 OU R6B

	R6B+	R6B-		AP5+	AP5-
EEL+	19	15	EEL+	19	27
EEL-	57	59	EEL-	62	68

TABLEAU 16 : REPARTITION DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LA PRESENCE D'EEL ET DES SEQUENCES D'INTERET AP5 ET R6B

	AP5 + R6B +	AP5 + R6B -	AP5 - R6B +	AP5 - R6B -
EEL +	8	6	11	9
EEL -	28	26	29	33

C. IDENTIFICATION DES SOUCHES PORTEUSES DES SEQUENCES R6B ET AP5

Dix microlitres de TEC4, 50% et RK501 ont étéensemencés sur différents milieux solides (gélose Columbia au sang de mouton, Mac Conkey, Muller Hinton, Rapid'Sal, OPSP, Chapman, Polcam, Schaedler, Edward, Slanetz et Bartley, CCDA, chocolat et gélose cœur-cervelle) ou liquides (LB, BHI, SOC, Preston, Tryptone Soya, Sélénite, Rappaport-vassiliadis) en aérobiose et anaérobiose, pendant 24h à 37°C. Des PCR spécifiques aux séquences R6B et AP5 ont ensuite été réalisées sur l'ensemble des colonies présentes sur une boîte après raclage de la masse bactérienne ayant poussé sur ces différents milieux ou dans 1µL de bouillon. Ces PCR spécifiques ont ensuite été réalisées sur les colonies isolées des cultures répondant positivement à la première PCR sur raclage. Les colonies positives à une PCR spécifique ont été identifiées par les procédures standard (Barrow et Feltham, 1993). L'identification finale a été effectuée au moyen de galeries API® (BioMérieux) selon les instructions du fabricant. Un séquençage du gène 16SrDNA de la souche mise en évidence a également été effectué.

Seules les géloses au sang de mouton et le milieu Rapid'Sal cultivés en anaérobiose ont permis l'obtention d'une réponse positive à la PCR spécifique R6B. Parmi les différentes colonies pures obtenues, deux se sont révélées positives lors des PCR. Ces deux souches ont été identifiées comme *Staphylococcus epidermidis*. Cette identification a été confirmée par séquençage du gène 16SrDNA. Ce résultat est d'autant plus intéressant que le génome entièrement séquencé pour cette espèce bactérienne ne contient aucune séquence semblable à R6B. Un séquençage du produit de PCR spécifique R6B à partir de cette souche a été effectué et a confirmé que la séquence présente dans cette souche de *Staphylococcus epidermidis* est bien identique à celle mise en évidence dans les bandes d'intérêt de la RAPD.

Les raclages des colonies ayant poussé sur géloses Chapman et Slanetz et Bartley ainsi que dans le bouillon Tryptone soja ont répondu positivement à la PCR AP5. A l'inverse aucune des colonies isolées de ces milieux ne répond positivement à la PCR. Par contre, un raclage autour des colonies est lui positif à la PCR. Ceci laisse supposer que la bactérie porteuse de cette séquence survit sur les géloses sans pour autant produire de colonie individualisée visible dans les conditions de culture utilisées.

d. INOCULATION DU STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS R6B+

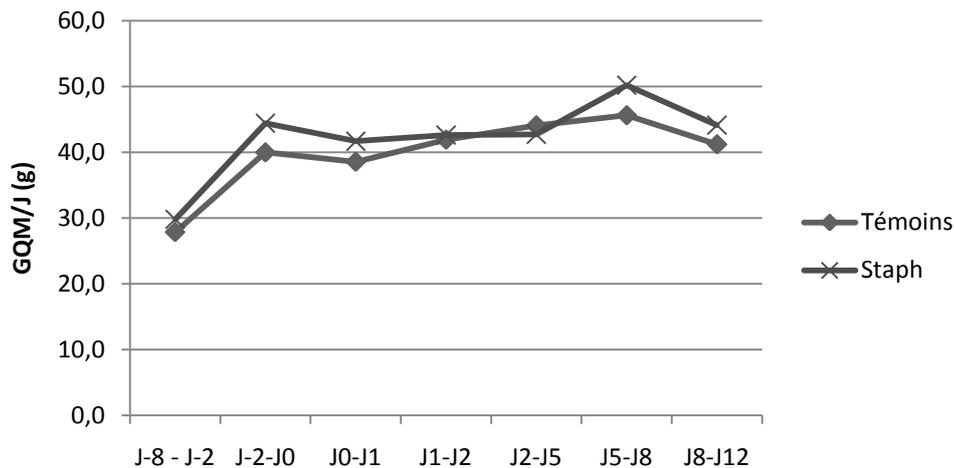
L'inoculation de la souche *Staphylococcus epidermidis* R6B+ a été réalisée en même temps que celle des fractions acides (page 58).

Trente-sept lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 5 semaines ont été inoculés. Dix-huit lapins avec 500µL d'une culture de *Staphylococcus epidermidis* R6B+ de 24h dans du LB et 19 autres lapins ont servi de témoins négatifs en recevant 500µL de contenu caecal de lapin sain. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et

sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés 8 et 2 jours avant l'inoculation puis à J0, J1, J2, J5, J8 et J12 après inoculation.

Les signes cliniques et les lésions macroscopiques classiques n'ont pas été reproduits. La courbe d'évolution des GQM est présentée à la figure 20. Les GQM des lots témoin et inoculé avec la souche de *Staphylococcus epidermidis* ne montrent aucune différence significative. Aucune morbidité, ni mortalité n'ont été observées ni pour le lot *Staphylococcus epidermidis*, ni pour le lot témoin.

FIGURE 20 : EVOLUTION DES GQM LORS DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES LA SOUCHE DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* PORTEUSE DE R6B



e. CLONAGE DE GENE YIJP-LIKE DU TEC4

PCR INVERSE

L'ADN génomique extrait du TEC4 a été restreint avec l'enzyme *Hae III* (enzyme ne clivant pas le fragment R6B) à raison de 1U d'enzyme par μg d'ADN pendant 1h à 37°C puis inactivé pendant 20min à 65°C. Une ligation avec une ligase T4 avec forte dilution (1/100) du produit de restriction a été réalisée afin que le segment contenant R6B se lie sur lui-même. Une PCR a ensuite été réalisée sur le produit de ligation avec comme amorces l'inverse des amorces R6B classiques c'est-à-dire 5' GAT GAC CGC CCG CAA TAC CA 3' et 5' CAG CGG CGG CAA GGC ATT AT '3. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5 minutes à 94°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 2min à 65°C et 2min à 72°C, suivi par une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR obtenus ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1% puis séquencés. Des amplifications de très petites tailles (environ 50pb) ont été visualisées mais leurs longueurs étaient insuffisantes pour être séquencées.

ARBITRARY PRIMED - PCR (AP-PCR)

Une AP-PCR a été réalisée pour séquencer de part et d'autre le fragment R6B à partir de l'ADN génomique extrait du TEC4 (figure 21). Le protocole de Knobloch *et al.* (2003) a été utilisé. Brièvement, deux premières PCR (appelées AP-PCR F1 et AP-PCR R1) ont été réalisées grâce à des amorces aléatoires et des amorces internes au fragment R6B conçues grâce au programme Vector NTI (INVITROGEN) (tableau 17). La PCR a été réalisée en plusieurs étapes : une première dénaturation à 95°C pendant 5min, 6 cycles de 30s à 94°C, 30s à 30°C, 1min à 72°C, 30 cycles à 30s à 94°C, 1min à 65°C, 2min à 72°C et 5min à 72°C. Les amplicons ont été purifiés par le NucleoSpin®

Partie expérimentale

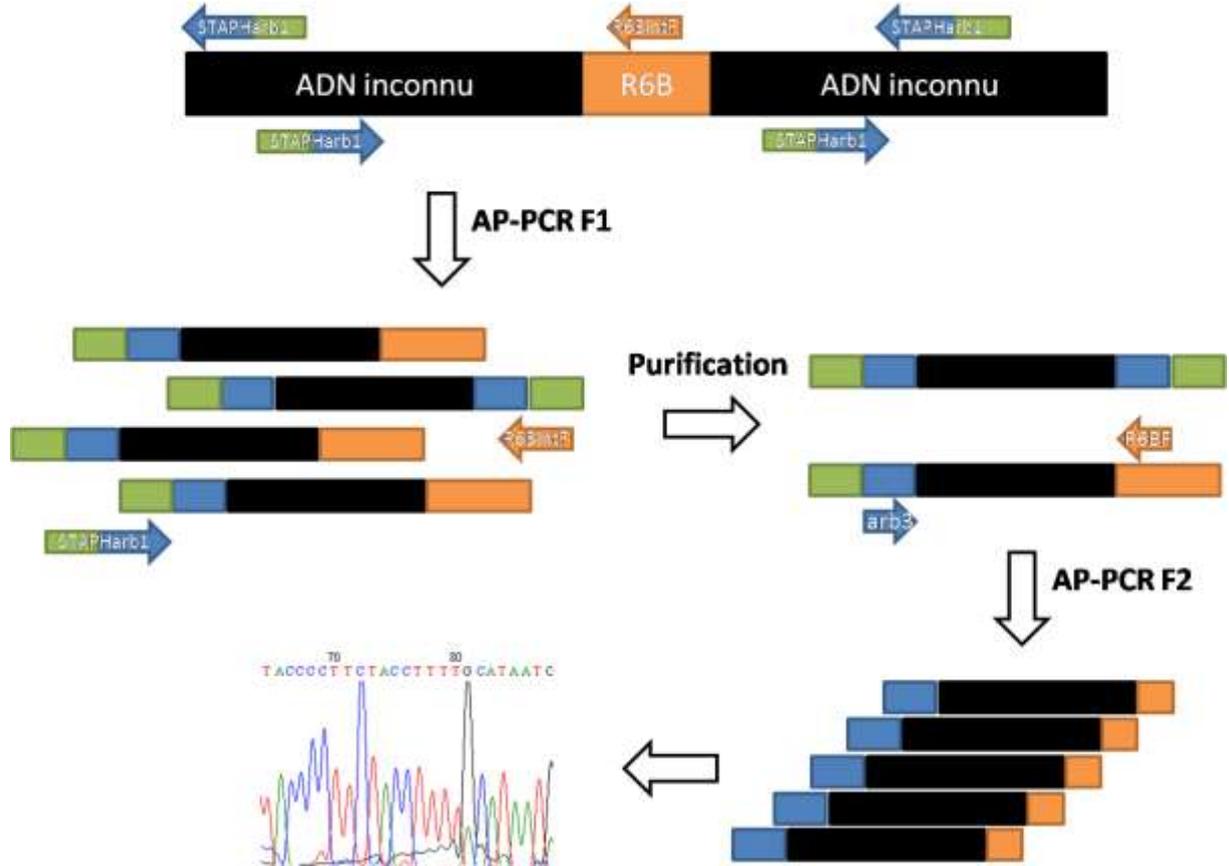
Extract II (MACHEREY-NAGEL). Les produits purifiés de l'AP-PCR F1 et R1 ont respectivement servi de modèle pour l'AP-PCR F2 et R2 dont les amorces sont détaillées au tableau 17. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 5min à 95°C suivi par 30 cycles de 30s à 94°C, 1min à 65°C et 2min à 72°C, suivie par une élongation finale de 5min à 72°C. Les produits de PCR obtenus ont été visualisés sur un gel d'agarose 1% puis séquencés.

TABLEAU 17 : AMORCES UTILISEES POUR LES AP-PCR

PCR	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
AP-PCR F1	STAPHarb1	GGC CAC GCG TCG ACT AGT CAN NNN NNN NNN GAT AT
	R6Bint F	TGA TGA AAC AGG CGG GTT AT
AP-PCR F2	arb3	GGC CAC GCG TCG ACT AGT CA
	R6B F	TGG TAT TGC GGG CGG TCA TC
AP-PCR R1	STAPHarb1	GGC CAC GCG TCG ACT AGT CAN NNN NNN NNN GAT AT
	R6Bint R	TTA AAC ACG GTC AGA TTC GG
AP-PCR R2	arb3	GGC CAC GCG TCG ACT AGT CA
	R6B R	ATA ATG CCT TGC CGC CGC TG

Les séquences mises en évidence (78pb en forward et 297pb en reverse) correspondent au gène *yijP*, indiquant la présence de minimum 787pb sur 1746pb du gène dans le TEC4 (100% d'identité). Neuf phases ouvertes de lecture sont présentes dans cette séquence mais une seule a une correspondance dans les banques de données. Il s'agit d'une séquence de 208aa qui correspond à nouveau à la protéine *yijP*.

FIGURE 21 : SCHEMA EXPLICATIF DES AP-PCR F1 ET F2 SUR L'ADN GENOMIQUE EXTRAIT DU TEC4



6. APPLICATION DE LA DGGE SUR DES MATIÈRES FÉCALES DE LAPINS INOCULÉS AVEC TEC4 ET DES TÉMOINS NÉGATIFS

Parallèlement à l'étude approfondie des séquences d'intérêt, l'évolution des flores fécales des lapins sains et inoculés a été comparée par DGGE pour identifier l'agent responsable de l'EEL. Une inoculation de TEC4 a permis de collecter des échantillons de matières fécales et de sang sur EDTA en cours de développement de la maladie. Cette inoculation et les analyses en découlant ont été baptisées « protocole avant-après ». Parallèlement, l'amplification du gène 16SrDNA a été réalisée sur des extractions génomiques des prélèvements sanguins pour confirmer une bactériémie en phase précoce.

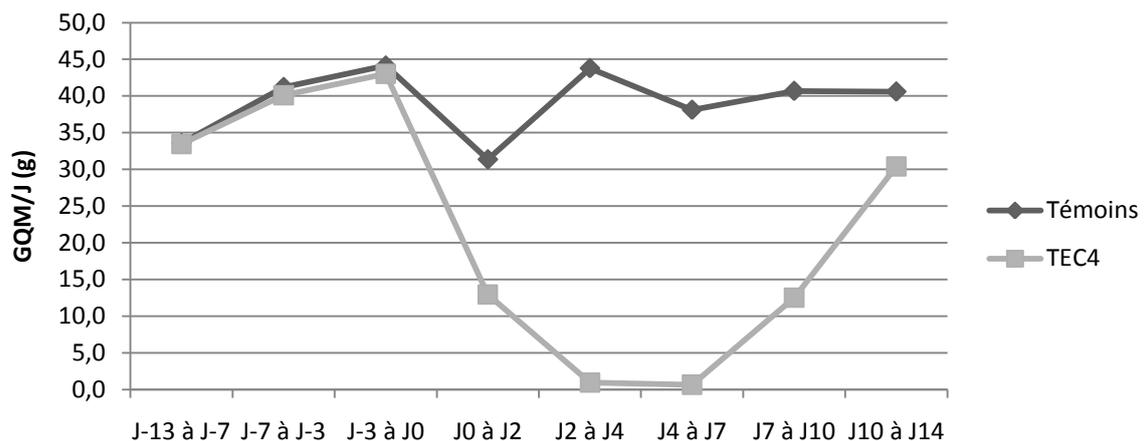
a. INOCULATION ET PRÉLÈVEMENTS

Trente-six lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 5 semaines ont été inoculés. Dix-huit lapins ont été inoculés avec 500 μ L de TEC4 dans le but de récolter des échantillons de matières fécales et de sang en cours de maladie expérimentale. Dix-huit autres lapins ont servi de témoins négatifs en recevant 500 μ L de contenu caecal de lapin sain.

Les prélèvements réalisés sur dix animaux inoculés et dix témoins négatifs étaient: 5mL de sang sur tube sec à J0, J7, J14, J21 et J28, 2mL de sang sur tube EDTA à J0, J1, J2 et J3 et récolte des matières fécales (4 crottes) de J0 à J7, J10 et J14.

Un lapereau inoculé avec TEC4 a été retrouvé mort à J1. Sur base des lésions macroscopiques visibles lors de l'autopsie réalisée, une hémorragie interne a été retenue comme étant la cause la plus probable de la mort. Les mesures de poids relatives à ce lapin ont été écartées pour la suite des analyses. Les signes cliniques et les lésions classiques ont été reproduits dans le lot inoculé avec TEC4. La mortalité et la morbidité ont été respectivement de 17% et 85%. La courbe d'évolution du GQM est présentée à la figure 22.

FIGURE 22 : EVOLUTION DES GQM LORS DE L'INOCULATION DE LAPINS SENSIBLES AVEC TEC4



b. COMPARAISON DES FLORES FÉCALES

L'ADN total contenu dans les matières fécales récoltées à J0, J2, J4, J7, J10 et J14 de trois lapins inoculés et trois lapins sains pendant l'inoculation de TEC4 a été extrait et les régions V3 et V6-

V8 du gène 16SrDNA amplifiées et visualisées sur des gels de DGGE selon les protocoles décrits plus haut (chapitre II point 2. page 66).

Les gels ont été standardisés et la présence des bandes confirmée selon la densitométrie grâce au logiciel BioNumerics (APPLIED MATHS). Le clustering a été réalisé en suivant le coefficient de Dice avec optimisation et avec une tolérance de 1%. La présence ou l'absence de chaque bande ont été comparées entre les lapins sains et malades grâce à des tests de Fisher. Une analyse statistique du nombre de bandes présentes dans les profils a été réalisée en utilisant le modèle MIXED (données répétées avec comme effet le jour, le traitement et l'interaction entre les deux). Un test de chi carré a été réalisé afin de vérifier le lien potentiel entre le nombre de bandes et les lapins.

Les profils calculés par densitométrie grâce au logiciel BioNumerics ont été analysés par le programme StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009). Des graphiques d'ordinations ont été réalisés par les méthodes de « principal component analysis » (PCA) et « random starts nonmetric multidimensional scaling » (nMDS). Une analyse de similarité (ANOSIM) a été réalisée pour évaluer les effets de l'inoculation (jour de prélèvement) et du lapin prélevé.

Les différents gels standardisés sont présentés aux figures 23 et 24. Les profils de la région V3 contiennent entre 10 et 39 bandes par échantillons (51 différentes) tandis que les régions V6-V8 contiennent entre 6 et 32 bandes par échantillons (42 différentes).

FIGURE 23 : EVOLUTION DES PROFILS DE DGGE DES REGIONS V6-V8 DE LA FLORE FECALE DE LAPINS INOCULES AVEC LE TEC4 ET DES TEMOINS NEGATIFS D'INOCULATION

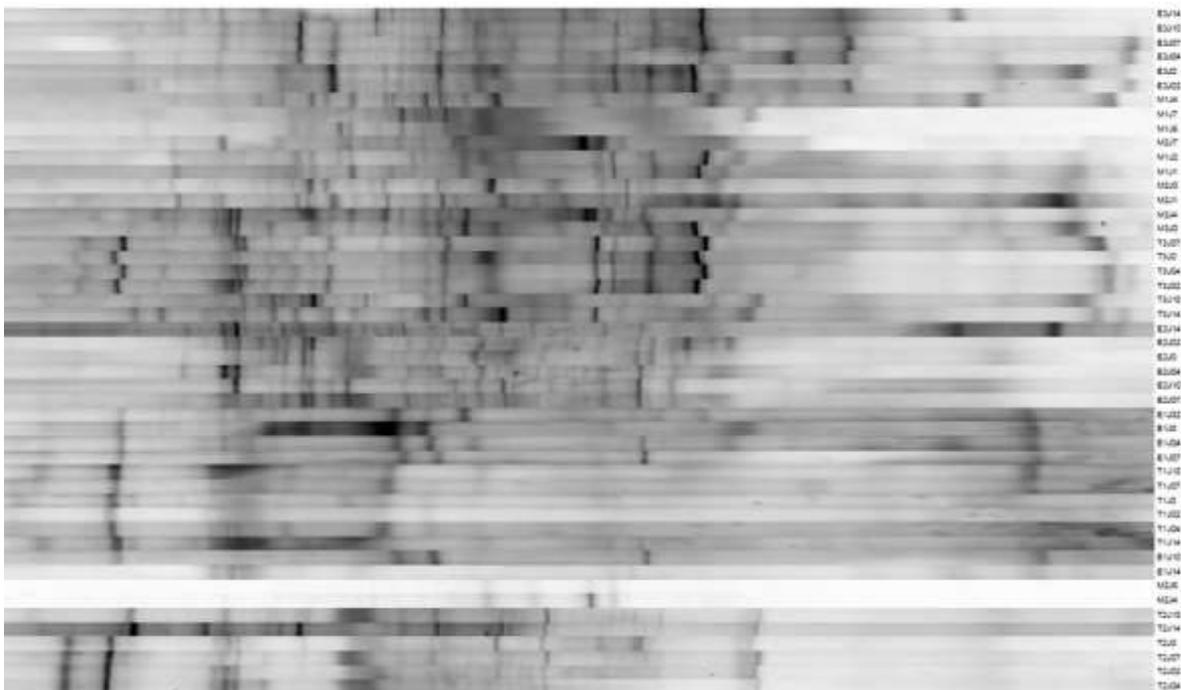
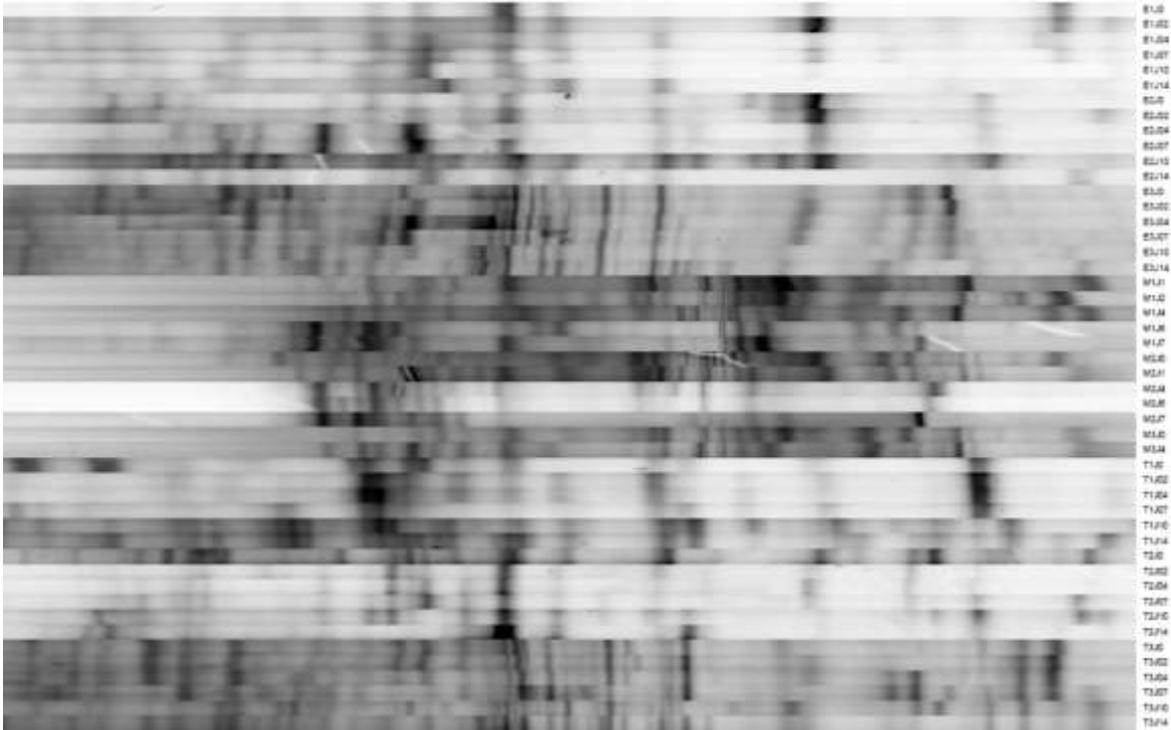


FIGURE 24 : EVOLUTION DES PROFILS DE DGGE DE LA REGION V3 DE LA FLORE FECALE DE LAPINS INOCULES AVEC LE TEC4 ET DES TEMOINS NEGATIFS D'INOCULATION



L'évolution du nombre de bandes par jour est présentée à la figure 25 pour les profils de la région V3 et la figure 26 pour les profils des régions V6-V8. Aucune bande n'est significativement plus, ou moins, présente chez les inoculés que chez les témoins. Les profils et nombre de bandes sont liés au lapin ($p < 0,05$ pour la région V3, $p = 0,09$ pour les régions V6-V8) et non à l'inoculum ou au jour du prélèvement. En conclusion, aucune bande d'intérêt n'a été mise en évidence. Néanmoins, les bandes apparaissant à J2 chez les lapins malades ont été séquencées

FIGURE 25 : EVOLUTION DU NOMBRE MOYEN DE BANDES PRESENTES DANS LES PROFILS DE DGGE DE LA REGION V3 EN FONCTION DES JOURS POST INOCULATION

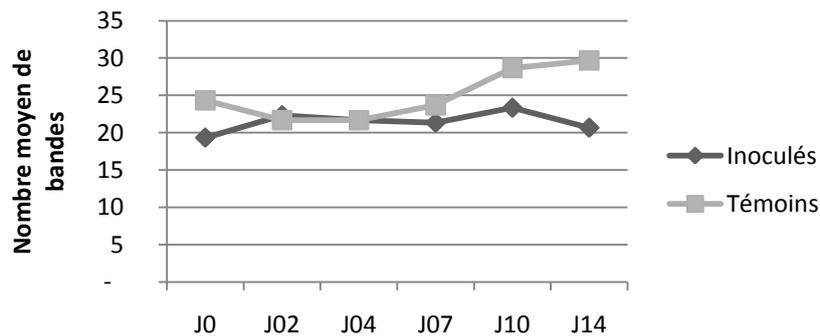
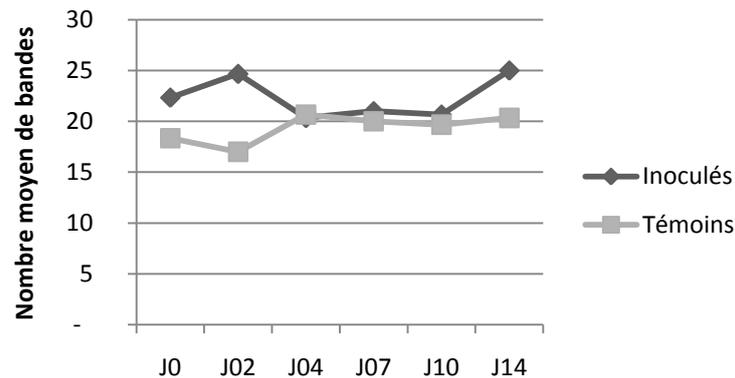


FIGURE 26 : EVOLUTION DU NOMBRE MOYEN DE BANDES PRESENTES DANS LES PROFILS DE DGGE DES REGIONS V6-V8 EN FONCTION DES JOURS POST INOCULATION



L'étude par StatFingerprints permet d'affirmer que les différences entre profils ne sont pas liées au jour de prélèvement ou au statut sanitaire (inoculés ou non). Par contre, les profils des lapins morts d'EEL sont très proches l'un de l'autre dans les graphiques d'ordination des profils de la région V3 aussi bien par la méthode de PCA (figure 27) que de nMDS (figure 28) mais pas dans ceux des régions V6-V8. L'effet lapin calculé en fonction du nombre de bandes est également retrouvé dans l'étude ANOSIM des profils aussi bien pour la région V3 ($R=0,722$, $p=0,000999$) que pour les régions V6-V8 ($R=0,6269$, $p=0,000999$).

En conclusion de l'analyse de StatFingerprints, la variabilité est essentiellement expliquée par un effet lapin. Il n'y a pas d'effet jour quel que soit le lot, ni d'effet inoculation. Les lapins morts se distinguent des autres lapins en considérant la région V3 uniquement. La région V3 est a priori plus discriminante que la V6 sur l'effet lapin.

Les bandes apparaissant à J2 chez les lapins inoculés ont été clonées grâce au kit commercial ClonJET[®] PCR cloning Kit (page 71). Le séquençage et l'analyse des séquences ont été réalisés comme décrits plus haut (page 72)

Aucun genre particulier ne semble lié à l'apparition des bandes sur les gels de DGGE au deuxième jour. Les phyla, genres et premières correspondances dans GenBank sont présentés pour chaque clone au tableau 18. Sur les 20 clones envoyés, 2 faisaient partie des entérobactéries (phylum *Proteobacteria*), 11 du phylum *Firmicutes*, 6 du phylum *Bacteroidetes* et un du phylum *Verrucomicrobia*. Les bactéries du phylum *Firmicutes* semblent donc se développer plus facilement en phase aiguë de la maladie. Cette conclusion a déjà été faite grâce aux cultures traditionnelles mais pourrait être biaisée, dès le départ, car 90% des espèces bactériennes de la flore digestive commune du lapin sont du phylum *Firmicutes*.

FIGURE 27 : ORDINATION DES PROFILS DE DGGE DE LA REGION V3 DE LAPINS INOCULES (E), TEMOINS (T) ET MORTS D'EEL (M) PAR LA METHODE DE PCA

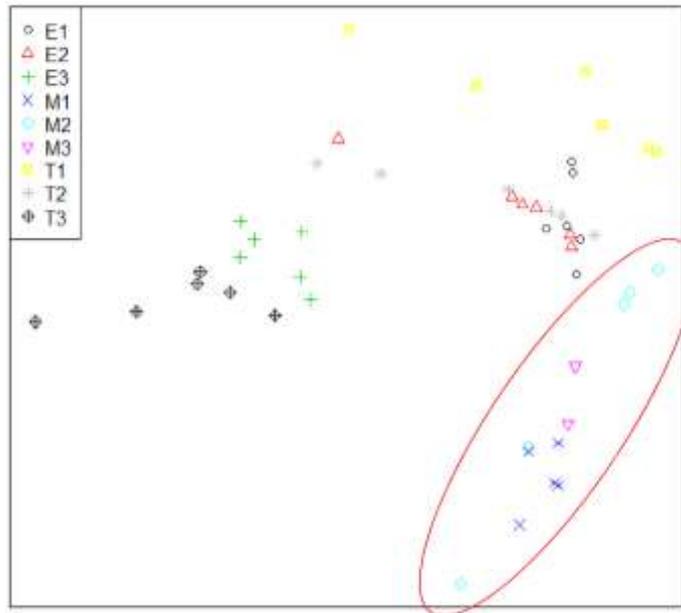


FIGURE 28 : ORDINATION DES PROFILS DE DGGE DE LA REGION V3 DE LAPINS INOCULES (E), TEMOINS (T) ET MORTS D'EEL (M) PAR LA METHODE DE PCA

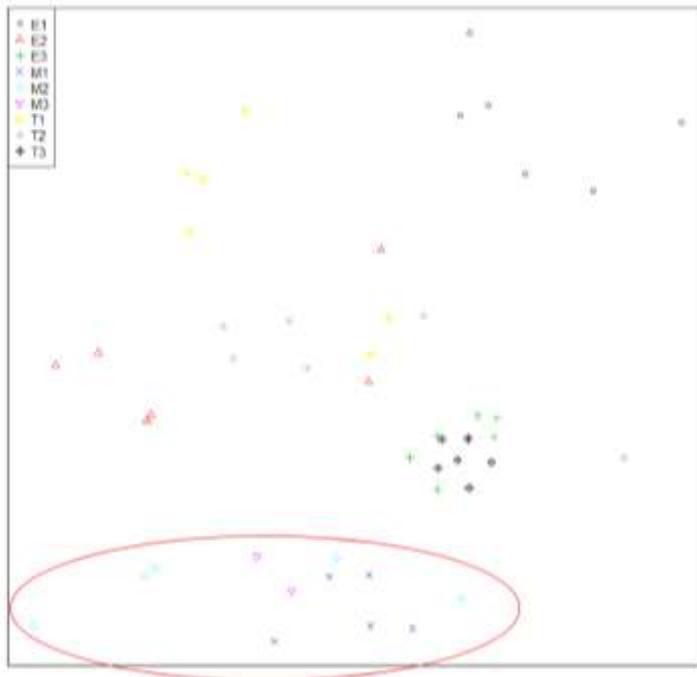


TABLEAU 18 : PHYLA, GENRES ET PREMIERES CORRESPONDANCES DANS GENBANK DES CLONES DES BANDES APPARAISSANT A J2 POST INOCULATION

Région	Phylum RDP	Genre RDP	1er hit GenBank
V6-V8	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	EU464984.1 Uncultured bacterium
	<i>Firmicutes</i>	<i>Subdoligranulum</i>	EU764682.1 Uncultured bacterium
V6-V8	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	EU462661.1 Uncultured bacterium
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Alistipes</i>	EU764925.1 Uncultured bacterium
V6-V8	<i>Firmicutes</i>	<i>Brevibacillus</i>	EU771937.1 Uncultured bacterium
	<i>Firmicutes</i>	<i>Leuconostoc</i>	EU638458.1 Uncultured <i>Brevibacillus</i>
V6-V8	<i>Firmicutes</i>	<i>Leuconostoc</i>	EU771937.1 Uncultured bacterium
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter</i>	GQ179978.1 <i>Enterobacter hormaechei</i>
V6-V8	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	FJ959576.1 Uncultured bacterium
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	FJ959576.1 Uncultured bacterium
V6-V8	<i>Proteobacteria</i>	<i>Shigella</i>	EU471243.1 Uncultured bacterium
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	FJ959576.1 Uncultured bacterium
V3	<i>Firmicutes</i>	<i>Bryantella</i>	EU777919.1 Uncultured bacterium
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bryantella</i>	EU777919.1 Uncultured bacterium
V3	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	EF096946.1 Uncultured bacterium
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Ruminococcus</i>	FJ028745.1 Uncultured rumen bacterium
V3	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	EU791042.1 Uncultured bacterium
	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	GQ298269.1 Uncultured bacterium
V3	<i>Firmicutes</i>	<i>Moryella</i>	GQ298269.1 Uncultured bacterium
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansia</i>	DQ795031.1 Uncultured bacterium

7. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE BACTÉRIÉMIE POTENTIELLE

L'ADN génomique a été extrait des prélèvements de sang réalisés sur tube EDTA de J0 à J3 lors d'une inoculation de TEC4 grâce au QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®). L'amplification de la séquence ITS (Internal Transcribed Spacer) entre le 16SrDNA et le 23SrDNA a été réalisée grâce aux amorces ITSf (5' GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA 3') et ITSReuB (5' GCC AAG GCA TCC ACC 3') et au protocole décrits par Cardinale *et al*(2004). Différentes températures d'appariement ont été testées : 55°C, 57°C, 59°C et 61°C. Les conditions d'amplification étaient : un cycle de 3 minutes à 94°C suivi par 30 cycles de 45s à 94°C, 1min à l'une des températures d'appariement testées et 2min à 72°C, suivi par une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Malgré les différentes températures d'appariement utilisées, l'ADN eucaryote de lapin présent dans les extractions à partir des prélèvements de sang est systématiquement amplifié par la PCR ITS. Cette méthode ne permet donc pas d'étudier une éventuelle bactériémie.

Les amplifications du gène 16SrDNA et des régions V6-V8 ont été réalisées selon les protocoles présentés plus haut (chapitre II point 1 et point 2). Sur les 106 prélèvements testés, trois étaient positifs à la PCR ciblant le gène 16SrDNA. Il s'agit des prélèvements de deux lapins inoculés à J2. Aucune amplification n'a été constatée sur les échantillons du groupe contrôle. Le séquençage direct des produits de PCR ne permettant pas d'obtenir des chromatogrammes corrects (présence de doubles pics), un clonage sur le gène 16SrDNA en entier et sur les régions V6-V8 a été réalisé. Sur les trois échantillonsensemencés, deux ont permis la mise en évidence d'une culture pure. Une souche de *Staphylococcus pasteurii* et une de *Bacillus* sp. ont été identifiées et leurs gènes 16SrDNA ont été séquencés pour confirmation de l'identification. Parmi les trois lapins positifs à J2, l'un (cage 18) est le lapin ayant eu la plus grosse chute de poids ce jour-là mais les deux autres (cage 11 et cage 13)

Partie expérimentale

n'ont pas eu de chute de poids particulière. Aucun des trois lapins n'a présenté de signes cliniques (diarrhée, mucus,...) ce jour-là.

Les amplicons 16SrDNA obtenus à partir des échantillons de sang ont été clonés grâce au kit commercial ClonJET[®] PCR cloning Kit comme décrit plus haut (voir page 71), ainsi que le séquençage et l'analyse des séquences (voir page 72)

Les différents clones du gène 16SrDNA et des régions V6-V8 permettent de démontrer la présence de plusieurs souches bactériennes. Les genres identifiés par la base de données Ribosomal Database Project (RDP) pour les différents clones sont présentés au tableau 19.

Une mise en culture des prélèvements positifs à également été réalisée. Les espèces mises en évidence ont été identifiées suivant les procédures standard et leur gène 16SrDNA a été séquencé pour confirmation de l'identification. Les espèces cultivées sont présentées au tableau 19.

TABLEAU 19 : GENRES DES DIFFERENTS CLONES DU GENE 16SRDNA ET DES REGIONS V6-V8 AMPLIFIEES A PARTIR DES EXTRACTIONS DE SANG AINSI QUE DES SOUCHES CULTIVEES.

Echantillon	16S ADN total	V6-V8 ADN total	16S de la souche cultivée
Cage 11 inoculé	<i>Moraxellaceae</i> <i>Alysiella</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Bacillus</i>
Cage 13 inoculé	<i>Staphylococcus</i> <i>Granulicatella</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>
Cage 18 inoculé	<i>Staphylococcus</i> <i>Haemophilus</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Actinobacillus</i> <i>Granulicatella</i>	Pas de souche cultivée

III. COMPARAISON DES FRACTIONS PAR PYROSEQUENÇAGE

Six fractions différentes (tableau 20) ont été comparées par une technique de séquençage à ultra haut débit (HT-sequencing) en utilisant le système « Roche FLX Genome Sequencer » combiné avec le « Titanium Chemistry ». L'ADN total de ces six fractions a été extrait en utilisant le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®) selon les recommandations du fabricant. Le reste des manipulations a été effectué par la société DNA Vision. Brièvement, les régions V5 à V6 du gène 16SrDNA ont été amplifiées. Les amplicons de chaque fraction ont été marqués différemment grâce à des séquences nucléotidiques différentes (tags). Après dosage, les amplicons ont été mélangés en équimolaire et chargés sur un huitième de plaque du « Roche FLX Genome Sequencer ».

TABLEAU 20 : FRACTIONS SELECTIONNEES POUR LE HT-SEQUENCING

Nom de la fraction	Virulence	Raison justifiant le choix de la fraction
TEC4	+++	Inoculum le plus virulent
TEC3	++	Inoculum très virulent de la génération précédant le TEC4
50%	++	Un des fractionnements les plus intéressants voir chapitre I
TEPH	+++	Pas d' <i>Enterococcus faecium</i>
50PH	+/-	Flore pauvre, pas d' <i>Enterococcus faecium</i> voir chapitre I point 0
TEM4	-	Témoin négatif

Les séquences retenues pour analyse devaient répondre aux conditions suivantes : une taille supérieure à plus de 50pb sans les amorces ni les tags, pas plus d'un mésappariement dans ceux-ci et un maximum de 2 bases non déterminées (N). Les séquences retenues ont ensuite été comparées dans les bases de données existantes pour être identifiées jusqu'au genre bactérien. Deux dendrogrammes ont été construits grâce au script *hclust* du logiciel R (<http://sekhon.berkeley.edu/stats/html/hclust.html>) basés pour le premier sur les phyla identifiés et pour le deuxième sur les genres identifiés. Les séquences obtenues ont été alignées grâce à muscle v3.7(Edgar, 2004) et converties au format PHYLIP. La biodiversité et l'index de richesse ont été calculés pour chaque échantillon grâce au programme MOTHUR (Schloss *et al.*, 2009).

Brièvement, un OTU ou Operational Taxonomic Unit est un groupe (un cluster) de séquences dont l'inter-distance est inférieure à 3% (valeur permettant une estimation des OTU la plus proche du nombre d'espèces (Huse *et al.*, 2007)). La richesse est estimée par l'index Chao1 et est directement reliée au nombre d'OTU observées suivant la formule ci-dessous :

$$Chao1 = S_{obs} + \frac{n_1 (n_1 - 1)}{2 (n_2 - 1)}$$

Avec S_{obs} égale au nombre d'espèces observées, n_1 le nombre de séquences uniques et n_2 le nombre de doublons (Hughes *et al.*, 2001).

La biodiversité est estimée par l'index non paramétrique de Shannon (Np shannon) et dépend de la manière dont les séquences sont réparties dans les OTU observées. La formule utilisée pour calculer est celle décrite par Chao et Shen (<http://www.mothur.org/wiki/Npshannon>)

$$npshannon = \sum_{i=1}^{S_t} \frac{C\pi_i \ln(C\pi_i)}{1 - (1 - C\pi_i)^N}$$

Avec $\pi_i = \frac{n_i}{N}$, $C = 1 - \frac{n_1}{N}$, n_i = le nombre de séquences dans l'OTU « i », N = le nombre de séquences dans l'échantillon et S_t = le nombre total d'OTU de l'échantillon.

Un nombre total de 16 851 séquences a été retenu pour l'analyse. La taille moyenne des séquences obtenues est de 205pb et la plus grande séquence obtenue est de 584pb. Le nombre de séquences de qualité obtenues pour chaque fraction est présenté au tableau 21.

TABLEAU 21 : NOMBRE DE SEQUENCES OBTENUES POUR CHAQUE ECHANTILLON ET POURCENTAGE DES SEQUENCES IDENTIFIEES AU PHYLUM ET AU GENRE

Nom de la fraction	Nombre de séquences (% par rapport au total)	% de séquences identifiées au phylum	% de séquences identifiées au genre
TEC3	4530 (15%)	95%	74%
TEC4	4659 (16%)	98%	66%
50%	3982 (13%)	95%	60%
TEPH	5168 (17%)	99%	65%
50PH	4839 (16%)	96%	61%
TEM4	6374 (22%)	98%	37%

Les phyla présents dans les échantillons sont présentés au tableau 22. Le nombre de genres identifiés dans chaque échantillon et les genres dominants dans chaque échantillon sont respectivement présentés au tableau 23 et à la figure 29.

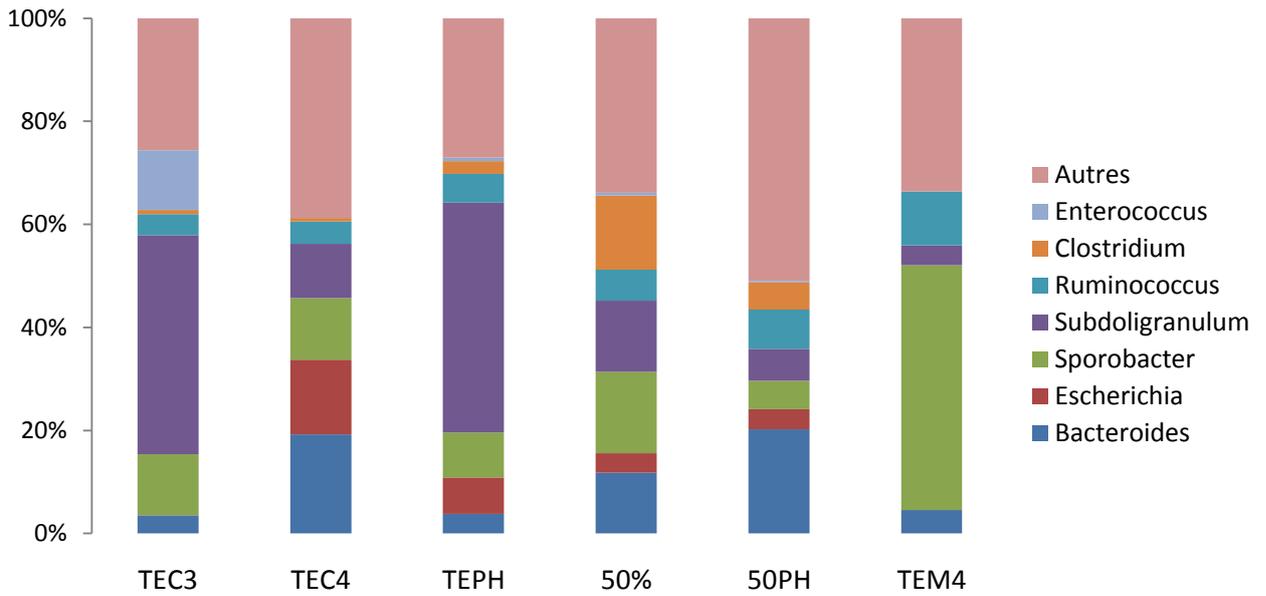
TABLEAU 22 : NOMBRE DE SEQUENCES ASSOCIES AUX DIFFERENTS PHyla IDENTIFIES

Phylum	TEC3	TEC4	TEPH	50%	50PH	TEM4
<i>Firmicutes</i>	4026	2661	4487	3070	3132	5654
<i>Bacteroidetes</i>	209	1147	235	476	1158	521
<i>Proteobacteria</i>	11	683	355	194	308	7
<i>Actinobacteria</i>	45	79	35	42	36	34
<i>Fusobacteria</i>	0	3	1	0	1	0
<i>Tenericutes</i>	2	0	1	0	0	0
Nombre de séquences identifiées	4293	4573	5114	3782	4635	6216

TABLEAU 23 : NOMBRE DE GENRES IDENTIFIES DE MANIERE CERTAINE DANS LES DIFFERENTS ECHANTILLONS

	TEC3	TEC4	TEPH	50%	50PH	TEM4
Nbr genres	44	54	57	69	86	35

FIGURE 29 : REPARTITION DES GENRES MAJORITAIRES DANS LES DIFFERENTS ECHANTILLONS



Les dendrogrammes basés sur les phyla identifiés et les genres identifiés dans chaque échantillon sont respectivement présentés aux figures 30 et 31.

FIGURE 30 : DENDROGRAMME CALCULE EN FONCTION DES PHyla IDENTIFIES

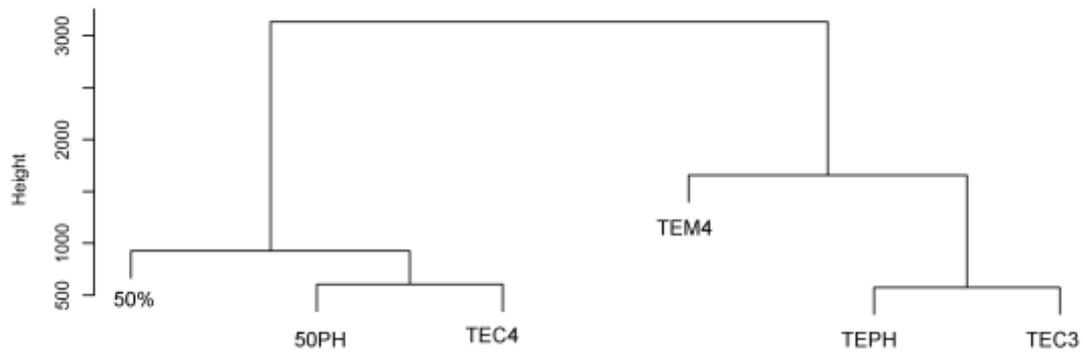
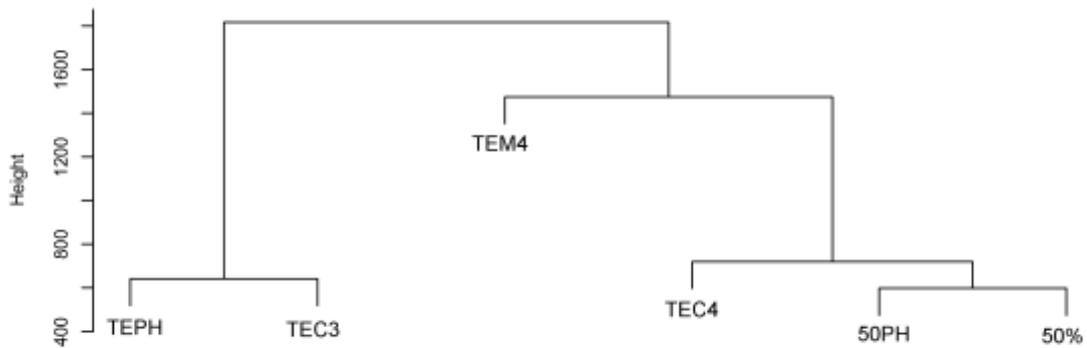


FIGURE 31 : DENDROGRAMME CALCULE EN FONCTION DES GENRES IDENTIFIES



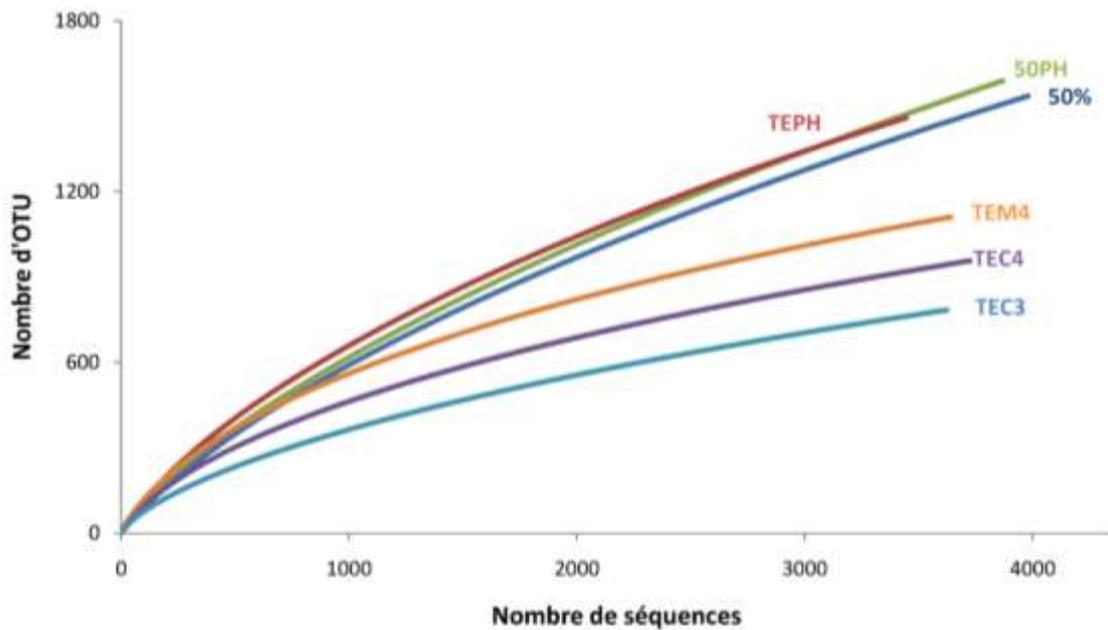
Partie expérimentale

Le nombre d'OTUs, la richesse (Chao1) et l'index de biodiversité (Np shannon) de chaque échantillon sont présentés au tableau 24. L'effet du nombre de séquences obtenues sur le nombre d'OTU identifiés est présenté à la figure 32.

TABLEAU 24 : OTU, INDEX DE BIODIVERSITE ET DE RICHESSE

	Nbr d'OTUs	Chao1	Np shannon
TEPH	2101	4811,70	7,29
50PH	2238	5796,62	7,48
TEC4	1411	2604,61	6,74
TEC3	1261	2636,15	6,51
TEM4	1994	3505,35	7,16
50%	1914	4777,16	7,37

FIGURE 32 : NOMBRE D'OTU IDENTIFIES EN FONCTION DU NOMBRE DE SEQUENCES OBTENUES (COURBE DE RAREFACTION)



IV. RESUME DES RESULTATS

LES FRACTIONNEMENTS

Comme présenté au tableau 25, les fractions virulentes les plus intéressantes sont : la fraction 50% qui met en évidence le plus d'espèces, la fraction DOX qui a les UFC/mL les plus faibles, la fraction RK501 qui ne contient plus de bactérie Gram négative et la fraction TEPH qui est exempte d'*E. faecium*.

COMPARAISONS DES FRACTIONS PAR DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les profils ARDRA n'ont pas permis la mise en évidence d'une bande d'intérêt malgré les 22 enzymes étudiées.

Trois bandes d'intérêt ont été mises en évidence par les profils de DGGE mais aucune séquence consensus n'a été trouvée. Donc, aucune séquence d'intérêt n'a pu être retenue.

Enfin, grâce aux profils de RAPD, deux bandes d'intérêt correspondant à deux séquences de 392pb (R6B) et 788pb (AP5) ont été découvertes. La séquence R6B est contenue dans le gène *yijP* d'après les bases de données existantes tandis que la séquence AP5 n'a aucune correspondance dans ces mêmes banques de données. La séquence R6B est présente dans le TEC4 et les fractions virulentes de celui-ci. Pourtant, le gène *yijP* n'est pas présent dans son entièreté même si plus de 787pb sur les 1746pb du gène ont été séquencées à partir du TEC4. D'après les analyses des prélèvements de terrains, la présence de R6B (en l'absence d'*yijP*) n'est significativement pas liée à la présence de l'EEL. Une souche de *Staphylococcus epidermidis* porteur de cette séquence est présente dans le TEC4 mais son inoculation ne permet pas de reproduire la pathologie. Le lien étiologique entre la séquence R6B et l'entéropathie n'est pas confirmé.

La séquence AP5 est présente dans toutes les fractions du TEC4, y compris les non virulentes. Aucun lien statistique ne relie la présence de cette séquence avec la présence de l'EEL. L'espèce porteuse de cette séquence dans le TEC4 n'a pas pu être identifiée. L'analyse de la flore fécale de lapins présentant des signes d'EEL et des lapins témoins par DGGE ne permet pas de mettre en évidence des bandes liées à la présence de la pathologie. Les profils des flores fécales sont liés au lapin et non à l'état sanitaire ou au jour. Parmi les bandes apparaissant au second jour après inoculation, jour où les matières fécales deviennent virulentes pour les autres animaux, aucun consensus de genre ou même de phylum n'a été découvert.

Une phase de bactériémie transitoire a été retrouvée chez 3 lapins inoculés sur les 18 mais chez aucun témoin. Plusieurs espèces sont présentes dans chaque prélèvement positif à la PCR 16SrDNA.

LE PYROSEQUENÇAGE DE SIX FRACTIONS SELECTIONNEES

Un total de 16 851 séquences a été retenu pour l'analyse, c'est-à-dire entre 4000 et 6300 pour chaque fraction. Dans toutes les fractions, les phyla *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les plus représentés. Entre 35 (TEM4) et 86 (50PH) genres ont été identifiés dans les fractions. Les dendrogrammes construits ne regroupent pas les fractions en fonction de leur virulence. Enfin, les courbes de raréfactions n'atteignent pas le traditionnel plateau, suggérant que la richesse des échantillons est sous-estimée.

TABLEAU 25 : PRESENTATION DE LA VIRULENCE ET FLORE BACTERIOLOGIQUE DES DIFFERENTS INOCULUM, FRACTIONS ET TEMOINS NEGATIFS

Nom	Méthode d'obtention	Reproduction de l'EEL	UFC moyen/mL	Nombre d'espèces identifiées	Bactérioscopie	Particularité
TEM1	Contenu caecal d'un lapin EOPS	non				
TEM2	Contenu caecal d'un lapin de compagnie	non				
TEM3	Contenu caecal d'un lapin d'élevage	non				
TEM4	Contenu caecal de 3 lapins EOPS	non	10 ³	5	≈ TEC4	<i>Clostridium</i> free
TEC3	Inoculum de référence (3ème génération)	oui	9,8.10 ⁶	7	≈ TEC4	
TEC4	Inoculum de référence (4ème génération)	oui	1,2.10 ⁷	7	Base d'analyse	
TEPH	TEC4 traité à l'acide (pH = 2,2)	oui	1,9.10 ⁷	7	↗ bacilles + et spores	<i>E. faecium</i> free
50%	Centrifugation sur coussins de sucrose	oui	1,4.10 ⁶	15	≈ TEC4	
50PH	50% traité à l'acide (pH = 2,2)	+/-	1.10 ⁶	8	↗ bacilles + et spores	<i>E. faecium</i> free
RK501	50% passé sur culture cellulaire RK13	oui	5.10 ⁵	6	disparition gram -	<i>Bacillus</i> free
CERK	RK501 traité au chloroforme éthanol	non	1,8.10 ³	7	Trop peu de bactéries	<i>Bacillus</i> free <i>E. faecium</i> free
AMC	TEC4 traité à l'amoxicilline /ac. clavulanique		4,8.10 ⁷	5	↗ coques +	
BACI	TEC4 traité à la bacitracine	oui	2.10 ⁷	4	↗ coques +	
CEF	TEC4 traité au ceftiofur		5,4.10 ⁷	4	↗ coques +	
DOX	TEC4 traité à la doxycycline	oui	9.10 ⁴	5	↗ coques +	
NOVO	TEC4 traité à la novobiocine		6.10 ⁶	7	↗ coques +	
STREP	TEC4 traité à la streptomycine		1,9.10 ⁷	5	↗ coques +	
TYL	TEC4 traité à la tylosine		2,5.10 ⁷	2	↗ coques +	<i>Clostridium</i> free
VAN	TEC4 traité à la vancomycine		4,7.10 ⁷	6	↗ coques +	
TAB	Témoin traitement antibiotiques	oui	2,2.10 ⁸	3	↗ coques +	

DISCUSSION GENERALE

Bien que l'étiologie infectieuse de l'entéropathie épizootique du lapin soit démontrée depuis plusieurs années (Le Gall *et al.*, 1998; Licois, 1998), l'agent responsable n'est toujours pas identifié aujourd'hui (Licois *et al.*, 2006; Marlier *et al.*, 2006; Licois, 2007). Néanmoins, l'implication d'une ou plusieurs espèces bactériennes non cultivables sur les milieux traditionnels est l'hypothèse étiologique la plus probable (Licois *et al.*, 2006; Marlier *et al.*, 2006; Szalo *et al.*, 2007). L'inoculation de lapins EOPS et conventionnels par l'un des inoculums TEC permet une reproduction expérimentale de cette maladie (Licois *et al.*, 2003; Licois et Coudert, 2005). Cependant, la richesse de flore bactérienne des inoculums de référence ne permet pas un isolement direct de la ou des bactérie (s) en cause (Licois *et al.*, 2005; Licois *et al.*, 2006; Marlier *et al.*, 2006).

Différentes méthodes de **fractionnement ou d'appauvrissement** ont été appliquées au TEC4. Une centrifugation sur gradient discontinu de sucrose a été réalisée sur base des résultats encourageants obtenus par Szalo et collaborateurs (2007) sur le TEC3. La fraction 50% a été choisie pour les inoculations expérimentales et les analyses par des techniques de bactériologie classique sur base des résultats d'inoculations et des analyses de flore bactérienne de Szalo et collaborateurs (2007) et de Licois (communication personnelle). En effet, cette fraction apparaît comme aussi virulente que TEC3, mais contient beaucoup moins de débris végétaux et une flore bactérienne appauvrie.

L'adhérence cellulaire est une étape importante dans la pathogénie de la plupart des infections (Niemann *et al.*, 2004). Un fractionnement sur base de la capacité d'adhérence de l'agent a donc été développé. Comme il n'existe pas de lignée cellulaire immortalisée d'entérocytes de lapin et que les cultures primaires de cellules de la muqueuse intestinale sont fastidieuses, des cellules de la lignée RK13 (cellules immortalisées de rein de lapin) ont été utilisées. Un double passage a été réalisé pour appauvrir le plus possible la flore non virulente de l'inoculum. Ces deux passages ont permis d'appauvrir la flore bactérienne tout en préservant le pouvoir virulent des inoculums. Néanmoins, la faible virulence de l'inoculum RK502 laisse entendre que l'agent ne s'y trouve qu'en faible quantité.

D'après des études antérieures, l'agent responsable de l'EEL résiste à un traitement au chloroforme/éthanol (Licois *et al.*, 2006). Ce traitement a donc été appliqué à la fraction RK501 pour tenter d'appauvrir la flore tout en maintenant une concentration importante de l'agent. La flore a été extrêmement appauvrie mais l'agent ne semble plus être présent en quantité suffisante pour reproduire l'EEL.

Après ces méthodes de fractionnement mécaniques et cellulaires, des traitements antibiotiques ont été utilisés, toujours dans le but d'appauvrir la flore bactérienne de TEC4. Comme certains antibiotiques ne sont efficaces que sur les cellules bactériennes en croissance, un milieu de culture très peu sélectif et enrichi avec du sérum de cheval a été utilisé et les antibiotiques ont été ajoutés après trois heures d'incubation. Cette étape d'incubation a très certainement modifié la flore bactérienne, permettant aux espèces se multipliant rapidement dans ce milieu de supplanter les espèces non cultivable ou celles à croissance plus lente. Globalement l'efficacité des traitements aux antibiotiques n'a pas été suffisante et bien loin de l'efficacité attendue. En effet, certaines souches sensibles aux antibiotiques utilisés étaient toujours présentes après traitement. Des mécanismes de

résistances et de synergie entre les différentes souches bactériennes présentes dans le TEC4 ne permettent sans doute pas aux antibiotiques d'agir sur certaines espèces sensibles en culture pure.

Une des particularités physiologique du lapin est d'avoir un pH stomacal particulièrement acide (2,2) (Brugère-Picoux, 1989). La (les) bactérie (s) responsable (s) de l'EEL est (sont) soumise (s) à ce pH sans être détruite (s). Un traitement du TEC4 par acidification a donc été réalisé. L'utilisation d'HCl concentré semblait la méthode la plus proche de la réalité physiologique mais les membranes des bactéries survivantes laissaient suggérer un état de souffrance. Vu les profils similaires (bactérioscopie et CFU) obtenus avec le traitement au tampon phosphate-citrate, celui-ci a été choisi pour obtenir les fractions.

La concentration en agent étiologique dans les fractions TEPH, 50%, RK501, BACI, DOX et TAB est suffisante pour reproduire la chute significative du GQM qui est le signe clinique le plus spécifique d'une reproduction expérimentale de l'EEL réussie (Licois *et al.*, 2005). En plus de la chute du GQM, les autres signes cliniques typiques lors de reproduction expérimentale d'EEL (morbidité, mortalité et lésions) ont été observés chez les animaux inoculés avec ces fractions ce qui démontre encore, si nécessaire, leur virulence.

Les légères chutes progressives de GQM obtenues lors de l'inoculation des fractions 50PH et RK502 ressemblent à l'image obtenue lors d'inoculation de dilution 10^{-4} du TEC4 (Licois et Coudert, 2005), laissant supposer la présence en très faible quantité de l'agent ou en cas d'étiologie multiple, la disparition d'un des agents responsables. Lors de l'inoculation de la fraction 50PH et lors de celle de la fraction RK502, un animal mort présentait dans les deux cas des lésions typiques d'EEL, ces deux fractions sont donc considérées comme moyennement virulentes.

L'étude des fractions par des techniques classiques de **bactériologie** a permis de vérifier l'efficacité des fractionnements (modification quantitative et qualitative des flores par rapport à l'inoculum de départ) et de mettre en évidence des espèces non détectées au préalable par mise en culture directement à partir des TEC. Différentes méthodes ont été utilisées pour analyser la flore afin de pallier aux biais inhérents à chacune d'entre elles.

La visualisation directe des fractions par examen **bactérioscopique** permet de compter et de classer en fonction de leur morphologie et capacité tinctoriales les cellules bactériennes cultivables et non cultivables présentes dans les fractions. Elle ne permet par contre pas de les identifier. La disparition apparente des bactéries Gram négatives dans la fraction RK501 qui reproduit expérimentalement l'EEL laisse supposer que l'agent étiologique est une bactérie Gram positive. Au vu du spectre d'action de la bacitracine de zinc, antibiotique ayant démontré l'activité thérapeutique la plus répétable dans les élevages atteints d'EEL (Richard *et al.*, 2000; Duperray *et al.*, 2003; Maertens *et al.*, 2005), cette hypothèse est très probable.

Les **mises en culture** sur milieux traditionnels ne permettent d'identifier qu'une partie restreinte de la flore présente dans les inoculums. Dix espèces jamais identifiées à partir du TEC4 l'ont été grâce aux fractionnements. Sept de ces espèces sont des bactéries ubiquistes (ou commensales d'autres animaux que le lapin) pathogènes opportunistes: *Brevibacterium sp* (Gruner *et al.*, 1993), *Brevundimonas vesicularis* (Yang *et al.*, 2006), *Cellulomonas sp* (Hemmat et Emtiazi, 2000; Kang *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2009), *Corynebacterium bovis* (Boyer, 1998; Dalal *et al.*, 2008; Burr *et al.*, 2009; Koop *et al.*, 2010; Mudit *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2010), *Gemella*

moribillorum (La Scola et Raoult, 1998), *Pseudomonas luteola* (Dalmaga et al., 2004; Altinok et al., 2007; Gaschet et al., 2009) et *Sphingobacterium spiritivorum* (Hiar et al., 2002). Les trois autres espèces sont *Bacteroides distasonis*, *Fusobacterium necrogenes* et *Mannheimia haemolytica*.

Bacteroides distasonis est une bactérie présente dans la flore digestive commensale du lapin (Pacini et al., 1989) et dont le pouvoir pathogène n'a jamais été démontré. *Fusobacterium necrogenes* est présente dans le tractus digestif du porc et des bovins (Terada et al., 1976; Wada, 1978) mais ne provoque aucun signe clinique ni lésion après inoculation sur souris et ne semble pas être pathogène primaire ou opportuniste (Smith et al., 1984). Cette espèce a déjà été écartée des agents étiologiques potentiels de l'EEL dans une étude antérieure (Marlier et al., 2003). *Mannheimia haemolytica* est un pathogène primaire des ruminants, responsable de pneumonies, de mammites et de septicémies (Euzéby, 1998). Néanmoins, le pourcentage d'identification obtenu avec la galerie commerciale API® 20E (BioMérieux) pour cette dernière souche isolée étant relativement faible (75,4 %), la bactérie pourrait fort bien être une *Pasteurella*, espèce commensale du lapin mais dont certaines souches sont pathogènes (Kpodekon et al., 1999). Malheureusement, la perte de la souche n'a pas permis la confirmation de cette théorie.

Le rôle étiologique dans l'EEL de ces dix espèces cultivées pour la première fois à partir de TEC4 est donc improbable.

Les flores bactériennes cultivables des fractions traitées aux antibiotiques sont peu diversifiées. Les espèces *Clostridium sordelli* et *Bacillus firmus* prolifèrent massivement et inhibent la croissance des autres espèces durant les 27h du fractionnement dans le milieu liquide et les 24h de mise en culture sur milieux solides.

De nouvelles espèces présentes dans le TEC4 ont pu être identifiées grâce aux fractionnements alors que d'autres espèces semblent disparaître des nouvelles fractions. Les fractions traitées à l'acide ne contiennent plus *Enterococcus faecium*, pourtant dominant dans la flore cultivable de la plupart des autres fractions. Comme la fraction TEPH reproduit la maladie, *E. faecium* ne peut être l'agent étiologique unique ou l'un des agents multiples nécessaire à la reproduction de l'EEL, ce qui confirme les résultats obtenus par Marlier et collaborateurs (2006). La fraction traitée à la tylosine ne contient plus aucune des espèces de *Clostridium* habituellement isolées des différentes fractions. Malheureusement sa virulence potentielle n'a pas encore été vérifiée par inoculation expérimentale.

Malgré les enrichissements réalisés, aucune **entérobactérie** n'a pu être cultivée à partir du TEC4 ou de ses fractions. Ce résultat confirme à nouveau l'absence d'*Escherichia coli* dans les inoculums (Licois et Coudert, 2001; Licois et al., 2005) et élimine définitivement *E. coli* de la liste des agents étiologiques de l'EEL. Clairement, le rôle d'*E. coli* dans l'EEL se cantonne aux seules complications bactériennes secondaires.

Les différences de concentration bactérienne exprimées en **UFC/mL** entre les fractions sont une estimation quantitative de l'efficacité des différentes méthodes de fractionnement. La fraction virulente contenant le moins de bactéries cultivables est la fraction traitée à la doxycycline. Les autres fractions ayant des UFC/mL significativement plus basses que celles du TEC4 sont la fraction 50% et ses deux fractions dérivées (50PH et RK501). La méthode de centrifugation sur gradient discontinu de sucrose permet donc de diminuer significativement le nombre de bactéries cultivables.

A l'inverse, la plupart des fractions traitées aux antibiotiques ont un nombre d'UFC/mL significativement plus élevé que celles du TEC4. L'utilisation d'un milieu de culture riche en différents facteurs de croissances durant 27h entraîne une augmentation importante des concentrations bactériennes lorsque l'efficacité des antibiotiques utilisés est limitée comme le montrent les UFC/mL du TAB. De manière générale, lorsque la durée de la méthode de fractionnement est longue (plusieurs heures), la flore cultivable a tendance à s'accroître significativement même dans un milieu pauvre en nutriments.

L'approche comparative des flores digestives physiologiques et porteuses de l'agent étiologique le l'EEL par **ARDRA** a déjà été tentée par Badiola et collaborateurs (2005) et par Szalo et collaborateurs (Szalo et Marlier, 2006). Dans la première étude, des flores intestinales de lapins provenant d'une exploitation contaminée par l'EEL ont été comparées à des flores de lapins provenant d'une exploitation exempte d'EEL. Deux bandes d'intérêt ont été mises en évidence mais l'espèce bactérienne associée n'avait pas permis de reproduire la pathologie (Badiola *et al.*, 2005). Aucune de ces bandes n'a été identifiée lors des ARDRA réalisées sur le TEC4 et ses fractions. Ceci peut être expliqué par l'origine des prélèvements. En effet, les flores digestives d'animaux d'élevage ou sauvages sont très différentes de celles d'animaux EOPS (Bennegadi *et al.*, 2003; Norin et Midtvedt, 2009). L'étude de Szalo et collaborateurs (2006) effectuée sur le TEC3 et les fractions sucrose du TEC3 avait mis en évidence une bande spécifique d'environ 700pb aux inoculums virulents grâce à l'enzyme *Sau 3A I*. Cette étude est peu comparable avec celle-ci. En effet, même si les profils de TEC3 sont comparables entre les deux études, ceux de TEC4 et de ses fractions sont bien distincts du TEC3 et de ses fractions similaires. La différence entre ces deux inoculums est démontrée aussi bien grâce à la bactériologie classique que par les différents profils de PCR présentés ici.

Des **DGGE** ont déjà été utilisés pour comparer les flores de lapin (Abecia *et al.*, 2007), mais jamais dans le but de mettre en évidence l'agent responsable de l'EEL. Dans les DGGE comparatives de flores bactériennes de TEC4 et de ses fractions, plusieurs bandes d'intérêt ont été mises en évidence mais aucun consensus d'espèce n'a pu être défini. En effet, ces bandes situées à la même hauteur dans le gel dénaturant ne correspondent apparemment pas à la même séquence. Ce phénomène a déjà été décrit par Gafan et Spratt (2005). Il peut être expliqué par la présence de plusieurs espèces dans chaque bande mais dans des rapports différents. L'espèce présente en plus grande quantité étant préférentiellement amplifiée dans la PCR et par conséquent étant la seule séquencée.

Les DGGE et ARDRA sont très régulièrement utilisées dans les études de populations bactériennes complexes, de même que toutes les techniques utilisant l'amplification du gène 16SrDNA (Wang *et al.*, 2007). Comme le gène 16SrDNA est utilisé pour l'étude des populations et pour la taxonomie bactérienne (McInerney *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2007), le nombre de séquences de 16SrDNA présentes dans les bases de données est considérable et ces séquences sont souvent identifiées comme provenant de bactéries non cultivées. La technique de **RAPD** ne cible aucun gène en particulier ce qui évite généralement les correspondances avec des séquences provenant de bactéries non cultivées, mais peut également amplifier des séquences non encore présentes dans les bases de données. De plus, la RAPD ne permet pas d'obtenir des résultats interprétables pour la fraction RK501. En effet, celle-ci contient plus d'ADN eucaryote que bactérien et les deux sont amplifiés par les amorces peu spécifiques des RAPD. Enfin, l'utilisation de la **RAPD** a déjà démontré

son efficacité pour l'étude des flores de bioréacteurs (Pravin *et al.*, 2007), des communautés bactériennes du sous-sol (Findlay et Sinsabaugh, 2006) et des flores de surface de fromages (Brennan *et al.*, 2002).

La présence dans le TEC4 d'une partie d'un gène spécifique aux entérobactéries est surprenante puisque ces dernières n'ont jamais été isolées du TEC4 ni d'un autre TEC (Licois *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006; Szalo *et al.*, 2007). Néanmoins, même si la séquence R6B ne correspond qu'au gène *yijP* dans les banques de données, aussi bien en séquence nucléotidique qu'en analysant les phases ouvertes de lecture, ce gène est absent dans son intégralité du TEC4 et de ses fractions. L'hypothèse d'un élément génétique mobile (plasmide, transposon ou phage) portant un fragment du gène *yijP* est donc possible.

Aucune correspondance n'existe entre la séquence nucléotidique d'AP5 et les banques de données existantes, néanmoins, l'une des phases ouvertes de lecture correspond à une hypothétique protéine d'*Eggerthella lenta*. Cette espèce est présente dans le tractus digestif humain et participe à la digestion des lignines (Clavel *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2007). Elle a été décrite comme pathogène opportuniste lors d'une bactériémie (Chan et Mercer, 2008) et d'une spondylodiscite (Bok et Ng, 2009). Elle n'a jamais été identifiée à partir du TEC4.

Les **études de terrain** avaient pour but de confirmer ou infirmer le lien entre les séquences d'intérêt identifiées et la présence de l'EEL sous une forme clinique. Malheureusement, aucun lien statistique entre la présence ou l'absence d'une ou des deux séquences d'intérêt (R6N et AP5) et l'EEL n'a pu être établi. Néanmoins, d'un point de vue biologique, des animaux pourraient être porteurs de ces séquences sans montrer de signe clinique d'EEL en tant que porteur chronique de (s) l'agent(s) infectieux comme c'est le cas pour la pasteurellose (Coudert *et al.*, 2006; Jaglic *et al.*, 2008) ou la colibacillose du lapin (Boullier et Milon, 2006). Une autre explication pourrait être l'existence de plusieurs souches ou biotypes différents avec des virulences variables comme c'est par exemple le cas dans les colibacilloses chez le lapin (Peeters *et al.*, 1988; DebRoy et Maddox, 2001). Ces « faux positifs » pourraient également être expliqués dans le cadre d'une étiologie multiple où la souche porteuse de la séquence d'intérêt ne serait qu'un des agents responsables de la maladie comme cela est décrit par exemple dans la rhinite atrophique du porc (Hsuan *et al.*, 2009). Malgré ces différentes explications possibles concernant les « faux positifs », les « faux négatifs » sont trop nombreux pour qu'un lien direct existe entre la présence d'une des séquences et l'EEL puisse être retenue.

La souche bactérienne porteuse de la séquence AP5 n'a pas pu être isolée en culture pure, par contre une souche de *Staphylococcus epidermidis* porteuse de la séquence R6B a pu être isolée. *S. epidermidis* est une espèce bactérienne commensale de la peau humaine (Ziebuhr *et al.*, 2006) et est responsable d'infections nosocomiales (Ding *et al.*, 2009; Piette et Verschraegen, 2009). En médecine vétérinaire, cette espèce joue un rôle dans les mammites chez les bovins (Sampimon *et al.*, 2009). La séquence R6B est cependant absente des séquences des cinq chromosomes et des onze plasmides publiés de *Staphylococcus epidermidis* (GenBank).

Après l'isolement d'une souche en culture pure, la dernière étape pour répondre aux postulats de Koch était d'inoculer des animaux pour tenter la reproduction expérimentale de l'EEL. En dépit des résultats décevants obtenus par l'étude des prélèvements de terrain, *Staphylococcus epidermidis* présentait des caractéristiques importantes permettant d'établir un lien potentiel avec l'EEL : *S. epidermidis* est une bactérie Gram positive, très vraisemblablement comme l'agent

étiologique de l'EEL ; la pathologie étant reproduite avec la fraction RK501 qui ne contient plus de bactérie Gram négative. Ensuite, cette espèce n'avait encore jamais été inoculée ni même isolée d'un inoculum TEC. Enfin, cette espèce est connue pour produire des toxines comme l'entérotoxine et la « toxic shock syndrome toxin 1 » (Carneiro *et al.*, 2004) et le rôle d'une toxine a été démontrée dans la pathogénie de l'EEL (Licois, 2007).

Malheureusement, l'inoculation de la souche de *Staphylococcus epidermidis* R6B+ à des lapins EOPS n'a pas permis de reproduire l'EEL ni au niveau clinique, ni au niveau lésionnel. A nouveau, dans le cas d'une maladie multifactorielle, l'inoculation d'un seul agent ne peut suffire à reproduire la pathologie (condition nécessaire mais non suffisante). Globalement, au vu des différents résultats obtenus sur les prélèvements de terrains et après inoculation de cette souche bactérienne, le rôle étiologique de *Staphylococcus epidermidis*R6B+ ou d'autres espèces bactériennes potentiellement porteuses de la séquence R6B semble peu probable. L'absence de la séquence R6B dans les séquences génomiques de *Staphylococcus epidermidis* publiées à ce jour ainsi que la perte de positivité à R6B après des repiquages successifs de la souche positive au départ tend à suspecter que cette séquence se situerait dans un élément génétique mobile présent dans le TEC4.

L'étude comparative des flores bactériennes du TEC4 et de ses fractions n'a au final pas permis de mettre en évidence l'agent responsable de l'EEL, mais deux séquences d'intérêt ont été étudiées. L'une des deux séquences est répertoriée comme liée aux bactéries Gram négatives mais a été retrouvée dans l'ADN total extrait d'une bactérie Gram positive.

Parallèlement à l'étude approfondie des séquences d'intérêt, de nouvelles comparaisons ont été réalisées sur base d'une analyse des flores bactériennes **avant et après inoculation**. Cette autre approche permettait d'augmenter le nombre de prélèvements pour mettre en évidence de nouvelles bandes d'intérêt lors d'analyse de la flore fécale par **DGGE**.

Aucune variation de la flore aussi bien en nombre de bandes qu'en conformation de bandes n'est statistiquement liée à la pathologie de manière significative. Ceci confirme les résultats de Combes et collaborateurs (2009) obtenus lors d'une étude similaire à savoir que la structure, la richesse et la densité de la communauté bactérienne totale n'ont pas été affectées durant la reproduction expérimentale de l'EEL.

Chez les animaux inoculés, aucune bande spécifique n'apparaît, ni ne disparaît de manière systématique. L'apparition d'une bande aurait pu permettre d'identifier l'agent responsable ou une espèce compliquant secondaire, tandis que la disparition d'une bande aurait pu permettre l'identification d'une espèce antagoniste avec l'agent de l'EEL.

D'après l'étude des profils de DGGE par StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009), les différences entre les profils dépendent essentiellement du lapin analysé et non pas du traitement (inoculé ou témoin) ou du jour du prélèvement. D'autres effets peuvent pourtant être mis en évidence grâce à la DGGE comme le démontre l'étude d'Abecia et collaborateurs (2007) sur les variations de flore en fonction des traitements antibiotiques utilisés. Dans ce cas, un effet du traitement a été mis en évidence mais comme il n'y a pas eu de prélèvements répétés sur le même lapin, l'effet de la flore individuelle de chaque lapin n'a pas été étudié.

En plus des regroupements des profils en fonction de l'individu, les profils de la région V3 des prélèvements provenant de lapin morts d'EEL se regroupent. Ceci pourrait démontrer une flore différente lors de signes cliniques sévères d'EEL. Toutefois ces différents prélèvements, récoltés quand les animaux étaient toujours en vie mais présentaient des signes sévères de pathologie digestive, n'étaient pas des matières fécales normales mais, le plus souvent, étaient du mucus ou des cæcotrophes. Or, l'étude de Michelland et collaborateurs (2009) démontre que la flore bactérienne des matières fécales d'excrétion du lapin est différente de celle des cæcotrophes ce qui pourrait expliquer le regroupement des profils obtenus à partir de prélèvements de lapins morts d'EEL. Comme cela avait déjà été démontré lors d'une étude réalisée avec les mêmes amorces (Yu et Morrison, 2004), la région V3 est plus discriminante que les régions V6-V8 lors d'études des populations.

Puisqu'aucune bande ne semblait statistiquement liée à la présence de la pathologie, les bandes apparaissant à J2 chez les animaux malades ont été séquencées. En effet, dès le second jour après inoculation, les matières fécales des lapins infectés contiennent le(s) agent(s) étiologiques en quantité permettant une reproduction expérimentale de la maladie par inoculation à des lapins sains (Licois *et al.*, 2000). Les différentes espèces mises en évidence par ces séquençages sont pour la plupart des phyla *Firmicutes* ou *Bacteroidetes*. Cette observation n'est pas étonnante puisque la flore du lapin serait constituée à 97% par ces espèces. Les genres bactériens identifiés comme apparaissant à J2 sont apathogènes et isolés à partir du tractus digestif du lapin (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcus* (Bennegadi *et al.*, 2003) et *Bacteroides* (Pacini *et al.*, 1989)) ou d'autres mammifères (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcus* (Bennegadi *et al.*, 2003), *Bryantella* (Wolin *et al.*, 2003), *Akkermansia* (Collado *et al.*, 2007), *Subdoligranulum* (Holmstrom *et al.*, 2004), *Leuconostoc* et *Enterobacter* (Park *et al.*, 2005)) à l'exception de *Moryella* sp qui a été identifié uniquement dans des abcès (Carlier *et al.*, 2007) et de *Shigella* qui est responsable de diarrhées chez les primates mais qui est apathogène chez les autres mammifères (Ryan et Ray, 2004). Le rôle étiologique de ces deux derniers genres dans l'EEL est donc fort improbable.

Lors des différentes études des **paramètres sanguins** en cours de reproduction expérimentale d'EEL, l'hypothèse d'une infection bactérienne et potentiellement d'une phase de **bactériémie** lors de la phase précoce de l'EEL a été émise (Jobert *et al.*, 2001; Marlier *et al.*, 2003; Dewrée *et al.*, 2007; Xylouri *et al.*, 2008). L'inoculation de sang d'animaux contaminés n'a pas permis de reproduire la maladie, mais le sang utilisé ne provenait pas de lapins en phase précoce d'EEL. De plus, il a été inoculé par voie intraveineuse et non par voie orale (Le Gall *et al.*, 1998). La présence de l'agent dans le sang durant la phase précoce est, donc, concevable. A nouveau, les techniques de biologie moléculaire ont été préférées aux techniques bactériologiques classiques pour étudier cette bactériémie potentielle. Deux raisons principales justifient ce choix. La première est l'hypothèse selon laquelle l'agent responsable de l'EEL est une bactérie non cultivable. La seconde est la preuve récente que l'analyse par des techniques de biologie moléculaire est plus performante que les traditionnelles mises en culture pour détecter une bactériémie ou une septicémie (Molina *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Gaibani *et al.*, 2009; Reier-Nilsen *et al.*, 2009).

Les espèces bactériennes possèdent des ITS de taille variable (Fisher et Triplett, 1999). Des essais de mise au point infructueux sur l'amplification de l'ITS pour la détection d'une bactériémie potentielle ont été réalisés, car cette technique aurait permis d'identifier le nombre d'espèces présentes dans l'échantillon. Malheureusement, l'ADN eucaryote de lapin présent dans les

échantillons était systématiquement amplifié par la PCR, rendant très fastidieuse la détection de bactériémies.

Le faible nombre de lapins inoculés qui présentaient une bactériémie à J2 n'est pas statistiquement significatif par rapport au lot témoin. Néanmoins, la bactériémie pourrait être de courte durée ou intermittente. Le nombre d'animaux présentant une bactériémie lors du second jour post inoculation pourrait donc être plus élevé. Comme les chromatogrammes des séquençages directs après PCR présentaient des doubles pics, la présence de plusieurs espèces dans les différents prélèvements a été suspectée et un clonage a été réalisé sur le gène 16SrDNA dans son intégralité et sur les régions V6-V8 qui donnent de meilleurs résultats lors de clonage.

A l'exception des genres *Actinobacillus* et *Aerococcus*, les autres genres mis en évidence dans les échantillons de sang sont retrouvés notamment dans la flore digestive des mammifères (Euzéby, 2008; Monteils *et al.*, 2008; Ou *et al.*, 2009; Suchodolski *et al.*, 2009). Les genres *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* (Benet et Vanhems, 2009), *Aerococcus* (Popescu *et al.*, 2005; Ibler *et al.*, 2008), *Propionibacterium* (Benet et Vanhems, 2009), *Moraxella* (Sano *et al.*, 2010), *Actinobacillus* (Patterson-Kane *et al.*, 2001), *Haemophilus* (Morton *et al.*, 2009) ont déjà été identifiés lors de bactériémies.

Une perte d'intégrité de la paroi intestinale permet l'entrée dans le système vasculaire d'organismes présents dans le tractus digestif (Peregudov et Khanevich, 1996). Ce phénomène pourrait expliquer la présence d'espèces différentes dans les trois prélèvements de sang positifs à J2. La présence d'un nombre élevé d'espèces dans le flux sanguin est surprenant mais des septicémies et bactériémies polymicrobiennes ont déjà été détectées dans différentes études (Kumhar *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2006; Munoz *et al.*, 2008). De plus, les mutations étant inévitables durant la PCR, un seul genre bactérien présent pourrait donner deux amplicons proches phylogénétiquement mais identifiés comme deux genres différents. Néanmoins, dans les trois prélèvements positifs, au moins deux phyla différents sont présents. Une autre explication pourrait être une contamination des échantillons lors des prélèvements mais la probabilité que seuls des échantillons provenant d'animaux malades aient été contaminés est négligeable, les prélèvements ayant été effectués par les mêmes personnes et dans des conditions semblables.

La mise au point de techniques de **séquençage à ultra haut débit** est récente (Margulies *et al.*, 2005), mais ces dernières sont de plus en plus utilisées pour l'étude des métagénomés (Droege et Hill, 2008; Armougom et Raoul, 2009). Le « Roche FLX Genome Sequencer » a déjà été utilisé sur des régions du gène 16SrDNA pour étudier la flore digestive humaine (Dethlefsen *et al.*, 2008; Turnbaugh *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010), des bovins (Dowd *et al.*, 2008), des porcs (Poroyko *et al.*, 2010) des macaques (McKenna *et al.*, 2008), des chiens (Middelbos *et al.*, 2010). Il a également été utilisé pour comparer celle d'une centaine d'espèces de mammifères du zoo de San Diego, y compris le lapin (Ley *et al.*, 2008). A ce jour, aucune technique de séquençage à ultra haut débit n'avait été employée pour comparer la flore fécale du lapin sain à celle du lapin souffrant d'EEL.

Cette méthode possède une résolution égale à un clonage shotgun du gène 16SrDNA (Huse *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). De plus, les méthodes de stockage ou d'extractions des échantillons ne semblent pas avoir d'effet sur les résultats (Wu *et al.*, 2010).

Le phylum *Firmicutes* est le phylum dominant dans les différentes fractions. Cette observation correspond à une étude par séquençage d'une librairie de clones du gène 16SrDNA dans laquelle le phylum *Firmicutes* représentait 97% de la flore caecale du lapin sain (Monteils *et al.*, 2008). Le TEC4 est le seul échantillon dans lequel ce phylum représente moins de 90%. Il présente par contre un pourcentage plus élevé de bactéries du phylum *Proteobacteria* (14,9%). Cette tendance ne se retrouve pas dans les cultures traditionnelles puisque les bactéries du phylum *Proteobacteria* ne sont isolées que de manière anecdotique dans certaines fractions du TEC4 et jamais directement du TEC4 (*Brevundimonas vesicularis* dans 50% et 50PH, *Mannheimia haemolytica* dans 50% et *Pseudomonas luteola* dans 50PH et TEPH).

Les genres identifiés par le séquençage sont donc différents de ceux identifiés par des méthodes de culture traditionnelles. Le genre *Enterococcus*, retrouvé majoritairement en culture dans TEC3, TEC4 et la fraction 50% correspond respectivement à 11,58%, 0,03% et 0,54% des séquences identifiées. Ce genre *Enterococcus* représente aussi respectivement 0,66% et 0,27% des séquences identifiées dans TEPH et 50PH, alors qu'il n'a jamais été cultivé à partir ces échantillons.

De même, les genres *Clostridium* et *Bacillus* sont en général des genres majoritairement identifiés lors de mise en culture, alors qu'ils ne représentent en moyenne que 5,57% des séquences identifiées dans les différents inoculums. La fraction 50% est celle contenant le plus de bactéries des genres *Clostridium* et *Bacillus*, ce qui concorde avec les études menées par bactérioscopie et culture classique sur les fractions sucrose.

A l'inverse, le genre *Escherichia* représente jusqu'à 14% des séquences identifiées dans TEC4 alors qu'il n'a jamais été mis en culture à partir ni du TEC4, ni d'aucune autre fraction. En plus d'*E. coli*, il existe 4 espèces d'*Escherichia* : *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* and *E. vulneris* (Euzéby, 1998) : la première n'a jamais été isolée d'animaux (Euzéby, 1998), la deuxième serait un pathogène opportuniste chez les bovins et ovins (Bain et Green, 1999), la troisième est ubiquiste et non pathogène et la quatrième semble également ubiquiste et pathogène pour la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), les poissons du genre *Poecilia* et le carassin commun (*Carassius carassius*) (Euzéby, 1998). Aucune de ces quatre espèces n'a été cultivée à partir du TEC4 alors qu'elles sont cultivables sur milieux traditionnels.

Le genre *Escherichia* (espèces *coli* et *fergusonii*) a néanmoins été identifié par d'autres techniques de biologie moléculaire dans le TEC4 à savoir la DGGE. De plus, une séquence proche des *Escherichia* mais présente dans d'autre genres a également été identifiée à partir du TEC4 par RAPD. En dehors du genre *Escherichia*, d'autres genres jamais identifiés par culture (*Sporobacter*, *Subdoligranulum* et *Ruminococcus*) représentent une proportion non négligeable des séquences.

Les dendrogrammes ne montrent aucun regroupement des échantillons en fonction de leur virulence. Au contraire, les deux échantillons non virulents sont assez éloignés et l'échantillon 50PH est beaucoup plus proche de l'échantillon 50%. Ce rapprochement phylogénétique est certainement dû à la sélection de la centrifugation sur coussin de sucrose utilisée sur les deux échantillons.

Enfin, la richesse des échantillons est élevée. En effet, le nombre d'OTU est supérieur à ceux retrouvés dans la flore des sols (Roesch *et al.*, 2007) ou dans la cavité buccale (Chun *et al.*, 2010) et semblable à ceux trouvés dans la flore intestinale humaine (Dethlefsen *et al.*, 2008). La diversité est elle aussi élevée, voire plus élevée, que celle de la flore digestive humaine : 7,16 pour le contenu

Discussion générale

caecal des lapins EOPS (TEM4) contre 4,63 en moyenne chez l'homme (Turnbaugh *et al.*, 2009). Paradoxalement, les fractions semblent même plus riches et diversifiées que les inoculums ce qui est contraire au but du fractionnement. Les différentes courbes de raréfaction (figure 32) n'atteignent pas un niveau de plateau dû à un nombre trop faible de séquences pour chaque échantillon. En conséquence, la richesse est sans doute sous-estimée et la diversité surestimée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les différentes étapes de fractionnement ont permis d'appauvrir la flore de manière quantitative et qualitative. Les fractions présentant le plus grand intérêt sont la 50% pour son appauvrissement et sa forte virulence, le TEPH qui est exempt d'*Enterococcus faecium* et la DOX qui est la fraction virulente qui a le plus faible UFC/mL. La fraction RK501 est intéressante d'un point de vue flore bactérienne puisqu'elle est encore plus appauvrie que la fraction 50%, mais la présence de cellules eucaryotes en grande quantité pose souvent problème pour les études en génomique. Néanmoins, la virulence de cette fraction exempte de bactéries Gram négatives permettrait d'émettre l'hypothèse que l'agent étiologique est une bactérie Gram positive. Les nouvelles espèces bactériennes mises en évidence en utilisant ces fractionnements sont, pour la plupart, des espèces ubiquistes pathogènes opportunistes, à l'exception de *Fusobacterium necrogenes* et de *Bacteroides distasonis* qui font partie de la flore digestive du lapin et de *Mannheimia haemolytica* qui est considéré comme pathogène primaire en médecine bovine.

Les études comparatives de la flore bactérienne basées sur l'analyse des gènes 16srDNA n'ont pas permis de mettre en évidence de séquences d'intérêt. De plus, ce gène ayant été et étant toujours l'objet de nombreux travaux, de nombreuses séquences correspondant uniquement à des bactéries non encore cultivées sont présentes dans les banques de données et ne permettent pas de tirer des conclusions définitives. Les résultats les plus probants ont été obtenus par analyse de profils de RAPD qui ont permis la mise en évidence de deux séquences d'intérêt de 392pb et 823pb. La première correspond à une séquence présente dans deux souches de *Staphylococcus epidermidis* présentes dans le TEC4 et la seconde n'a pas pu être associée à une espèce. Malheureusement, aucune de ces séquences n'a un lien statistique significatif avec la présence de la maladie sur le terrain et la souche *Staphylococcus epidermidis* R6B+ ne reproduit pas la maladie.

Les comparaisons des flores fécales de lapins non inoculés et inoculés en cours de reproduction expérimentale d'EEL par DGGE n'ont pas permis la mise en évidence d'une bande ou d'un patron de bandes liés à la maladie. Les bandes apparaissant au second jour chez les inoculés ne correspondent pas à une espèce ni une famille spécifique. La présence d'une potentielle bactériémie a été confirmée chez 3 lapins sur 18, mais les espèces détectées étaient toutes différentes. L'hypothèse de souches opportunistes profitant de la fragilité de la paroi intestinale suite à la maladie est donc la plus probable.

Les résultats obtenus lors du séquençage à ultra haut débit des différentes fractions renforcent l'idée qu'utiliser la biologie moléculaire pour analyser les inoculums est intéressante. En effet, de grandes différences de profils entre les cultures et le séquençage sont mises en évidence et la richesse bactérienne de ces échantillons est particulièrement élevée. D'un autre côté, si la résolution de ce genre d'analyse (souvent limité au genre) pourrait être utile pour limiter la recherche de l'agent dans une seule famille ou un seul genre bactérien, elle est insuffisante pour identifier l'agent directement.

En conclusion, bien que l'agent responsable de l'EEL n'ait pas été identifié, différentes précisions ont été obtenues quant à la description de la flore des inoculums de référence, des animaux atteints d'EEL et de la bactériémie suspectée. Plusieurs perspectives sont ouvertes pour continuer les recherches sur l'entéropathie.

Conclusions et perspectives

Dans le cadre de l'identification de l'agent étiologique, une étude approfondie devrait être réalisée sur les éléments génétiques mobiles présents dans le TEC4 ou dans les contenus intestinaux de lapins malades. En effet, des facteurs de virulences (le gène codant pour la toxine par exemple) pourraient être présents sur un élément génétique mobile tout comme les gènes de virulences de *Vibrio cholerae* (agent responsable du cholera) proviennent du bactériophage CTX (Waldor et Friedman, 2005) ou le gène de la Verotoxine (responsable du syndrome hémolytique et urémique) (Mainil et Daube, 2005).

L'isolement et l'étude de la toxine déclenchant la phase précoce de la maladie pourrait être une alternative pour identifier l'agent étiologique, même si l'identification de cette protéine au sein des TEC ne soit guère plus simple que l'identification directe de l'agent.

L'épidémie d'entéropathie épizootique du lapin est contrôlée depuis quelques années, mais de nombreux ateliers sont toujours touchés par cette pathologie. Il est donc important de continuer les recherches afin que des réponses soient apportées concernant non seulement l'identité de l'agent responsable, mais également la pathogénie, la prophylaxie et les traitements spécifiques à mettre en place pour lutter contre cette maladie.

PUBLICATIONS

1. ARTICLE : "INOCULATION AND BACTERIAL ANALYSES OF FRACTIONS OBTAINED FROM THE REFERENCE INOCULUM TEC4 WHICH EXPERIMENTALLY REPRODUCES EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY."

Un premier article a été publié au World Rabbit Science sur les fractions sucrose, d'adhérence sur tapis cellulaire et traitées au chloroforme/éthanol. Ces différentes méthodes de fractionnement ainsi que leur analyse par bactériologie classique et leur inoculation sont présentées et discutées.

INOCULATION AND BACTERIAL ANALYSES OF FRACTIONS OBTAINED FROM THE REFERENCE INOCULUM TEC4 WHICH EXPERIMENTALLY REPRODUCES EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY

Huybens N.^{*}, Houeix J.^{*}, Licois D.[†], Mainil J.[‡], Marlier D.^{*}

^{*} Clinic for Birds, Rodents and Rabbits, Dept. of Clinical Science, University of Liege,
20 boulevard de Colonster, 4000 LIÈGE, Belgium.

[†]Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health Research Unit, Bat 213, INRA, 37380 NOUZILLY, France.

[‡]Bacteriology, Dept. of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege,
20 boulevard de Colonster, 4000 LIÈGE, Belgium.

ABSTRACT: The aetiology of epizootic rabbit enteropathy (ERE) is still unknown despite ten years of continuous research. A putative bacterial aetiology is the basis of current research. The fractionation of the reference inoculum (TEC4) is a major step towards finding the potential bacterial agent(s). In this study, TEC4 was fractionated by different techniques: centrifugation on discontinuous sucrose gradient, cell adherence and chloroform/ethanol treatment. The different fractions were inoculated into SPF rabbits and analyzed with classical bacteriological techniques. ERE was reproduced with two of the six fractions obtained. Four species never previously cultured from TEC were identified in the process but, to date, none of them seems to be the aetiology of ERE.

Key Words: Epizootic rabbit enteropathy, bacteria, fractionation, adherence.

INTRODUCTION

Epizootic rabbit enteropathy (ERE) has been spreading throughout Europe since 1997 (Duval, 1998; Marlier and Vindevoegel, 1998). This digestive pathology induces several non specific clinical symptoms, including: decrease in food intake and water consumption, high mortality rate, and aqueous diarrhoea of limited extent. At necropsy, lesions are more typical. An overfull anterior digestive tract is consistently observed, including the stomach, with liquid and gas but without inflammation (Licois *et al.*, 2005). Many treatments have been used, but to date only two antibiotics with market approval in most countries in Europe, zinc bacitracine and tiamulin, seem able to stop the clinical symptoms. Unfortunately, the symptoms often return after the end of treatment (Maertens *et al.*, 2005). ERE costs producers approximately €10m yearly in Belgium and is a major cause of death in the European rabbit industry (Dewree *et al.*, 2003).

The first hypothesis on the aetiology of ERE involved food poisoning and has now been fully ruled out (Le Gall *et al.*, 1998; Lebas, 1998). Several studies have demonstrated that ERE is an infectious disease, since it can be reproduced by experimental inoculations (Licois, 1998; Licois and Coudert, 2001; Licois *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006). The French reference inoculum is called TEC (Licois and Coudert, 2001).

Correspondence: N. Huybens, nathalie.huybens@ulg.ac.be
Received December 2008 - Accepted May 2009

HUYBENS *et al.*

Several generations of TEC have been produced: TEC, TEC1, TEC2, TEC3 and TEC4. The last one (TEC4) is actually the French reference inoculum (Licois and Coudert, 2005). A putative viral aetiology was believed to exist because of the quick spread of ERE. No specific virus has been found to date (Licois and Coudert, 1999; Marlier *et al.*, 2003b; Licois *et al.*, 2005). At least 2 factors of different sizes are involved in ERE pathogenesis. The first one has a size below 0.4 μm and the second over 0.4 μm . There is strong evidence that these factors are respectively a toxin and a bacterium (Marlier *et al.*, 2003a; Coudert and Licois, 2004; Licois, 2007; Szalo *et al.*, 2007).

Despite all the studies that have been carried out, the putative bacterial species causing ERE is still unknown. Either this species is not cultivable on traditional media, or its *in vitro* growth is inhibited by certain factors, including other bacterial species present in TEC. As Szalo *et al.* (2007) have suggested, the aspecific bacterial flora of TEC4 needs to be reduced before further analyses.

This study followed the basic centrifugation method developed by Szalo *et al.* (2007) followed by another fractionation based on adherence of bacteria to cells in a culture, as adherence to host tissues is a crucial step in the pathogenesis of many bacteria (Niemann *et al.*, 2004). The bacterial composition and virulence of the new fractions produced were studied. They were then inoculated into rabbits and analysed with traditional bacteriology and bacterioscopy methods. The aim was to find a fraction still able to reproduce ERE but containing a limited amount of bacterial flora.

MATERIALS AND METHODS

Centrifugation on discontinuous sucrose gradient

TEC4 was first fractionated by the technique described by Szalo *et al.* (2007). Briefly, 1 mL of TEC4 was overlaid on 5 layers of 2 mL of each sucrose solution (10%, 20%, 30%, 40% and 50%) then centrifuged (1780 g, 4°C, 20 min). Seven fractions (supernatant, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and pellet) were collected and washed twice in 0.9% NaCl by centrifugation (20,000 g, 4°C, 3 min). Finally bacteria were resuspended in 0.5 mL NaCl 0.9%.

Adherence assay

Bacteria from the 50% centrifugation fraction were used for a second fractionation using rabbit kidney cells (RK13 cells). RK13 cells were grown in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 100,000 units/L penicillin, 100 mg/L streptomycin sulphate, 5 mL/L MEM (100 \times) non-essential amino acids (Invitrogen), 2.5 mg/L natamycin and 5% foetal bovine serum. Twenty-four hours before RK13 cell line inoculation, the culture medium of a tissue culture flask (75 cm²) at confluence was changed for growth medium without antibiotic. Twenty-four hours later, the culture medium was discarded and cells were inoculated with 1 mL of the 50% bacterial suspension. An RK13 cell-free culture flask was used as negative control. After 4 h at 37°C, culture and empty flasks were rinsed three times with sterile PBS to wash out non adherent bacteria. Cells and adherent bacteria were then recovered with a cell scraper and suspended in 1 mL of antibiotic free medium. These fractions were respectively named RK501 (RK13 cells) and PLA (RK13 cell-free flask) and stored at -20°C. The same fractionation plan was used in a second passage using RK501 adherent bacteria as inoculum. This fraction was named RK502 and stored at -20°C. The PBS used for the last wash before scrapping of RK502 fraction was kept, named RIN and stored at -20°C.

Chloroform/ethanol treatment

A solution of chloroform/ethanol (1/4 v/v) was used to reduce RK501 bacterial flora. One mL of RK501 was mixed with 2 mL of the CHCl₃/ethanol solution, kept one hour at room temperature under constant

Publications

FRACTION OBTAINED FROM THE REFERENCE INOCULUM TEC4 WHICH REPRODUCES ERE

stirring, washed by centrifugation (20,000g, 4°C, 3 min) and resuspended in 1 mL 0.9% NaCl. This fraction was named CERK and stored at -20°C.

All the fractionations were made under aerobic conditions for approximately 2 h for the centrifugation and the chloroform/ethanol treatment and 4 h for inoculations.

Inoculations

Three series of inoculations were carried out. Two hundred and twenty-six 4 w old SPF rabbits from the "Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale" (PFIE), INRA, Nouzilly, France (Licois *et al.*, 2005) were used. This husbandry is clinically negative for ERE.

In the first series, fifty-four rabbits were randomly allocated to 3 batches. After one week of acclimatization, batch one was inoculated per os with 100 µL/rabbit of the 50% sucrose gradient fraction, batch two with 100 µL/rabbit of RK501 and batch three with 100 µL/rabbit of SPF rabbit's caecal contents (negative control). Each rabbit was weighed at D-7, D-4, D0, D3, D6, D8, D10 and D13. The rabbits were observed daily for external signs of diarrhoea. Days of mortality were recorded.

In the second series seventy-six rabbits were randomly allocated to 4 batches. Eighteen rabbits were inoculated per os with 100 µL/rabbit of SPF rabbit's caecal contents (negative control), 21 with 200 µL/rabbit of RIN, 18 with 100 µL/rabbit of RK502 and 19 with 100 µL/rabbit of PLA. Each rabbit was weighed at D-7, D-4, D0, D1, D2, D3, D6 and D8. Clinical monitoring was the same as above.

The third series was performed on ninety-six rabbits randomly allocated to 5 batches. Nineteen rabbits were inoculated per os with 100 µL/rabbit of SPF rabbit's caecal contents (negative control), 19 with 200 µL/rabbit of RIN, 19 with 100 µL/rabbit of CERK, 20 with 100 µL/rabbit of 50% and 19 with 100 µL/rabbit of RK501. Each rabbit was weighed at D-7, D-4, D0, D3, D6, D10 and D13. Mortality and presence of diarrhoea were recorded each day. Clinical monitoring was the same as in series 1 and 2.

Morbidity and mortality of each batch were respectively calculated as follows: number of rabbits in the batch presenting a drop in average daily weight gain for several days over total number of rabbits in the batch and number of dead rabbits with ERE lesion over total number of rabbits in the batch.

Statistical analysis

For analysing ADWG, a mixed model (PROC MIXED of SAS, 2000) was used, according to a repeated measures design that takes into account the variation between animals and covariation within them. The model included the treatment, the day, and their interaction as fixed effects. Least square means calculated by the model were compared by a Student's t-test.

Bacteriology

TEC4, 50% and RK501 were analysed by classical bacteriological methods. Ten microlitres of each fraction were inoculated onto blood agar plates containing 5% sheep blood and onto Mc Conkey agar plates and incubated at 37°C aerobically and anaerobically for 24 to 48 h. Bacterial colonies were identified using standard procedure (Barrow and Feltham, 1993). Strains were further identified by RAPID ID 32 A, RAPID 20 E and API 20 STREP (BioMerieux) according to the manufacturer's instructions. All colonies present on the plates were counted and CFU/mL was calculated.

Bacterioscopy

Ten microlitres of TEC4, 50% and RK501 were smeared onto microscopic slides, fixed and submitted to Gram staining (Szalo *et al.*, 2007). Smears were observed at a 1000× magnification and 3 pictures were taken randomly for each fraction. The observed bacteria were counted and classified according to their

HUYBENS *et al.*

shape and colorimetric properties in spores, small size Gram-positive bacilli, small size Gram-negative bacilli, medium size Gram-positive bacilli, medium size Gram-negative bacilli, large size Gram-positive bacilli, large size Gram negative bacilli, Gram-positive cocci and Gram-negative cocci.

RESULTS

RK501 and 50% inoculation

A significant drop in the average daily weight gain (ADWG) was observed (Figure 1) as soon as D3 in rabbits inoculated with RK501 ($P<0.01$) or 50% fraction ($P<0.01$). Seventeen rabbits out of 18 in both batches had a drop in their daily weight gain for several continuous days. Global morbidity rate was 94% for the two batches. Global mortality rates were 28% and 11% respectively for the batch inoculated with RK501 and 50% with first mortalities observed at D4 for both batches. At necropsy, typical ERE lesions were observed: dilated digestive tract, stomach included, with no inflammation process. The ADWG of the control group was as expected and no clinical symptoms were observed during the observation period.

RK502, RIN and PLA inoculation

A slight drop in ADWG was observed at D2 in all batches (Figure 2) except the negative control: RK502 ($P<0.05$), RIN ($P<0.05$) and PLA ($P<0.05$). All batches have an ADWG lower than the control batch: RK502 ($P<0.01$), RIN ($P<0.05$) and PLA ($P<0.001$). Two rabbits died during the observation period: one from the RK502 batch with typical ERE lesions and one from PLA batch without any typical lesion. None of the fifty-eight inoculated rabbits showed a continuous drop of ADWG for several days. The ADWG of the control group was as expected and no clinical symptom was observed during the observation period.

RK501, 50% sucrose, CERK and RIN inoculation

The significant drop of ADWG can be seen at D3 (Figure 3) in groups inoculated with the 50% sucrose ($P<0.01$) or RK501 ($P<0.01$) fractions. No drop was observed in rabbits inoculated with CERK or RIN. Overall mortality and morbidity rates were respectively 0% and 0% in the RIN and the CERK batch, 16% and 37% in the RK501 batch and 10% and 40% in the 50% fraction batch. All dead animals showed typical ERE lesions. ADWG of the control group was as expected and no clinical symptoms were observed during the observation period.

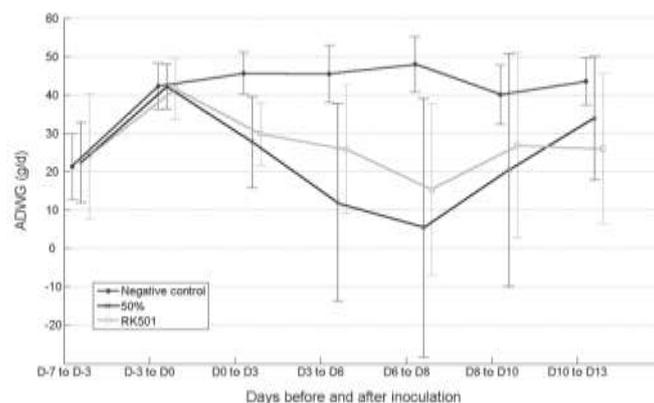


Figure 1: Comparison and evolution of average daily weight gain (ADWG) between the negative control batch and the two batches inoculated with the 50% sucrose and RK501 fractions (fractions as Table 2).

FRACTION OBTAINED FROM THE REFERENCE INOCULUM TEC4 WHICH REPRODUCES ERE

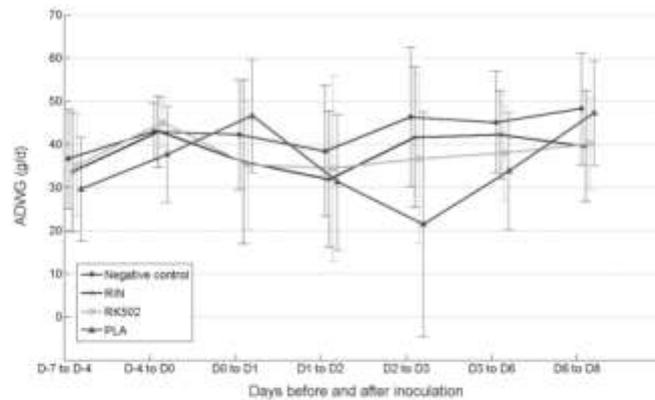


Figure 2: Comparison and evolution of average daily weight gain (ADWG) between the negative control batch and the three batches inoculated with the RIN, PLA and RK502 fractions (fractions as Table 2).

Bacteriology

All identified species and average CFU from virulent fractions are presented in Table 1. Average CFU of the virulent fractions showed a 10^2 decrease in CFU. Among the 9 species identified in TEC4, eight were also found in the 50% sucrose fraction. Of the 13 species detected in the 50% sucrose fraction, only 4 were also isolated from the RK501 fraction. Two other species were detected in the RK501 fraction but not in the 50% sucrose fraction or TEC4.

Bacterioscopy

Results of the bacterioscopic examinations are presented in Figure 4. A slight selection was observed through the first fractionation. Gram negative bacteria were absent in the RK501 fraction. Table 2 sums up the different characteristics of TEC4 and its fractions.

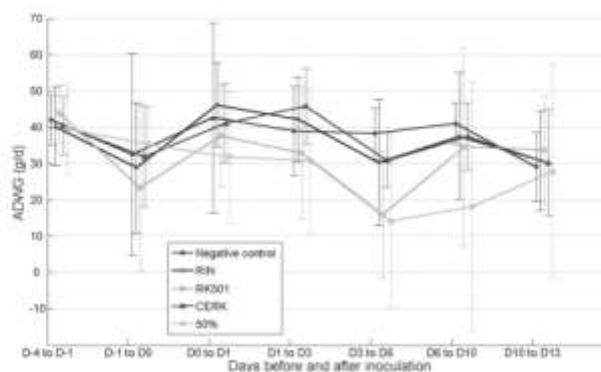


Figure 3: Comparison and evolution of average daily weight gain (ADWG) between the negative control batch and the four batches inoculated with the RIN, CERK, RK501 and 50% fractions (fractions as Table 2).

HUYBENS *et al.*

Table 1: Average CFU and bacterial species isolated from the TEC4, 50% sucrose and RK501 fractions plated in traditional culture media.

Fractions	TEC4	50% sucrose	RK501
CFU/mL	1,05.107	2,6.106	6,5.105
Species	Clostridium barati	Clostridium histolyticum Clostridium sporogenes Clostridium acetobutylicum Clostridium tyrobutyricum Mannheimia haemolytica	Sphingobacterium spiritivorum Gemella morbillorum
Species common to TEC4 and 50% sucrose fractions		Clostridium glycolicum Clostridium sordelli Bacillus sp Brevundimonas vesicularis	
Species common to TEC4, 50% sucrose and RK501 fractions		Enterococcus faecium Clostridium septicum Clostridium fallax Clostridium perfringens	

DISCUSSION

ERE is a major cause of loss in rabbit production but despite many research studies the aetiological agent is still unknown (Licois *et al.*, 2005; Xylouri and Fragkiadakis, 2006; Dewrée *et al.*, 2007). Parasites, fungi, toxics and viruses play no direct role in ERE according to previous studies (Lebas, 1998; Licois *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006). A potential bacterial aetiology is in agreement with the results of Szalo, *et al.* (2007) as well as the role of a putative toxin in the early phase of ERE (Marlier *et al.*, 2003b; Licois, 2007).

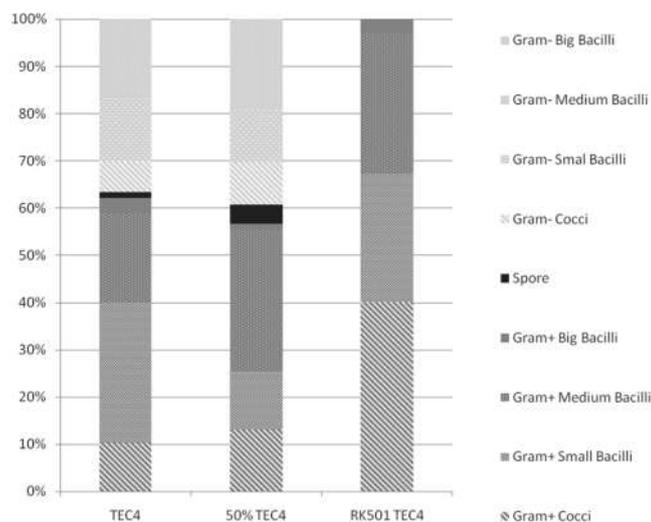


Figure 4 : Bacteria's repartition following stain and shape during the fractionation.

FRACTION OBTAINED FROM THE REFERENCE INOCULUM TEC4 WHICH REPRODUCES ERE

Table 2: Summary of the morbidity, mortality and bacterial flora obtained with the different treatments of the TEC4 inoculum.

Fraction	Making methods	Morbidity	Mortality	Flora diversity
50% sucrose	Centrifugation on discontinuous sucrose gradient	37 - 94%	16 - 28%	+++
RK501	First inoculation of the 50% fraction on RK13 cells	40% - 94%	10 - 11%	++
RK502	Second inoculation of the 50% fraction on RK13 cells	5,5%	5,5%	+
PLA	Inoculation of the 50% fraction on an empty flask	0%	0%	+
RIN	PBS used for the last wash before scrapping of RK502	0%	0%	+
CERK	Chloroform /ethanol treatment of the RK501 fraction	0%	0%	-

Fractionation of TEC seems necessary to identify the putative aetiological agent. As centrifugation of TEC3 on discontinuous sucrose gradient previously gave good results (Szalo *et al.*, 2007), the same technique was used on TEC4. The 50% sucrose fraction was used in the second fractionation because it contains few bacterial cells and the aetiological agent is still at a high concentration (Szalo *et al.*, 2007). Adherence to host cells being the first step in many bacterial pathologies (Niemann *et al.*, 2004), it was hypothesized that the aetiological agent is most probably able to adhere to rabbit intestinal epithelial cells. As immortal rabbit enterocytes are not available, rabbit kidney cells (RK13) were chosen to make a fractionation of 50% by cell adherence.

Inoculations were made without any trouble except for a slight drop in ADWG on the third inoculation between D-1 and DO in all batches. This may be due to a high temperature gap between night and day, normal at this time of the year. Successful ERE reproduction was only possible with two of the six fractions. The concentration of the putative responsible bacteria in the 50% sucrose and RK501 fractions were still high enough to reproduce a typical ERE. In the other four fractions (RK502, PLA, RIN and CERK) the agent is probably still present, since a slight drop of ADWG was noticed but the concentration is not high enough to allow reproduction of the typical clinical signs and/or lesions. Similar ADWG evolution is seen with inoculation of 10^{-4} dilution of TEC4 (Licois and Coudert, 2005). ADWG is the most important sign of ERE experimental reproduction in TEC inoculation (Licois *et al.*, 1998; Licois *et al.*, 2005). However, gross lesions are the second confirmation of the reproduction. All dead animals of the 50% sucrose and RK501 fractions inoculation batches showed typical ERE symptoms: anterior digestive tract dilation with no inflammation. Other negative controls created from caecal content of healthy rabbits treated in the same way as the fractions could have been used to rule out a potential dysbacteriosis effect. However, the ADWG drop and, above all, the typical gross ERE lesions cannot be the consequence of a simple dysbacteriosis only.

The ERE aetiological agent is probably not cultivable on a conventional medium or inhibited by other microorganisms (Szalo *et al.*, 2007). The aim of the fractionations is to reduce the bacterial flora. Conventional bacterial analyses were essentially made to evaluate fractionation efficacy. The bacterial flora of the three virulent fractions (TEC4, 50% sucrose and RK501 fractions) are very different both quantitatively and qualitatively. The total bacterial concentration (CFU/mL) and the number of bacterial species are successfully reduced. Surprisingly fewer species are identified in TEC4 compared to those of the 50% fraction. However, this can be explained by the high concentration of *Clostridium glycolycum*, which inhibits other species' growth. The number of cultivable bacterial species is lowest in the RK501 fraction. Only 4 of the 14 species found in TEC4 and 50% sucrose fractions are still present. Conversely, the limited bacterial flora of the RK501 fraction allows the detection of two other species undetected in the other fractions.

HUYBENS *et al.*

The bacterial flora of TEC has been determined in several studies (Licois *et al.*, 2003; Licois *et al.*, 2005; Marlier *et al.*, 2006; Szalo *et al.*, 2007). Four species that had not been detected in TEC to date were grown in common bacteriological culture from TEC4 and its new fractions: *Mannheimia haemolytica*, *Brevundimonas vesicularis*, *Sphingobacterium spiritivorum* and *Gemella morbillorum*. The first is a primary pathogen, causing pneumonia, mammitis and septicaemia in ruminants (Euzéby, 1998). Nevertheless, the identification percentage of the commercial gallery was poor (75.4 %) and this bacterium could also be any non pathogen Pasteurella like species. The other three new species are environmental bacteria and can be responsible for nosocomial infections (La Scola and Raoult, 1998; Hiar *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006). Still, it seems unlikely that these species are the ERE aetiology, until proved otherwise.

In the bacterioscopic analyses, an increase in the spore concentration is observed confirming previous results (Szalo *et al.*, 2007), even if the total amount of spores in TEC4 seems lower than in TEC3. On the other hand, a selection of bacilli was not observed in the 50% fraction. The lack of Gram negative bacteria from RK501 is surprising. The remains of the staining of the RK13 cells could mask the Gram negative bacteria, coloured in the same tone, although even if the Gram negative bacteria are not completely removed by the fractionation they would be present in very small quantities.

CONCLUSIONS

Although the aetiological agent was not identified, new information was obtained by these fractionations: the 50% sucrose fraction reproduced the pathology, confirming a potential bacterial ERE aetiology, probably a Gram positive bacterial species. New species were also cultured from the reference TEC4 inoculum. These new virulent fractions should be analysed by molecular biology techniques to avoid the limiting culture step.

Acknowledgments: This work was supported by a Grant from the «Service Public Fédéral Santé Publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement: Division Recherche contractuelle», contract RT 06/7 MINRABBIT. N. Huybens is a PhD fellow of the “Fonds pour la formation à la Recherche dans l’Industrie et dans l’Agriculture” (F.R.I.A.).

REFERENCES

- Barrow G.L., Feltham R.K.A. 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Barrow, G.L., Feltham, R.K.A. (ed), Cambridge University Press, USA.
- Coudert P., Licois D. 2004. Study of early phenomena during experimental epizootic rabbit enteropathy: preliminary results. *In Proc.: 8th World Rabbit Congress, 7-10 September, 2004, Puebla, Mexico*, 520-523.
- Dewree R., Licois D., Coudert P., Lussence C., Vindevogel H., Marlier D. 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL): étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. *In Proc.: 10th Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 19-20 Nov.*, 231-254.
- Dewrée R., Meulemans L., Lussence C., Desmecht D., Ducatelle R., Mast J., Licois D., Vindevogel H., Marlier D. 2007. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Sci.*, 15: 91-102.
- Duval M.L. 1998. Développement de l'entérocolite en France. *In Proc.: 7th Journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 13-14 May*, 1-8.
- Euzéby J.P. 1998. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Available at: <http://www.bacterio.ucl.fr>. Accessed September 2008.
- Hiar L., Gentric A., Tande D., Kochowski S., Garre M. 2002. Bactériémie à *Sphingobacterium spiritivorum*. *Méd. Mal. Infect.*, 32: 200-201.
- La Scola B., Raoult D. 1998. Molecular Identification of *Gemella* Species from Three Patients with Endocarditis. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 866-871.
- Le Gall J.P., Picault J.P., Allée C., Le Bihannic P., Colin P. 1998. Essais de reproduction expérimentale de l'entérite épizootique du lapin (E.E.L.). *In Proc.: 7th Journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 13-14 May*, 13-19.
- Lebas F. 1998. Entérocolite épizootique et alimentation du lapin. *In Proc.: 7th Journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 13-14 May*, 9-12.
- Licois D. 1998. Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'entérocolite épizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie. *In Proc.: 7th Journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 13-14 May*, 20-25.
- Licois D. 2007. Etude in vivo de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4, inoculum utilisé pour la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin. *In Proc.: 12th Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 27-28 Nov.*, 217-220.
- Licois D., Coudert P. 1999. Le point de recherche sur l'entérocolite épizootique du lapin. *In Proc.: 8th Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 9-10 June*, 33-36.
- Licois D., Coudert P. 2001. Entéropathie Epizootique du Lapin: reproduction expérimentale, symptômes et lésions observées. *In Proc.: 9th Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 28-29 Nov.*, 139-144.

FRACTION OBTAINED FROM THE REFERENCE INOCULUM TEC4 WHICH REPRODUCES ERE

- Licois D., Coudert P. 2005. Entéropathie épidémiologique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4: effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps. *In Proc.: 11^{ème} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 29-30 Nov.*, 265-268.
- Licois D., Vautherot J.F., Coudert P., Dambrine G. 1998. Experimental reproduction of epizootic enterocolitis in SPF rabbits. *World Rabbit Sci.*, 6: 349-353.
- Licois D., Dewree R., Coudert P., Vindevoel H., Marlier D. 2003. Essai de reproduction expérimentale de l'entéropathie épidémiologique du lapin (EEL) avec des inoculums originaires de Belgique et des Pays-Bas et avec des souches bactériennes isolées de ces inoculums ainsi que de TEC2 et TEC3 (inoculums INRA). *In Proc.: 10^{ème} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 19-20 Nov.*, 255-258.
- Licois D., Wyers M., Coudert P. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36: 601-613.
- Maertens L., Cornez B., Vereecken M., Oye S.v. 2005. Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S[®]) in a chronically infected Epizootic Rabbit Enteropathy environment. *World Rabbit Sci.*, 13: 165-178.
- Marlier D., Vindevoel H. 1998. L'entérocite épidémiologique du lapin. *Ann. Méd. Vét.*, 142: 281-284.
- Marlier D., Dewree R., Delleur V., Licois D., Lassece C., Poulipoulis A., Vindevoel H. 2003a. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. *Ann. Méd. Vét.*, 147: 385-392.
- Marlier D., Dewree R., Licois D., Coudert P., Lassece C., Poulipoulis A., Vindevoel H. 2003b. L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL): un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. *In Proc.: 10^{ème} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 19-20 Nov.*, 247-250.
- Marlier D., Dewree R., Lassece C., Licois D., Maimil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R., Vindevoel H. 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet. J.*, 172: 493-500.
- Niemann H.H., Schubert W.D., Heinz D.W. 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect.*, 6: 101-112.
- Szalo I.M., Lassece C., Licois D., Coudert P., Poulipoulis A., Vindevoel H., Marlier D. 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J.*, 173: 652-657.
- Xylouri E., Fragkiadakis M. 2006. Epizootic rabbit enteropathy - current data and control. *J. Hellenic Vet. Med. Soc.*, 57: 302-314.
- Yang M.-L., Chen Y.-H., Chen T.-C., Lin W.-R., Lin C.-Y., Lu P.-L. 2006. Case report: Infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC Infect. Dis.*, 6: 179.

2. ARTICLE : "EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY INOCULUM (TEC4) : ANTIBIOGRAMS AND ANTIBIOTIC FRACTIONATION."

Un article a été publié au Veterinary Research Communications. Les antibiogrammes réalisés sur le TEC4, le fractionnement par traitement aux antibiotiques ainsi que l'inoculation réalisée avec les trois fractions sélectionnées y sont présentés et discutés.

Epizootic rabbit enteropathy inoculum (TEC4): antibiograms and antibiotic fractionation

Nathalie Huybens · Julien Houeix · Dominique Licois ·
Jacques Mainil · Didier Marlier

Accepted: 17 October 2010 / Published online: 27 October 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Epizootic rabbit enteropathy (ERE) emerged and spread in Europe within the last 13 years causing major economical loss. The aims of the study was to evaluate antibiograms of TEC4, an inoculum composed of an extract of intestinal content of affected rabbits, and to test the potential of different antibiotic-based TEC4 fractions to reproduce the disease. Twenty nine different antibiotic discs were incubated for determining bacteria resistance. In a complementary study, nine tubes of liquid medium were inoculated with TEC4, incubated and added individually with amoxicillin/clavulanic acid, bacitracin, ceftiofur, doxycycline, novobiocin, streptomycin, tylosin, vancomycin and 0.9% saline solution as control. The content of each tube was washed by centrifugation and suspended in saline. The three most effective antibiotics are florfenicol, amoxicillin/clavulanic acid and tylosin. A high concentration of *Clostridium sordelli* and *Bacillus firmus* were isolated in all fractions. Species never cultured from TEC4 were identified as *Fusobacterium necrogenes* (in vancomycin fraction), *Cellulomonas* sp (in novobiocin fraction) and *Bacteroides distasonis* (in doxycycline fraction). The ERE was reproduced when bacitracin, doxycycline and 0.9% fractions were inoculated. Rabbits showed ERE clinical signs with the specific drop in daily weight gain.

Keywords Bacteriology · Antibiotic · Inoculation · Disease reproduction · ERE

N. Huybens (✉) · J. Houeix · D. Marlier
Department of Clinical Science, University of Liege, 20 boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium
e-mail: nhuybens@doct.ulg.ac.be

D. Licois
Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health Research Unit 1282, Bat 213, INRA, 37380
Nouzilly, France

J. Mainil
Department of Infectious and Parasitic Diseases, University of Liege, 20 boulevard de Colonster, 4000
Liège, Belgium

Introduction

Epizootic rabbit enteropathy (ERE) is a digestive pathology that has spread through Europe since 1997 (Duval 1998; Marlier and Vindevogel 1998). Observed clinical signs are a drop in food and water consumption with resulting mortality and sometimes limited aqueous diarrhoea. Gross lesions at necropsy are characteristic when supervening bacterial infections are lacking. Rabbits show an overfull anterior digestive tract including the stomach without an obvious inflammation process (Licois et al. 2005). In field conditions, only bacitracin and tiamulin seem to be effective to control clinical cases (Maertens et al. 2005).

The ERE clinical signs can be reproduced successfully but some difficulties are encountered for attaining reproducible results mainly because samples used for research purposes and in the field are frequently contaminated by opportunistic pathogens (Licois et al. 2005; Marlier et al. 2006). Efforts to reduce variability have led to the use of different generation inoculums (TEC, TEC2, TEC3 and TEC4) from virulent intestinal content of ERE diseased rabbits without the presence of opportunistic pathogens (Licois and Coudert 2005; Licois et al. 2005). In order to decrease the number of putative agents, fractionation of TEC4 was made by centrifugation on a discontinuous sucrose gradient and cell adhesion (Szalo et al. 2007; Huybens et al. 2009). These techniques successfully sorted the bacterial species in the fractions but did not lead to the isolation of the agent responsible for ERE (Huybens et al. 2009). The aims of the present study were to evaluate the antibiotic sensitivity of cultivable bacterial species from TEC4 and to find an antibiotic-based fractionation method.

Material and methods

Inocula

The TEC4, inoculum of reference used in the present study was obtained from intestinal content from ERE diseased rabbits. The inoculum were kindly supplied by D. Licois, Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health Research of INRA, Nouzilly, France.

Antibiograms

The antibiotic susceptibility profile of bacteria cultured from TEC4 was determined according to agar dilution method (Bauer et al. 1966). Ten μ l of TEC4 inoculum was diluted 100 folds, plated on Colombia 5% Sheep blood agar (BIORAD, Belgium) and incubated in aerobic and anaerobic conditions at 37°C for 24 h. Twenty nine different antibiotic discs were used. The antimicrobial agents (and concentration) were: amikacin (30 μ g), amoxicillin/clavunalic acid (30 μ g), ampicillin (10 μ g), bacitracin (10UI), cefquinome (10 μ g), ceftiofur (30 μ g), cefuroxime (30 μ g), cephalothin (30 μ g), chloramphenicol (30 μ g), clindamycin (2UI), colistin (50 μ g), doxycycline (30 μ g), enrofloxacin (5 μ g), erythromycin (15UI), florfenicol (30 μ g), gentamicin (10 μ g), kanamycin (30UI), lincomycin (5 μ g), marbofloxacin (5 μ g), nalidixic acid (30 μ g), neomycin (30 μ g), novobiocin (30 μ g), penicillin (10 μ g), spiramycin (100 μ g), streptomycin (10 μ g), tetracycline (30 μ g), trimetoprim/sulhponamides (25 μ g), tylosin (30 μ g) and vancomycin (30 μ g).

Fractionation

Nine tubes of 10 ml of Schaedler broth (BIORAD, Belgium) with horse serum (INVITROGEN, Belgium) (50 mL/L) were inoculated with 10 mL of TEC4 and pre-incubated for 3 h at 37°C. The antimicrobials added to each tube and the concentrations were as follows: amoxicillin/clavulanic acid, 3–5 µg/ml; bacitracin, 3 µg/ml; ceftiofur, 3 µg/ml; doxycycline, 2 µg/ml; novobiocin, 2 µg/ml; streptomycin, 9 µg/ml; tylosin, 2 µg/ml; vancomycin, 5 µg/ml and sterile 0.9% saline solution as a negative control. The nine tubes were incubated for 24 h at 37°C. Bacteria were harvested and washed three times with NaCl 0.9% by centrifugation (20 000 g) for 3 min at 4°C and finally suspended in 10 mL of 0.9% saline.

Bacteriology and bacterioscopic analysis of the fractions

The bacterial examinations were performed on TEC4 fractions. Ten µl of each fraction was inoculated onto 5% Sheep blood agar plates (BIORAD, Belgium) in aerobic and anaerobic conditions and onto MacConkey agar plates (BIORAD, Belgium) in aerobic conditions. Plates were incubated at 37°C for 24 h. Each morphological different colony was identified according to standard procedure (Barrow and Feltham 1993). Biochemical identifications were performed using different commercial kits (API 20 E, API 20 NE, API Strep, API 50 CHB, Rapid ID 32 A (BIOMERIEUX, Belgium)). The API test galleries were prepared according to API manual's protocol.

Bacterioscopic analyses were performed on the new antibiotic treated fractions (amoxicillin/clavulanic acid, bacitracin, ceftiofur, doxycycline, novobiocin, streptomycin, tylosin, vancomycin and saline) as described previously (Szalo et al. 2007). Briefly, ten microlitres of each new fraction were smeared onto microscopic slides, fixed and submitted to Gram staining. Smears were observed at a 1,000× magnification and 3 pictures were taken randomly for each fraction. The observed bacteria were counted and classified in: spore, Gram positive coccus, Gram positive bacillus, Gram negative coccus and Gram negative bacillus.

Inoculation

Thirty New Zealand White weanling rabbits aged 6 weeks were randomly assigned to one of three treatments: inoculation of doxycycline fraction; inoculation of bacitracin fraction and inoculation of 0.9% saline fraction or control. All rabbits were inoculated per os with 100 µl of the fractions used. Animals were split in cages of 2 rabbits and kept under optimal environmental conditions in the rabbit Unit of the University of Liège facilities in accordance to 373 Animal Care Community Regulations. Four additional rabbits were used as an inoculation negative control group and kept in a separate room. Animals were weighed daily from day 7 before inoculation to day 21 post inoculation. Their Average Daily Weight Gain (ADWG) was calculated. Mortality was recorded daily.

Statistical analysis

The morbidity rate of a batch is the number of rabbits that had an ADWG inferior to 20 g 3 days consecutively divided by the total number of rabbit in the batch. For analyzing ADWG evolution, a mixed model (PROC MIXED of SAS 2006) was used, according to a repeated measures design that takes into account the variation between animals and

covariation within them. The model included the treatment, the day, and their interaction as fixed effects. Least square means calculated by the model were compared by a Student's *t*-test.

Results

The results of the inhibition diameter for the 29 antibiotics tested are shown in Table 1. Among all antibiotics tested, florfenicol, amoxicillin/clavulanic acid and tylosin were more effective with inhibition diameters values of 30, 27 and 30, respectively.

Table 1 Inhibition diameter of all bacterial culture from TEC4 in Columbia Sheep blood agar in aerobic and anaerobic condition

	Inhibition diameter	
	aerobiosis	anaerobiosis
Amikacin	6	6
Amoxicillin/clavulanic acid	22	27
Ampicillin	25	22
Bacitracin	8	14
Cefquinome	20	8
Ceftiofur	14	6
Cefuroxime	6	6
Cephalothin	19	20
Chloramphenicol	26	20
Clindamycin	6	14
Colistin	6	6
Doxycycline	22	8
Enrofloxacin	6	30
Erythromycin	6	14
Florfenicol	30	30
Gentamicin	6	14
Kanamycin	6	15
Lincomycin	6	10
Marbofloxacin	18	30
Nalidixic acid	6	6
Neomycin	6	12
Novobiocin	15	14
Penicillin	20	14
Spiramycin	6	19
Streptomycin	6	21
Tetracyclin	17	10
Trimetoprim/sulphonamides	6	6
Tylosin	31	30
Vancomycin	17	26

Bacterial isolates from the nine antibiotic fractions are presented in Table 2. Three species never isolated from TEC4 were cultured and identify from some new fraction: *Fusobacterium necrogenes* in vancomycin fraction, *Cellulomonas* sp in novobiocin fraction and *Bacteroides distasonis* in doxycycline fraction. A high concentration of *Clostridium sordelli* and *Bacillus firmus* were isolated in all nine antibiotic fractions.

The bacterioscopic profiles of the nine antibiotic fractions and TEC4 are presented in Fig. 1.

The morbidity and mortality rates were 90% and 20% (bacitracine batch), 100% and 20% (doxycycline batch) and 80% and 30% (NaCl 0.9% batch) respectively. The evolution of daily weight gains in relation to treatment is shown in Fig. 2. The average daily weight gain (ADWG) of the three inoculated batches dropped at D2 ($p < 0.001$). Digestive tracts of the dead rabbits were dilated without any sign of inflammation. No lesion or significative drop of the ADWG was shown in the negative control batch.

Discussion

The aetiological agent of epizootic rabbit enteropathy (ERE) causative of the disease has not been defined but it is suggested that one or more bacterial species are responsible (Licois et al. 2005; Marlier et al. 2006). Some toxins maybe implicated in the pathogenesis (Licois et al. 2006; Szalo et al. 2007). The fractionation of reference inoculums contributes to the knowledge of bacterial flora profiles (Szalo et al. 2007; Huybens et al. 2009).

The results in the present study showed that the fractioning of TEC4 treated with several antimicrobials reduces the non significative bacteria flora while keeping the virulent species alive and constitute a reliable method for reproducing ERE in rabbits.

The usual bacterial species associated with TEC4 are *Enterococcus faecium*, *Bacillus* spp and *Clostridium* spp (Huybens et al. 2009) and were recovered after antibiotic treatment except the tylosin fraction where *Clostridium* sp was lacking. A high concentration of *Clostridium sordelli* and *Bacillus firmus* were isolated in all tested fraction which could be explained by the better growth of these species in the Schaedler broth during the 27 h of the fractionation. They do not seem sensible to any antibiotic used except the tylosin for *Clostridium sordelli*. These two species have already been cultured from TEC3 and inoculated to rabbit without any reproduction of ERE (Marlier et al. 2006).

Three species never cultured from any ERE inoculums were cultured in antibiotic treated fractions: *Fusobacterium necrogenes*, *Cellulomonas* sp and *Bacteroides distasonis*. These potential virulent bacterial species might be implicated in the pathogenesis of the disease. *Fusobacterium necrogenes* is part of human, cattle and pig digestive flora (Terada et al. 1976; Rolfe et al. 1977; Wada 1978) but has been reported as an opportunistic pathogen (Fukuyama et al. 1984). *Cellulomonas* sp is a soil bacterium but has been found in silkworm gut and compost of cattle origin (Hemmat and Emtiazi 2000; Yoon et al. 2008). It has been incriminated recently in endocarditis in humans (Lai et al. 2009). The traditional digestive flora of rabbits contains *Bacteroides distasonis* (Pacini et al. 1989). These three bacterial species do not appear to be linked to ERE. Indeed, the lack of toxin production for *Cellulomonas* sp and the opportunistic pathogenicity of *Fusobacterium necrogenes* do not obviously sustain an aetiological link with ERE.

According to bacterioscopic analyses, gram-positive bacteria (especially cocci) are higher in all antibiotic fractions, which could be explained by the better growth of these species in the Schaedler broth during the 27 h of the fractionation. Antibiotic does not seem

Table 2 Bacterial species isolated from the antibiotic treated fractions plated in traditional culture media

Species	Amoxicillin/Clavulanic acid	Bacitracin	Ceftiofur	Doxycycline	Novobiocin	Streptomycin	Tylosin	Vancomycin	0.9% saline
<i>Enterococcus faecium</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Bacillus</i> sp	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Bacillus circulans</i>					✓				
<i>Bacillus licheniformis</i>					✓				
<i>Bacillus firmus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Clostridium baratii</i>		✓		✓		✓			✓
<i>Clostridium butyricum</i>		✓		✓		✓			✓
<i>Clostridium clostridiforme</i>			✓		✓			✓	
<i>Clostridium fallax</i>	✓								
<i>Clostridium glycolicum</i>								✓	
<i>Clostridium histolyticum</i>			✓						
<i>Clostridium paraputrificum</i>						✓			
<i>Clostridium perfringens</i>	✓			✓					
<i>Clostridium sordelli</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
<i>Bacteroides distasonis</i>				✓					
<i>Cellulomonas</i> spp									
<i>Fusobacterium necrogenes</i>								✓	

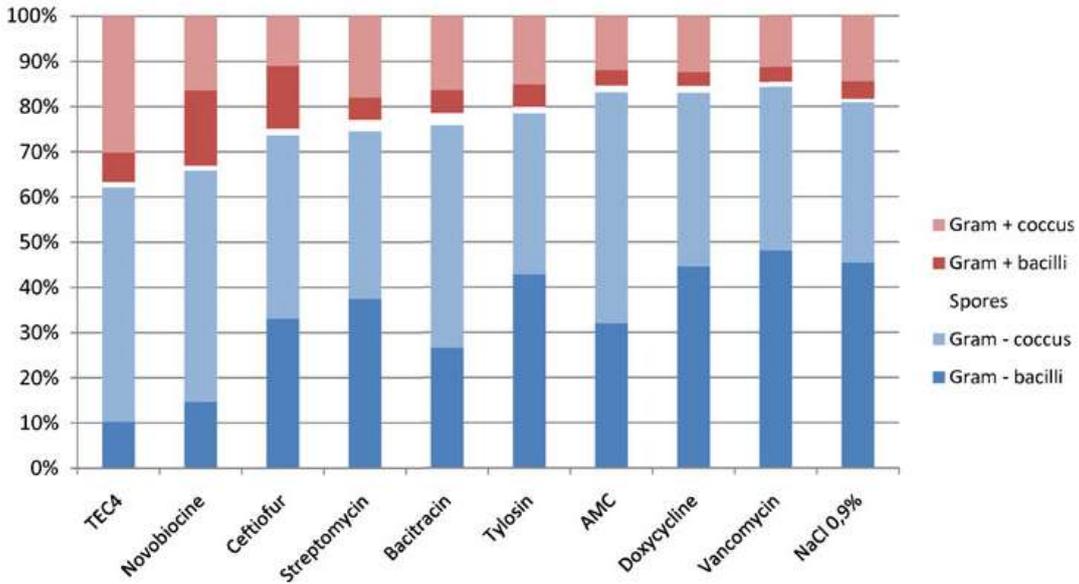


Fig. 1 Bacterioscopy profile after TEC4 inoculum antibiotic-based fractionation

to be effective in these conditions. Indeed, in the vancomycin-treated fraction, strains of *Enterococcus faecium* are persistent whereas they are sensitive in the diffusion method (data not shown).

For handling reasons, only three fractions were inoculated: the doxycycline for its lower CFU, the bacitracine for its property of controlling ERE in farms and NaCl as a control for the fractionation technique. The reproduction of ERE was obtained with the three selected fractions as shown by the morbidity and mortality rate and the specific drop of ADWG (Licois et al. 2005). It is important to underline that the bacitracine, which is the best antibiotic in the field to control ERE (Maertens et al. 2005), does not suppress the virulence of the inoculum.

In conclusion, the antibiotic treatments changes the bacterial flora allowing new species to be identified while maintaining the aetiological agent in the inoculum fractions.

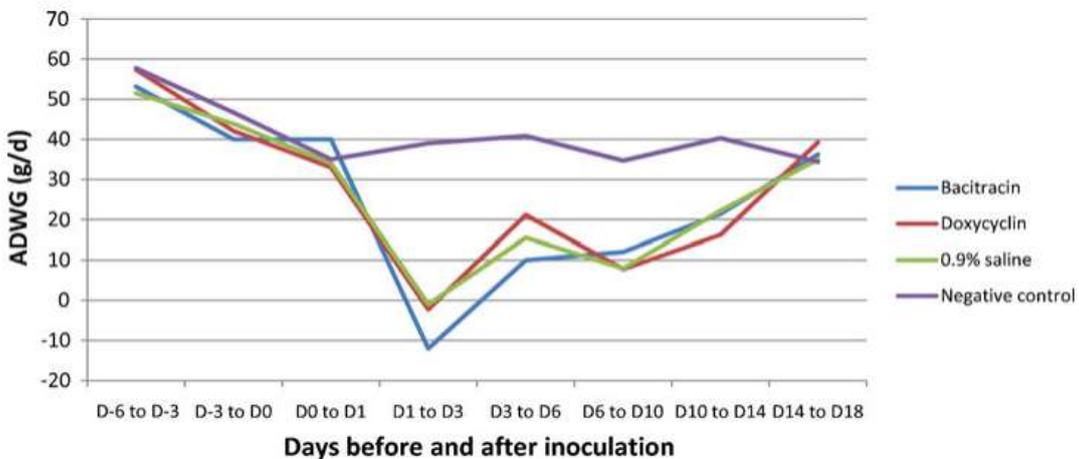


Fig. 2 Comparison and evolution of average daily weight gain (ADWG) between the negative control batch and the three batches inoculated

Acknowledgement This study was funded by the Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment (RT 06/7 MINRABBIT). N. Huybens is a PhD fellow of the 'Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture' (F.R.I.A.).

References

- Barrow GI, Feltham RKA (1993) Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Cambridge
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493–496
- Duval ML (1998) Développement de l'entérocologie en France. In: 7èmes journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocologie épizootique, Lyon, pp 1–8
- Fukuyama M, Kamimura T, Kishikawa S, Dogasaki C, Watanabe K, Watanabe S, Kuno K, Kaneda Y (1984) Bovine cerebral abscess associated with *Fusobacterium necrogenes* [necrophorus]: a case report. *B Azabu Univ Vet Med* 5:227–230
- Hemmat G, Emtiazi G (2000) Isolation of *Cellulomonas* sp. from silkworm (*Bombyx mori*) gut and evaluation of its endoglucanase activity. *Iran J Agr Sci* 31:255–260
- Huybens N, Houeix J, Licois D, Mainil J, Marlier D (2009) Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces the Epizootic Rabbit Enteropathy. *World Rabbit Sci* 17:185–193
- Lai PC, Chen YS, Lee SS (2009) Infective endocarditis and osteomyelitis caused by *Cellulomonas*: a case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65:184–187
- Licois D, Coudert P (2005) Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4: effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps. In: 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, pp 265–268
- Licois D, Wyers M, Coudert P (2005) Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet Res* 36:601–613
- Licois D, Coudert P, Marlier D (2006) Epizootic rabbit enteropathy. In: Maertens L, Coudert P (eds) Recent advances in rabbit sciences. ILVO, Melle, Belgium, pp 163–170
- Maertens L, Cornez B, Vereecken M, Van Oye S (2005) Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S(R)) in a chronically infected Epizootic Rabbit Enteropathy environment. *World Rabbit Sci* 13:165–178
- Marlier D, Vindevogel H (1998) L'entérocologie épizootique du lapin. *Ann Méd Vét* 142:281–284
- Marlier D, Dewree R, Lassence C, Licois D, Mainil J, Coudert P, Meulemans L, Ducatelle R, Vindevogel H (2006) Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet J* 172:493–500
- Pacini N, Ferrari A, Zanchi R, Corti M, Greppi GF (1989) The effects of protein dietary sources on serum cholesterol and bile acid microbiological transformations in rabbits. *Nutr Rep Int* 39:851–859
- Rolfe RD, Hentges DJ, Barrett JT, Campbell BJ (1977) Oxygen tolerance of human intestinal anaerobes. *Am J Clin Nutr* 30:1762–1769
- SAS (2006) Statistical Analysis Systems user's guide, Release 9.1. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA
- Szalo IM, Lassence C, Licois D, Coudert P, Poulipoulis A, Vindevogel H, Marlier D (2007) Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet J* 173:652–657
- Terada A, Uchida K, Mitsuoka T (1976) The Bacteroidaceae flora in the faeces of pigs. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Erste Abteilung, Originale* 234A, 362–370
- Wada E (1978) Studies on *Fusobacterium* species in the rumen of cattle. I. Isolation of genus *Fusobacterium* from rumen juice of cattle. *Jpn J Vet Sci* 40:435–439
- Yoon MH, Ten LN, Im WT, Lee ST (2008) *Cellulomonas chitinolytica* sp. nov., a chitinolytic bacterium isolated from cattle-farm compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1878–1884

Publications

3. CONFÉRENCE INTERNATIONNALE : “IS EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY (ERE) A BACTERIAL DISEASE?”

Une conférence a présenté au World Rabbit Congress les résultats obtenus grâce aux profils de RFLP et DGGE.

IS EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY (ERE) A BACTERIAL DISEASE?

Huybens N.^{1*}, Houeix J.¹, Szalo M.¹, Licois D.², Mainil J.³, Marlier D.¹

¹Department of Clinical Science, University of Liege, 20 boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium

²Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health Research Unit, Bat 213, INRA, 37380 Nouzilly, France

³Department of infectious and parasitic diseases, University of Liege, 20 boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium

*Corresponding author: nathalie.huybens@ulg.ac.be

ABSTRACT

The etiology of epizootic rabbit enteropathy (ERE) is still unknown despite ten years of continuous research. A putative bacterial etiology is at the basis of current research. The fractionation of the reference inoculum (TEC4) is a major step to find the potential bacterial agent(s). In this study, TEC4 was fractionated with two techniques: centrifugation on discontinuous sucrose gradient then cell adhesion. Two selected fractions were inoculated to SPF rabbits and analyzed with classical bacteriological techniques. ERE was reproduced with both fractions. The 16S rDNA gene was amplified in all fractions and in three negative controls and subsequently analyzed with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). A difference in bacterial DNA composition was found between virulent and non-virulent fractions which reinforce the potential role of bacteria in the etiology of ERE.

Keywords: ERE, Fractionation, Bacteria, DGGE, RFLP.

INTRODUCTION

Epizootic rabbit enteropathy (ERE) is a digestive syndrome that has spread throughout Europe since 1997 (Duval, 1998; Marlier and Vindevoel, 1998). This pathology induces a decrease in food and water intake with a high mortality rate. Other clinical signs sometimes observed are: aqueous diarrhea, caecal impaction, rambling noise, etc. Typical lesions observed at necropsy are overfull anterior digestive tract, stomach included, without inflammation process (Licois *et al.*, 2005). Bacitracine and tiamuline are the only known effective treatment. Unfortunately, mortality may start again by the end of the treatment (Maertens *et al.*, 2005). ERE is the first cause of mortality in European rabbit industry and cost approximately ten millions of euros yearly in Belgium (Dewree *et al.*, 2003).

Although it is commonly accepted that ERE is an infectious disease, the etiological agent is still unidentified today (Licois, 1998; Licois *et al.*, 2000; Marlier *et al.*, 2006; Szalo *et al.*, 2007). An inoculum (TEC) made from digestive contents of ERE dead rabbits systematically reproduces the pathology (Licois and Coudert, 2003), first generation of TEC was TEC1 and last is TEC4. Szalo *et al.* (2007) fractionated TEC3 with a centrifugation on discontinued gradient sucrose. The inoculation on SPF rabbit showed that 30% fraction and pellet reproduce the pathology whereas supernatant does not reproduce (Szalo *et al.*, 2007). The aims of this study are fractionate TEC4 (Licois and Coudert, 2005) and analyzing its bacterial flora to prove that the etiological agent is one or several bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum and culture cells

TEC4 was first fractionated by the technique described by Szalo *et al.* (2007). The 50% fraction of the centrifugation (50%) was then used for a second fractionation using rabbit kidney cells (RK13 cells).

Twenty-four hours before cell inoculation, the culture medium of a confluent box of 75 cm² was changed for a medium without antibiotic. Twenty-four hours later, the culture medium was discarded and 1 ml of 50% fraction was added on the cells. After 4 h at 37°C, culture was rinsed three times with sterile PBS to wash out non adherent bacteria. Cells and adherent bacteria were then scraped with a cell scraper then suspended in 1 ml of antibiotic free medium. This inoculum was named RK501 and stored at -20°C.

Reproduction of the disease

Fifty-four 4-weeks old rabbits were randomly allocated to 3 batches with each batch split in 6 cages of 3 rabbits. After one week of acclimatization, batch one was inoculated *per os* with 100 µl/rabbit of 50%, batch two with 100 µl/rabbit of RK501 and batch three with 100 µl/rabbit of SPF rabbit's caecal content (negative control). Each rabbit was weighted at D-7, D-4, D0, D3, D6, D8, D10 and D13. Mortality and presence of diarrhea were written down each day.

Statistical analyses were performed with SAS (Statistical Analysis System, 2000). Linear model with Repeated Measures was used with as effects treatment, day and interaction between both.

Bacteriological analyses

Ten µl of each fraction were inoculated onto agar plates and incubated for 24 h at 37°C, aerobically on 5% sheep blood agar and anaerobically (80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂) on 5% sheep blood agar and Schaedler agar. Individual colonies were identified using standard procedure and commercial galleries (API Strep, Rapid ID 32A and Api 20 NE from BIOMERIEUX).

Bacterioscopic analyses

The bacterioscopic analyses were performed as described in Szalo *et al.* (2007).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Total DNA was extracted from TEC3, TEC4, the seven sucrose fractions, RK501 and caecal contents of 3 healthy rabbits (TEM1, TEM2, TEM3) with QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) following manufacturer instructions. The 16S rDNA genes were amplified by PCR with universal primers (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Amplification conditions were 30 cycles with 30s at 94°C, 30 s at 61.5°C and 90 s at 72°C, with an initial denaturation and a final elongation of 5 min. PCR products were dialyzed on 0,025 µm membrane (Millipore) and DNA concentration was measured with spectrophotometry at 260 nm. Each sample was digested with 13 different restriction enzymes (Acc I, Alu I, Ava II, Cfo I, Cla I, EcoR I, Hpa I, Msp I, Pvu II, Rsa I, Sal I, Sau3AI and Taq I). One microgram of purified DNA was digested with 1 U of enzyme and 2 µl of enzyme buffer in 20 µl total volume during 1 h at enzyme specific temperature. Profiles were analyzed with the Bio-Gene software (Vilber Lourmat®).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

V3 region of 16S rDNA was amplified by a nested-PCR. The first PCR, with primers 5'-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG-3' and 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT T-3', amplified the whole gene. Amplification conditions were 17 cycles with 30 s at 94°C, 30 s at 61.5°C and 90 s at 72°C. The second PCR amplified V3 region with primers 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' and 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'. Amplification conditions were 35 cycles with 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 60 s at 72°C, with an initial denaturation and a final elongation of 5 min for the two PCR. DGGE was performed using DCode System (Bio-Rad Laboratories, USA) onto 8% polyacrylamide gel in 1x Tris-acetate-EDTA buffer (TAE), which contained a 35-55% denaturant gradient (100% denaturant, 7 M Urea and 40% (v/v) deionised formamide). Forty microlitres of PCR

products were loaded on the gel and run 5 h, at constant temperature and voltage (60°C and 130V). Gel was revealed with 2 µl GelStar® Nucleic Acid Gel Stain in 15 ml of distilled water. Interesting bands were excised and immersed into Tris-EDTA buffer 24 h at 4°C to extract DNA from gel then stored at -20°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Reproduction of the disease

The mortality has begun four days after inoculation (D4). Two of eighteen rabbits inoculated with RK501 died at D4 and three more on D5. One of eighteen rabbits inoculated with 50% died at D4 and one more at D5. Global mortality rates were 28% and 11% respectively for batch inoculated with RK501 and 50%. These rates are similar to those observed in reference inoculation protocols (Licois *et al.*, 2005). Autopsies revealed typical ERE's lesions. The average daily weight gain curve (Figure 1) is marked by a severe drop as soon as the D3 for either batch inoculated with the 50% fraction (P=0.0014) or with RK501 (P=0.0091). Seventeen rabbits out of 18 in both batches have showed a drop in their daily weight gain for several continuous days. Global morbidity rate is thus 94% for the two batches.

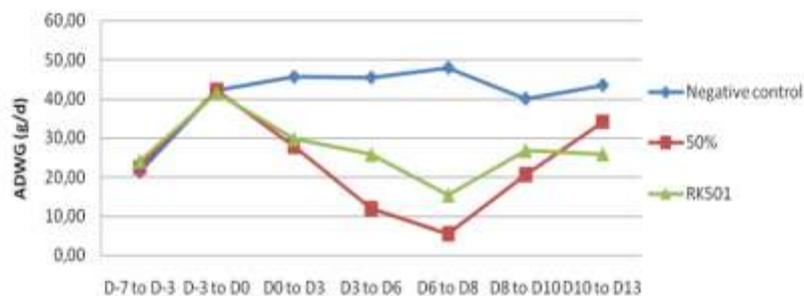


Figure 1: Comparison and evolution of average daily weight gain (ADWG) between the negative control batch and the two inoculated batches with 50% fraction and RK501 fraction

These results confirmed that the etiological agent is present in quality and quantity in both fractions. Since viral particles stay in the supernatant fraction and are not present in the 50% fraction, that reproduced the pathology, no virus can be considered as the etiological agent of ERE.

Bacteriological and bacterioscopic analyses

Bacterioscopic counts are presented in Figure 2. A selection is made through the fractionation. Gram negative bacteria seem absent of the RK501 fraction.

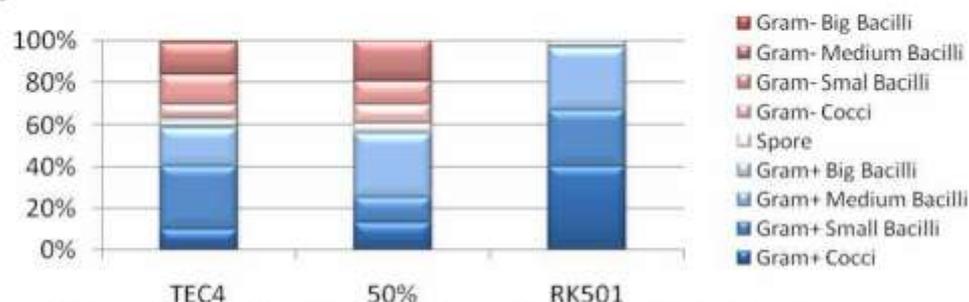


Figure 2: Bacteria's repartition following stain and shape during the fractionation

Of the 13 species detected in the 50% fraction, only 4 were also isolated from RK501 fraction and two other species were present in RK501 fraction but not in the 50% fraction (Table 1). Most species had already been identified previously, except *Brevundimonas vesicularis*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Gemella morbillorum* and *Mannheimia haemolytica*. The first three species are opportunist pathogens, but the last one is a primary respiratory pathogen of ruminants. These results show an evolution of the bacterial flora during the fractionation with selection for some species including the etiological agent like the inoculation on rabbit shows.

Table 1: Bacterial species isolated from the 50% and RK501 plated in traditional media of culture

Media	50%	50%	RK501
Aerobic Sheep blood agar	<i>Bacillus sp</i> <i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Sphingobacterium spiritivorum</i>
Anaerobic Sheep blood agar	<i>Clostridium glycolicum</i> <i>Clostridium histolyticum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium sordelli</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium fallax</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium fallax</i>
Anaerobic Schaedler agar	<i>Bacillus sp</i> <i>Clostridium glycolicum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium fallax</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Gemella morbillorum</i>

RFLP

The restriction profiles showed no specific pattern to the fractions that reproduce ERE.

DGGE

The gel is showed on Figure 3. A band of high intensity is present in all fractions reproducing ERE, while it is of low intensity in the two negative controls and absent from supernatant that do not reproduce ERE. This band will be cloned and sequenced, and will hopefully help in identifying the etiological agent of ERE.

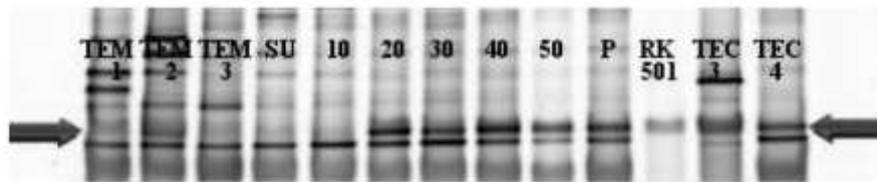


Figure 3: Section of DGGE profile of the different fractions. TEM1, TEM2, TEM3: caecal contents of healthy rabbits; SU, 10, 20, 30, 40, 50, CT: seven sucrose fractions; RK501: cell fraction; TEC3, TEC4: reference inoculums

CONCLUSIONS

ERE's etiology is still unknown but bacterial hypothesis is strongly reinforced. Effectively, our study excludes the viral agents as primary pathogens in the development of ERE. The fractionation of TEC4 is necessary to identify etiological agent. The two fractionations used, centrifugation on discontinuous sucrose gradient and cell adhesion, seem to diminish the flora's variety without loss of virulence. A difference in bacterial DNA composition of the fractions was found with DGGE and RFLP profiles but only the DGGE showed difference between virulent and non-virulent fractions. This can reinforce the theory of bacterial etiology but further investigations are needed to obtain DNA sequence information and to explain this difference.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a Grant from the "Service Public Fédéral Santé Publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement: Division Recherche contractuelle", contract RT 06/7 MINRABBIT. N. Huybens is a PhD fellow of the "Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture" (FRIA).

REFERENCES

- Dewree R., Licois D., Coudert P., Lassence C., Vindevogel H., Marlier D. 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL): étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. In: *Proc. 10^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 2003 November, Paris, France, 251-254.*
- Duval M.L. 1998. Développement de l'entérocolite en France. In: *Proc. 7^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, 1998 May, Lyon, France, 1-8.*
- Licois D. 1998. Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'entérocolite épizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie. In: *Proc. 7^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, 1998 May, Lyon, France, 20-25.*
- Licois D., Coudert P. 2003. Entéropathie Epizootique du Lapin: reproduction expérimentale, symptômes et lésions observées. In: *Proc. 10^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 2003 November, Paris, France, 139-144.*
- Licois D., Coudert P. 2005. Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4: effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps. In: *Proc. 11^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 2005 November, Paris, France, 265-268.*
- Licois D., Coudert P., Ceré N., Vautherot J.F. 2000. Epizootic enterocolitis of the rabbit: review of current research. In: *Proc. 7th World Rabbit Congress, 2000 July, Valencia, Spain, 187-194.*
- Licois D., Wyers M., Coudert P. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research, 36, 601-613.*
- Maertens L., Cornez B., Vereecken M., Oye S.V. 2005. Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S(R)) in a chronically infected Epizootic Rabbit Enteropathy environment. *World Rabbit Sci., 13, 165-178.*
- Marlier D., Dewree R., Lassence C., Licois D., Mainil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R., Vindevogel H. 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet. J., 172, 493-500.*
- Marlier D., Vindevogel H. 1998. L'entérocolite épizootique du lapin. *Ann. Méd. Vét., 142, 281-284.*
- Szalo I.M., Lassence C., Licois D., Coudert P., Poulipoulis A., Vindevogel H., Marlier D. 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J., 173, 652-657.*

Publications

4. POSTER : “BIOMOLECULAR COMPARISON OF BACTERIOLOGICAL CAECAL FLORA WITH AND WITHOUT EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY (ERE) CONTAMINATION”

Un poster a présenté au salon Biomedica 2009 les résultats obtenus grâce aux profils de RFLP, DGGE et RAPD.

B28

Biomolecular comparison of bacteriological caecal flora with and without Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) contamination**Huybens, N., Houeix, J., Licois, D., Maini, J. and Marlier, D.**

Corresponding author: Nathalie Huybens

nathalie.huybens@ulg.ac.be

tel : +32 (0)4 366 40 58

fax : +32 (0)4 366 40 12

Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes Faculté de médecine vétérinaire Boulevard de Colonster, 20, B42 4000 Liège

Academic supervisor: Pr D. Marlier, Pr J. Mainil

Abstract:

Epizootic Rabbit Enteropathy is a severe disease of broiler rabbits both in intensive and individual production units. Today, the aetiology of ERE is still unknown despite ten years of continuous research. Virological, parasitological and mycotic aetiologies have been eliminated so that a putative bacterial aetiology is at the basis of the current research. A new approach to find this aetiological agent, most probably a non cultivable bacteria, is the biomolecular research.

Thirteen samples from caecal content of healthy and sick rabbits were used for this study. Virulent contents were fractionated with two subsequent techniques, centrifugation on discontinuous gradient sucrose and adherence on RK13 cells. Total DNA was extracted from the 13 samples with QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). V3 region of 16S rDNA was amplified by a nested-PCR. V6-V8 regions of 16SrDNA were amplified by a touchdown-PCR. Products were loaded on DGGE gels. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) was also performed on the same samples. Products were loaded on agar gel.

One interesting band is present on the V3 DGGE pattern in all virulent samples but also in one negative sample but with a lower density. Two interesting bands are observed in 6 several virulent samples out of 7 on the V6-V8 DGGE pattern. On the RAPD gel, a band of a size about 400bp was observed in six of the seven positive samples and was lacking in all negative samples.

The presence of an interesting band in a negative sample could indicate a healthy carriage of the responsible bacteria or the existence of a non virulent strain. Conversely, the absence of the interesting band in positive sample could be a detection issue. The positive sample in which the band was not observed in the RAPD profile is a fraction containing a lot of eukaryote DNA that was amplified instead of bacterial DNA.

In conclusion, a difference in bacterial DNA composition was found between virulent and non-virulent samples what reinforce the potential role of bacteria in the aetiology of ERE. Once sequenced, these specific bands could lead to the identification of the aetiology.

Biomolecular comparison of bacteriological caecal flora with and without Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) contamination.

Huybens, N., Houeix, J., Licois, D., Mainil, J., Marlier, D.

Disease description

What is Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) ?	A digestive pathology
When does the epidemic start?	In 1997
Where is ERE observed?	In Europe and North Africa
What are the clinical Signs of ERE?	- Decrease in food intake - Decrease in water consumption - High mortality rate - Aqueous diarrhoea
What are the lesions of ERE (Figure 1)	- Distension of the digestive tract - No inflammation process
What is the aetiology?	Unknown but most probably an uncultivable bacteria ¹

Figure 1: Typical distension of the digestive tract on ERE infected farm rabbit



Material and methods

Thirteen samples from caecal content of healthy and sick rabbits were used for this study. Virulent contents were fractionated with two subsequent techniques².

Total DNA was extracted from the 13 samples with QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

V3 region of 16S rDNA was amplified by a nested-PCR. V6-V8 regions of 16SrDNA were amplified by a touchdown-PCR³. Products were loaded on DGGE gels.

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) was performed on the same samples. Products were loaded on agar gel.

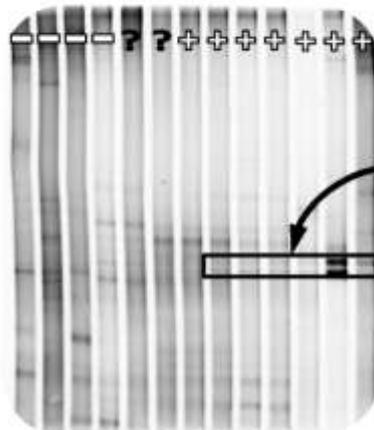


Figure 3: DGGE profiles of the V6-V8 regions of the thirteen samples

Two interesting bands were observed in 6 several virulent samples out of 7.



In conclusion

Despite many years of research with traditional bacterial culture, the aetiology of Epizootic Rabbit Enteropathy is still unknown.

However, the biomolecular approaches that were developed have successfully demonstrated differences in caecal bacterial flora. Once sequenced, these specific bands could lead to the identification of the aetiology.

Acknowledgements

We want to thank the team of the Laboratory of Cyanobacteria of Annick Wilmette (Allée de la Chimie 3, 4000 Liège, Belgium) for their great help with the DGGE.

This work was supported by a Grant from the "Service Public: Fédéral Santé Publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement: Division Recherche contractuelle", contract RT 06/7 MINRABBIT. N. Huybens is a PhD fellow of the "Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture" (FRIA).

Bibliography

1. D. Licois, M. Huyen et P. Coaden 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization Veterinary Research, 40:1-622
2. Huybens N., Houeix J., Licois D., Mainil J., Marlier D. Incubation and bacterial analysis of fractions obtained from the reference bacterial TECA which experimentally reproduces the Epizootic Rabbit Enteropathy, World Rabbit Science, Reviewing
3. Yu et al. Merriam 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis Applied and Environmental Microbiology, 68:37-4

Results

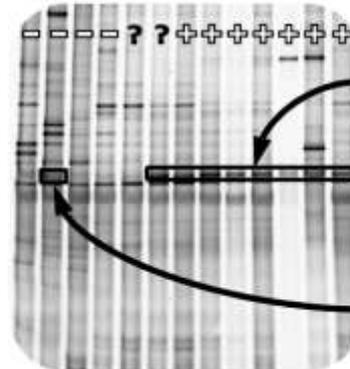


Figure 2: DGGE profiles of the V3 region of the thirteen samples

One interesting band is present in all virulent samples.

The band was also present in one negative sample but with a lower density.

Figure 4: RAPD profiles of the thirteen samples

A band of approximately 400bp was observed in six of the seven positive samples and was lacking in all negative samples. The positive sample in which the band was not observed is a fraction containing a lot of eukaryote DNA that was amplified instead of bacterial DNA



5. SHORT COMMUNICATION : « ÉPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY: COMPARISON OF BIOMOLECULAR PROFILES FROM VIRULENT AND NON-VIRULENT SAMPLES. »

Une short communication a été publiée au Veterinary Journal. Les profils de RAPD et l'étude de terrain liés aux séquences d'intérêt mises en évidence grâce à cette technique y sont présentés et discutés.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Short Communication

Epizootic rabbit enteropathy: Comparison of PCR-based RAPD fingerprints from virulent and non-virulent samples

N. Huybens^{a,*}, J. Houeix^a, D. Licois^b, J. Mainil^c, D. Marlier^a^a Department of Clinical Science, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium^b Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health Research Unit, Bat 213, INRA, 37380 Nouzilly, France^c Department of Infectious and Parasitic Diseases, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 17 October 2010

Keywords:

Epizootic rabbit enteropathy
RAPD

ABSTRACT

Epizootic rabbit enteropathy is a gastrointestinal disorder of unknown aetiology of farmed rabbits characterised by inanition and mortality. Genomic analyses of virulent and non-virulent samples of inocula were performed using random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Differences in bacterial DNA composition were found between inocula, but specific sequences were not linked with field cases of epizootic rabbit enteropathy.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Epizootic rabbit enteropathy (ERE) is a gastrointestinal disorder of farm rabbits characterised by inanition, mortality and, sometimes, mild watery diarrhoea. The main lesions are an over-full anterior digestive tract, including the stomach, without evidence of inflammation (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006). The aetiology of ERE is unknown, but bacterial infection has been suspected (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Huybens et al., 2009). ERE can be reproduced with several reference inocula, such as TEC3 and TEC4 from caecal contents of rabbits that died of ERE (Licois et al., 2005), and with some fractions of these inocula separated by discontinuous sucrose gradient centrifugation (Szalo et al., 2007; Huybens et al., 2009).

In this study, a comparison was made between virulent and non-virulent inocula by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). The aim was to distinguish specific bands and sequences in the virulent fractions that could be used to identify bacteria causing ERE. Bacteria with the identified sequences were isolated and inoculated into specific pathogen free (SPF) rabbits. The frequency of the specific sequences in rabbits that died naturally of ERE or other digestive disorders was determined.

Two hundred microlitres of TEM1 (caecal contents from an SPF rabbit), TEM2 (caecal contents from a pet rabbit), TEM3 (caecal contents from a fauve de Bourgogne rabbit), TEC3 and TEC4, as well as 1 mL of each of seven sucrose fractions of TEC4 (Huybens et al., 2009), were centrifuged for 2 min at 20,000 g. DNA was extracted from the pellets of these fractions using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) (Supplementary Table S1). Profiles were visualised on 1% agarose gels and DNA from bands of interest was ex-

tracted using NucleoSpin Extract II (Macherey–Nagel) and cloned into pGEM-T Vector System II (Promega). Sequencing was performed by V. Dhennin, Genotranscriptomics Platform, University of Liège.

Twelve RAPD profiles were analysed. The number of bands for each sample ranged from 1 to 9, with an average of 5. A common band of approximately 400 bp was identified in the RAPD6 profile in the TEC3, TEC4 and virulent fractions, but was missing in the negative control samples and the non-virulent fractions (Supplementary Fig. 1a). Another common band of approximately 800 bp was identified in the AP5 profile in the same samples (Supplementary Fig. 1b).

A 392 bp sequence (GQ202543) present in the seven bands of interest from the RAPD6 profile was designated R6B and lies within the *yijP* gene. This gene has been described in several *Enterobacteriaceae*, but none of these species has been isolated from TEC3 and TEC4 (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Huybens et al., 2009). Specific PCRs for R6B confirmed its presence in bacterial DNA from all virulent inocula. However, the full *yijP* gene was missing. It was hypothesised that this R6B sequence could be a fragment of *yijP* carried by a mobile genetic element. An 823 bp sequence (GU951517) present in the seven bands of interest from the AP5 profile was designated AP5B; this sequence has no match in the GenBank database and was detected in both virulent and non-virulent samples, with the exception of TEM1 and TEM3.

Caecal contents from 176 rabbits held in different environments and fed different diets were collected postmortem at the Veterinary Faculty of Liège and frozen at –20 °C. Rabbits were classified as ERE positive or negative based on history, gross lesions and the results of systematic examination for other digestive pathogens (Supplementary Table S2). DNA was extracted from caecal contents

* Corresponding author. Tel.: +32 4 3664058; fax: +32 4 3664012.
E-mail address: nathalie.huybens@ulg.ac.be (N. Huybens).

Table 1

Association between epizootic rabbit enteropathy (ERE) and the R6B PCR in 176 field samples.

	R6B+ <i>yijP</i> -	R6B- <i>yijP</i> -	Total of <i>yijP</i> -	AP5B+	AP5B-	Total
ERE+	19	15	34	19	27	46
ERE-	57	59	116	62	68	130
Total	76	74	150	81	95	176

using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. PCRs for R6B and AP5B sequences (identified as specific to virulent inoculums by RAPD) and the *yijP* gene (which contains the R6B sequence) were performed on these samples. Fisher's exact tests were performed to assess the relationship between the presence of these sequences and ERE status.

Of the 176 field samples analysed, 26 were *yijP* positive and were discarded from the study because *yijP* was absent from the virulent inoculums that were positive for R6B. No statistical link was found between ERE and the presence of R6B or AP5B sequences (Table 1).

Ten microlitres of TEC4 were plated onto media (Columbia with sheep's blood; MacConkey; Müller–Hinton; Rapid'Sal; Oleandomycin–polymyxin–sulfadiazine–*Perfringens*, OPSP; Chapman; Polcam; Schaedler; Edward; Brain heart infusion) under aerobic and anaerobic conditions and incubated at 37 °C for 24 h. Media were scraped and specific R6B and AP5 PCRs were performed on the pooled scraped colonies. Positive media were plated again and each colony was tested by PCR. The positive colonies were identified according to standard procedures. To confirm the bacterial species isolated, 16SrDNA sequencing was performed (Supplementary Table S1) and compared with sequences in GenBank and the Ribosomal Database Project database. No strain carrying AP5B was found, even with more prolonged incubation. Two bacterial isolates positive for R6B by PCR were identified as *Staphylococcus epidermidis*.

A *S. epidermidis* R6B-positive strain was inoculated PO into 18 6-week-old SPF rabbits (500 µL of 24 h culture each). A positive group of 18 rabbits inoculated with 100 µL of TEC4 and a negative group of 19 rabbits inoculated with 500 µL of non-virulent caecal contents were housed separately. Rabbits were weighed every other day. The presence of diarrhoea and incidence of mortality were recorded every day.

Rabbits inoculated with the *S. epidermidis* R6B-strain showed no signs of diarrhoea or evidence of a decrease in average daily weight gain (ADWG). There was no significant difference between the

ADWG of the *S. epidermidis* R6B-strain inoculated group and the negative control group. Typical clinical signs, lesions and decrease in ADWG were seen in the positive control group. Inoculation of the R6B-positive *S. epidermidis* failed to reproduce ERE.

S. epidermidis is a commensal bacterium of the skin, sometimes responsible for secondary and nosocomial infections. The R6B sequence is missing from the published chromosomes and plasmids for this species (GenBank). Taking into consideration the field study, the inoculation study and the characteristics of the bacterium, the *S. epidermidis* R6B-positive strain is not the aetiological agent of ERE. In conclusion, the two specific sequences discovered by RAPD profiles are not linked to the ERE but only to the inocula TEC3, TEC4 and their fractions.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This study was funded by the Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment (RT 06/7 MINRABBIT). N. Huybens is a PhD fellow of the 'Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture'.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tvjl.2010.10.010.

References

- Huybens, N., Houeix, J., Licois, D., Maimil, J., Marlier, D., 2009. Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces the epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Science* 17, 185–193.
- Licois, D., Wyers, M., Coudert, P., 2005. Epizootic rabbit enteropathy: Experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research* 36, 601–613.
- Marlier, D., Dewree, R., Lassence, C., Licois, D., Maimil, J., Coudert, P., Meulemans, L., Ducatelle, R., Vindevoel, H., 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *The Veterinary Journal* 172, 493–500.
- Szalo, I.M., Lassence, C., Licois, D., Coudert, P., Poulipoulis, A., Vindevoel, H., Marlier, D., 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *The Veterinary Journal* 173, 652–657.

Publications

6. SHORT COMMUNICATION : «PYROSEQUENCING OF EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY INOCULUMS AND RABBITS CAECAL SAMPLES »

Une short communication a été publiée au Veterinary Journal. Les résultats obtenus lors du séquençage par ultra haut débit y sont présentés et discutés.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Short Communication

Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples

N. Huybens^{a,*}, J. Houeix^a, D. Licois^b, J. Mainil^c, D. Marlier^{a,*}^a Department of Clinical Science of Companion Animals and Equine, Clinic for Birds, Rabbits and Rodents, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium^b Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health Research Unit, Bat 213, INRA, 37380 Nouzilly, France^c Department of Infectious and Parasitic Diseases, Bacteriology, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 27 August 2012
Available online xxx

Keywords:
HT-sequencing
Epizootic rabbit enteropathy (ERE)
Aetiology
Rabbit

ABSTRACT

The aetiological agent of epizootic rabbit enteropathy (ERE) is still unknown although a bacterial infection seems the most likely hypothesis. In this study, amplification of the V5 and V6 regions of 16SrDNA from four virulent and two non-virulent caecal samples was performed using a pyrosequencing platform. The virulent samples did not group in the same cluster. The bacterial flora identified was both different and richer than the cultivable bacterial flora. These findings highlight the need for biomolecular techniques to identify the aetiological agent of ERE.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Epizootic rabbit enteropathy (ERE) is a digestive disorder of farmed rabbits that since 1997 has been spreading throughout Europe (Licois et al., 2005). Infection by one or several uncultivable bacterial species is the most likely aetiology of ERE (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Bovera et al., 2010). ERE can be reproduced using several reference inocula made from caecal contents of rabbits that died of ERE (Licois et al., 2005). The disease can also be reproduced with some fractions of reference inocula that were prepared in order to reduce the total bacterial counts and the number of bacterial species in an attempt to identify the aetiological agent(s) (Huybens et al., 2009).

Comparison of polymerase chain reaction (PCR)-based, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints from virulent and non-virulent fractions has led to the identification of specific DNA sequences in virulent fractions that are lacking in non-virulent fractions, but no link between these sequences and clinical ERE could be established (Huybens et al., 2011). The aim of the present study was to compare the bacterial flora from different ERE reference inocula and virulent fractions with the bacterial flora from specific pathogen free (SPF) rabbits by pyrosequencing of the 16SrDNA gene amplicons (Ley et al., 2008; Margulies et al., 2005).

Six samples were studied (Table 1; full description of samples is presented in Supplementary material, Appendix A). DNA was extracted from the samples by the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Total DNA samples were amplified with tagged primers by PCR targeting

the V5 and V6 16SrDNA regions. The amplicons were gel purified, pooled in equimolar concentrations and sequenced on a Roche FLX Genome Sequencer with GS Titanium technology on one-eighth of a PicoTiterPlate (Roche) (DNA vision Agrifood). Sequences of at least 50 nucleotides with a maximum of one mismatch in the barcode and primers and a maximum of two undetermined bases were kept for the analyses. Sequences were taxonomically identified using the Ribosomal Database Project (RDP) with a bootstrap cut-off point of 50%. MOTHUR was used to calculate the Chao1 index, the non-parametric Shannon's index of diversity and the operational taxonomic unit (OTU) with a cut-off point of 3%.

A total of 29,552 sequences with sizes between 50 and 414 base pairs (bp) and an average size of 276 bp were obtained. The number of sequences and the number of phyla and genera in each sample, the OTUs, the Chao1 index and the non-parametric Shannon's index values are presented in Table 1. The most important phyla and genera identified in each sample are presented in Appendix B (Supplementary Fig. 1a and b). Between 83.3% and 99.7% of the sequences identified belonged to the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla. The ten most frequently identified genera were *Bacteroides* (*Bacteroidetes*), *Enterococcus*, *Sporobacter*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus* and *Clostridium* (*Firmicutes*) and *Escherichia* (*Proteobacteria*). No single genus was present in all of the virulent samples nor absent from all of the non-virulent samples. Moreover, the samples did not cluster according to virulence (dendrograms are presented in Supplementary Figs. 1 and 2, Appendix B).

The identification of the *Escherichia* genus in the first sample (TEC4) is disturbing because this inoculum is considered *E. coli* free (Licois et al., 2006). In a previous study, a sequence linked to the *Escherichia* genus was also identified in TEC4 sample (Huybens

* Corresponding authors. Tel.: +32 4 3664013 (D. Marlier).
E-mail address: dmarlier@ulg.ac.be (D. Marlier).

Table 1

Sample origin and pathogenicity, number of sequences, phylum genus and operational taxonomic unit (OTU), Chao1 index and non-parametric (Np) Shannon index after pyrosequencing of the 16S rDNA gene amplicons of total bacterial DNA extracted from the samples.

Sample	Origin	Pathogenicity: % morbidity/% mortality after inoculation of SPF rabbits	Number of sequences (% of the total number of sequences)	Number of phyla	Number of genera	OTUs	Chao1	Np Shannon
1	French reference inoculum TEC3 ^a	100/30–50	4530 (15)	5	44	1261	2636.15	6.51
2	French reference inoculum TEC4 ^b	100/35–46	4659 (16)	5	54	1411	2604.61	6.74
3	Acid treatment (pH 2.2, 24 h) of TEC4 ^c	83/27	5168 (17)	6	69	2101	4811.70	7.29
4	50% density sucrose fraction of TEC 4 ^b	94/28	3982 (13)	4	57	1914	4777.16	7.37
5	Acid treatment (pH 2.2, 24 h) of 50% density sucrose fraction of TEC 4 ^c	44/0	4839 (16)	5	80	2238	5796.62	7.48
6	Pool of four caecal contents of healthy SPF rabbits ^c	0/0	6374 (22)	4	35	1994	3505.35	7.16

^a Licois et al. (2005).

^b Huybens et al. (2009).

^c Unpublished data – 57 five-week-old SPF New Zealand White rabbits were used (INRA). The animals were divided into three groups (18 rabbits inoculated with sample 3, 20 rabbits with sample 5 and one control group of 19 rabbits). After administration of the suspensions, the animals were examined daily and weighed (Huybens et al., 2009). Based on the morbidity/mortality results, sample 5 was considered as non-virulent. All investigative procedures were approved by the Animal Care Committee of the Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE), INRA, Nouzilly, France.

et al., 2009) although *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* and *E. vulneris* are the other four species of the *Escherichia* genus (Euzéby, 1998). Again, none of these species has ever been grown from any of the sequenced samples even after specific enrichment. The role of *E. coli* as a complicating agent of ERE is well known, as is the fact that *E. coli* is not the aetiological agent of ERE (Licois et al., 2006; Marlier et al., 2006). The presence of these *Escherichia* sequences may be explained by the presence of a new difficult-to-grow species in the sample.

Finally, the richness of bacterial flora in the samples was high. The number of OTUs and the Chao1 index value that estimate the richness of bacterial flora matched those of human bacterial gut flora (Dethlefsen et al., 2008). The value of the non-parametric Shannon's index that estimates the diversity of flora was higher than that of human gut flora (Turnbaugh et al., 2009).

In conclusion, the difference observed between the cultivable bacterial flora and the sequenced bacterial flora reinforced the idea that biomolecular techniques are a better means to use for analysing inocula in order to identify the aetiological agent(s) of ERE. Unfortunately, the resolution of the pyrosequencing technique seems too low to identify this agent, and our findings indicate that it could be a particular strain (serotype, pathotype) of a known species. Nevertheless, with a greater number of samples and sequences, the pyrosequencing technique should be able to further narrow the number of gender candidates as aetiological agents of ERE.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This study was funded by the Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment (RT 06/7 MINRABBIT). N. Huybens is a PhD Fellow of the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA).

Appendices A and B. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.014>.

References

- Bovera, F., Nizza, S., Marono, S., Mallardo, K., Piccolo, G., Tudisco, R., De Martino, L., Nizza, A., 2010. Effect of mannan oligosaccharides on rabbit performance, digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Science* 18, 9–16.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A., 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology* 6, e280.
- Euzéby, J.P., 1998. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. In: City, vol. 2010.
- Huybens, N., Houeix, J., Licois, D., Mainil, J., Marlier, D., 2009. Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces the epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Science* 17, 185–193.
- Huybens, N., Houeix, J., Licois, D., Mainil, J., Marlier, D., 2011. Epizootic rabbit enteropathy: Comparison of PCR-based RAPD fingerprints from virulent and non-virulent samples. *The Veterinary Journal* 190, 416–417.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., Gordon, J.I., 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647–1651.
- Licois, D., Coudert, P., Marlier, D., 2006. Epizootic rabbit enteropathy. In: Maertens, L., Coudert, P. (Eds.), *Recent Advances in Rabbit Sciences*. ILVO, Melle, Belgium, pp. 163–170.
- Licois, D., Wyers, M., Coudert, P., 2005. Epizootic rabbit enteropathy: Experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research* 36, 601–613.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgeson, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Allenquor, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380.
- Marlier, D., Dewree, R., Lassence, C., Licois, D., Mainil, J., Coudert, P., Meulemans, L., Ducatelle, R., Vindevogel, H., 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *The Veterinary Journal* 172, 493–500.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.

BIBLIOGRAPHIE

- ABECIA L., FONDEVILA M., BALCELLS J., EDWARDS J.E., NEWBOLD C.J., MCEWAN N.R. Effect of antibiotics on the bacterial population of the rabbit caecum. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **272**, 144-153.
- ALTINOK I., BALTA F., CAPKIN E., KAYIS S. Disease of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*. *Aquaculture*, 2007, **273**, 393-397.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, **215**, 403-410.
- ANONYME LA FAO RECONNAÎT LE ROLE IMPORTANT ET CROISSANT DE LA CUNICULTURE. [en ligne] Adresse url: http://www.fao.org/waicent/ois/press_ne/pressfre/2001/prfr0157.htm, consulté le 04/08/2009.
- ARMOUGOM F., RAOUL D. Exploring Microbial Diversity Using 16S rRNA High-Throughput Methods. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 2009, **2**, 74 - 92.
- AUBERT C., GREFFARD B., AMAND G., PONCHANT P. Elevage cunicole et environnement. 13èmes journées de la recherche cunicole, Le Mans, 2009, ITAVI ed.
- BADIOLA I., PEREZ DE ROZAS A.M., ROCA M., CARABANO R., GARCIA J., ROSELL J.M. The 16S r-DNA RFLP profile of total DNA of intestinal bacteria under pathological conditions. 8th World Rabbit Congress Puebla, Mexico, 2005.
- BADIOLA J.I., FAUS C., PÉREZ DE ROZAS A.M., GOROSTIAGA O., ROSELL J.M. Mucoid enteropathy: treatment with apramycin of naturally infected rabbits. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.
- BAIN M.S., GREEN C.C. Isolation of *Escherichia fergusonii* in cases clinically suggestive of salmonellosis. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 511.
- BARRAL E., BIET F., DUIVON D., FILLEUL J.P., PRIM R. Assessment of the extent of lesions, parasites and bacteria in rabbit farms contaminated by epizootic rabbit enterocolitis (ERE). 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.
- BENET T., VANHEMS P. Correlation of nosocomial bloodstream infection incidences: an ecological study. *J. Hosp. Infect.*, 2009, **73**, 217-224.
- BENNEGADI N., FONTY G., MILLET L., GIDENNE T., LICOIS D. Effects of age and dietary fibre level on caecal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2003, **5**, 23-32.
- BENSON D.A., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D.J., OSTELL J., WHEELER D.L. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, D21-25.
- BOISOT P., D L., GIDENNE T. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

Bibliographie

BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., RICHARD A., D L., P C. Evaluation of the effectiveness of soluble bacitracin (bacivet s) in drinking water compared to bacitrcin in the feed (albac), during an experimental reproduction of epizootic rabbib enteropathy syndrome. 8th world Rabbit Congress, Puebla Mexico, 2004, World Rabbit Sci.

BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., LICOIS D., COUDERT P. Méthodologie de reproduction de l'entéropathie épizootique du Lapin (EEL) : contamination par contact direct ou indirect avec un ou plusieurs lapins inoculés avec l'inoculum TEC2 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI Ed.

BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., LICOIS D., COUDERT P. Interaction entre le passé sanitaire des lapines ou des lapereaux sous la mère vis à vis de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) et une contamination expérimentale de ces lapereaux en engraissement. 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI Ed.

BOK C.W., NG Y.S. Eggerthella lenta as a cause of anaerobic spondylodiscitis. *Singapore Med. J.*, 2009, **50**, e393-396.

BOLET G. Problèmes liés à l'accroissement de la productivité chez la lapine reproductrice. *INRA Prod. Anim.*, 1998, **11**, 235-238.

BOSTVIRONNOIS C., MOREL SAIVES A. Intérêt et positionnement de la tylosine dans la maîtrise de l'entéropathie épizootique (EEL) du lapin de chair. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

BOUCHER S., NOUAILLE L. Les maladies du lapin. Editor, 2002, Pages p.

BOULLIER S., MILON A. Rabbit colibacillosis. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 171 - 179.

BOUQUIN S.L., JOBERT J.L., LAROUB G., BALAINE L., EONO F., BOUCHER S., HUNEAU A., MICHEL V. Risk factors for an acute expression of Epizootic Rabbit Enteropathy syndrome in rabbits after weaning in French kindling-to-finish farms. *Livestock Science*, 2009, **125**, 283-290.

BOYER P. Mastitis in dairy herds associated with *Corynebacterium bovis*. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 175-176.

BRAINE A. La production française de lapin en 2002 et tendances pour 2003. *Cuniculture magazine*, 2003, **30**, 20-29.

BRAINE A. The rabbit market in 2006 and 2007. *TeMA - Techniques et Marches Avicoles*, 2007, 19-23.

BRENNAN N.M., WARD A.C., BERESFORD T.P., FOX P.F., GOODFELLOW M., COGAN T.M. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 820-830.

BROUYAUX A. Les animaux de compagnie en Belgique: un enjeu de consommation. [en ligne] (10/02/2006) Adresse url: <http://www.oivo-crioc.org/tex-tes/pdf/1631.pdf> consulté le 12/02/2007.

BRUGÈRE-PICOUX J. Pathologie du lapin de compagnie et des rongeurs domestiques. Editor: Paris, 1989, Pages p.

BURR H.N., LIPMAN N.S., WOLF F.R. Disinfection Efficacy and Environmental Contamination with *Corynebacterium bovis*. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 2009, **48**, 591-591.

CALLAWAY T.R., CARR M.A., EDRINGTON T.S., ANDERSON R.C., NISBET D.J. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2009, **11**, 67-79.

CARABANO R., BADIOLA I., LICOIS D., GIDENNE T. The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 211-227.

CARDINALE M., BRUSETTI L., QUATRINI P., BORIN S., PUGLIA A.M., RIZZI A., ZANARDINI E., SORLINI C., CORSELLI C., DAFFONCHIO D. Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 6147-6156.

CARLIER J.P., K'OUAS G., HAN X.Y. *Moryella indoligenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, **57**, 725-729.

CARNEIRO L.A.M., QUEIROZ M.L.P., MERQUIOR V.L.C. Antimicrobial-resistance and enterotoxin-encoding genes among staphylococci isolated from expressed human breast milk. *J. Med. Microbiol.*, 2004, **53**, 761-768.

CERÉ N., NIEPCERON A., VASSEUR M., VAUTHEROT J.F., LICOIS D. Detection of rabbit rotavirus by polymerase chain reaction in faeces and comparison of gene 9 sequence between two isolated strains. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.

CERIOLI M., LAVAZZA A. Viral enteritis of rabbits. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 181 - 186.

CHAMORRO S., CARABANO R., BADIOLA I., GARCÍA J., DE BLAS C. Effet d'une supplémentation alimentaire en glutamine et en arginine sur la croissance, quelques paramètres de la flore iléale et caecale et la santé intestinale chez le lapereau, sevré précocément et atteint par le syndrome de l'EEL. 12ème Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans (France), 2007, INRA-ITAVI.

CHAN K.Y.Y., LAM H.S., CHEUNG H.M., CHAN A.K.C., LI K., FOK T.F., NG P.C. Rapid identification and differentiation of Gram-negative and Gram-positive bacterial bloodstream infections by quantitative polymerase chain reaction in preterm infants. *Crit. Care Med.*, 2009, **37**, 2441-2447.

CHAN R.C., MERCER J. First Australian description of *Eggerthella lenta* bacteraemia identified by 16S rRNA gene sequencing. *Pathology (Phila)*. 2008, **40**, 409-410.

CHUN J., KIM K.Y., LEE J.H., CHOI Y. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiol.*, 2010, **10**, 101.

CLAVEL T., BORRMANN D., BRAUNE A., DORE J., BLAUT M. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe*, 2006, **12**, 140-147.

COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM-SYED-MOHIDEEN A.S., MCGARRELL D.M., BANDELA A.M., CARDENAS E., GARRITY G.M., TIEDJE J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, D169-172.

Bibliographie

COLIN P., LEBAS F. Le lapin dans le monde. Editor: Lempdes, 1995, Pages p.

COLLADO M.C., DERRIEN M., ISOLAURI E., VOS W.M.D., SALMINEN S. Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 7767-7770.

COMBES S., DALLE ZOTTE A. La viande de lapin : valeur nutritionnelle et particularités technologiques. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 2005, ITAVI ed.

COMBES S., NICE F., LICOIS D., CAUQUIL L., FORTUN-LAMOTHE L., GIDENNE T. Réponse de l'écosystème digestif de lapins EOPS à une inoculation expérimentale par l'EEL (TEC4). . 13èmes journées de la recherche cunicole, Le Mans, 2009, ITAVI ed.

COUDERT P., LICOIS D., ZONNEKEYN V. Epizootic rabbit enterocolitis and coccidiosis : a criminal conspiracy. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.

COUDERT P., RIDEAUD P., RABOTEAU D. Epizootic Rabbit Enterocolitis: spontaneous evolution and attempt to control the disease. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.

COUDERT P. Relation entre l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) et l'infestation par les coccidies : enquête épidémiologique. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

COUDERT P., LICOIS D. Epizootic rabbit enteropathy. Study of early phenomena with fresh inoculum and attempt at inactivation. *World Rabbit Sci*, 2005, **13**, 229-238.

COUDERT P., LICOIS D. Entéropathie épizootique du lapin, étude des phénomènes précoces avec l'inoculum standard (TEC3). 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI Ed.

COUDERT P., RIDEAUD P., VIRAG G., CERRONE A. Pasteurellosis in rabbits. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 147 - 162.

DAL BOSCO A., CASTELLINI C., MUGNAI C. Rearing rabbits on a wire net floor or straw litter: behaviour, growth and meat qualitative traits. *Livestock Production Science*, 2002, **75**, 149-156.

DALAL A., URBAN C., AHLUWALIA M., RUBIN D. Corynebacterium bovis line related septicemia: a case report and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2008, **40**, 575-577.

DALAMAGA M., KARMANIOLOS K., CHAVELAS C., LIATIS S., MATEKOVITS H., MIGDALIS I. Pseudomonas luteola cutaneous abscess and bacteraemia in a previously healthy man. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2004, **36**, 495-497.

DEBROY C., MADDOX C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal Escherichia coli isolates of veterinary significance. *Anim. Health Res. Rev.*, 2001, **2**, 129-140.

DESCOTEAUX J.P., LUSSIER G. Experimental infection of young rabbits with a rabbit enteric coronavirus. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 473-476.

DETHLEFSEN L., HUSE S., SOGIN M.L., RELMAN D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.*, 2008, **6**, e280.

DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., VINDEVOGEL H., MARLIER D. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL): étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

DEWRÉE R., MEULEMANS L., LASSENCE C., DESMECHT D., DUCATELLE R., MAST J., LICOIS D., VINDEVOGEL H., MARLIER D. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Sci.*, 2007, **15**, 91-102.

DING J., SUN Q., LI K., ZHENG M., MIAO X., NI W., HONG L., YANG J., RUAN Z., ZHOU R., ZHOU H., HE W. Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. *BMC Infect. Dis.*, 2009, **9**, (25 July 2009).

DOWD S.E., CALLAWAY T.R., WOLCOTT R.D., SUN Y., MCKEEHAN T., HAGEVOORT R.G., EDRINGTON T.S. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.*, 2008, **8**, 125.

DRIGO I., BACCHIN C., COCCHI M., BANO L., AGNOLETTI F. Development of PCR protocols for specific identification of *Clostridium* spiroforme and detection of sas and sbs genes. *Vet. Microbiol.*, 2008, **131**, 414-418.

DROEGE M., HILL B. The Genome Sequencer FLX(TM) System--Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J. Biotechnol.*, 2008, **136**, 3-10.

DUPERRAY J., BOISOT P., GYONVARCH A., RICHARD A. Persistance de l'efficacité de la bacitracine pour lutter contre l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) après quatre années d'utilisation sur le terrain. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

DURHAM A.E. Hepatitis in horses. In, Comparative hepatitis. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 2008, 245-269.

DUVAL M.L. Développement de l'entérocolite en France. 7èmes journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 1998, ITAVI Ed.

EDGAR R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 2004, **5**, 113.

EUZÉBY J.P. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [en ligne] (24 septembre 2008) Adresse url: <http://www.bacterio.cict.fr>, consulté le 29-09-2008.

EUZÉBY J.P. Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. [en ligne] (24 08 2008) Adresse url: <http://www.bacteriologie.net>, consulté le 20-03-2010.

FAO La FAO reconnaît le rôle important et croissant de la cuniculture. [en ligne] Adresse url: http://www.fao.org/waicent/ois/press_ne/pressfre/2001/prfr0157.htm, consulté le 04/08/2009.

FÉDÉRATION FRANÇAISE DE CUNICULICULTURE Nomenclature officielle des races et variétés de lapins reconnues en France, année 2009 / 2010. [en ligne] Adresse url: <http://www.ffc.asso.fr/commission%20des%20standarts/nomenclature.htm>, consulté le 2-03-2010.

FÉDÉRATION FRANÇAISE DE CUNICULICULTURE Inventaires des races françaises. [en ligne] Adresse url: <http://www.ffc.asso.fr/liens/Inventrace.htm>, consulté le 2-03-2010.

FÉDÉRATION NATIONALE DES ELEVEURS D'ANIMAUX DE BASSE-COUR Liste officielle des races de lapins et leurs variétés reconnues en Belgique. [en ligne] (16-08-2009) Adresse url: http://www.neerhofdieren.be/LFN/formulieren/Races%20de%20lapins%20reconnues%20en%20Belgique_20090816.pdf, consulté le 2-03-2010.

FENNER F., RATCLIFFE F.N. Myxomatosis. In, Myxomatosis. Cambridge: Univ. Press., 1965, xiv + 379 pp.

FILIÈRE AVICOLE ET CUNICOLE WALLONNE La cuniculture belge a-t-elle une tradition dans notre pays ? [en ligne] (sans date) Adresse url: <http://www.facw.be/activitesservices/secteur-lapin.pdf>, consulté le 05/08/09.

FINDLAY S., SINSABAUGH R.L. Large-scale variation in subsurface stream biofilms: a cross-regional comparison of metabolic function and community similarity. *Microb. Ecol.*, 2006, **52**, 491-500.

FISHER M.M., TRIPLETT E.W. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4630-4636.

FORTUN-LAMOTHE L., GIDENNE T. Filière cunicole française et systèmes d'élevage. *INRA Productions Animales*, 2008, Avant propos.

GAFAN G.P., SPRATT D.A. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE)--an attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **253**, 303-307.

GAIBANI P., ROSSINI G., AMBRETTI S., GELSOMINO F., PIERRO A.M., VARANI S., PAOLUCCI M., LANDINI M.P., SAMBRI V. Blood culture systems: rapid detection--how and why? *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, **34 Suppl 4**, S13-15.

GARREAU H., LICOIS D., RUPP R., ROCHAMBEAU H.D. Genetic variability of the resistance to epizootic rabbit enteropathy (ERE): new results. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2006.

GASCHET A., PIAU C., VIOLETTE J., DONNIO P.Y., JOLIVET-GOUGEON A., ENGRAND C., BETREMIEUX P., PLADYS P., TATTEVIN P. Multiple brain abscesses caused by *Pseudomonas luteola*. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2009, **28**, 1144-1146.

GIDENNE T. Recent advances in rabbit nutrition: emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Sci.*, 2000, **8**, 23-32.

GIDENNE T., FORTUN-LAMOTHE L. Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Science*, 2002, **75**, 169-184.

GIDENNE T. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science*, 2003, **81**, 105-117.

GIDENNE T., GARCIA J. Nutritional strategies improving the digestive health of the weaned rabbit. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 229-238.

- GIDENNE T., COMBES S., LICOIS D., CARABANO R., BADIOLA I., GARCIA J. The caecal ecosystem and the nutrition of the rabbit: interaction with digestive health. *INRA Productions Animales*, 2008, **21**, 239-249.
- GRUNER E., PFYFFER G.E., VON GRAEVENITZ A. Characterization of *Brevibacterium* spp. from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 1408-1412.
- GUITAN J., CORRALES J.C., PRIETO C., VEGA M.D., CACHALDORA P., FERNANDEZ P., HERMIDA M.J., SANJUAN M.L., YUS E. An assay of experimental mucoid enteropathy with commercial dry rabbits pellets. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.
- HAGE T.J. *Saccharomycopsis guttulatus*. I. Pathogenicity for young rabbits. *Am. J. Vet. Res.*, 1952, **6**, 117-119.
- HEMMAT G., EMTIAZI G. Isolation of *Cellulomonas* sp. from silkworm (*Bombyx mori*) gut and evaluation of its endoglucanase activity. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 2000, **31**, 255-260.
- HERSEY-BENNER C. Diarrhea in a rabbit. *Cyniclomyces guttulatus* yeast. *Lab Anim (NY)*, 2008, **37**, 347-349.
- HIAR I., GENTRIC A., TANDE D., KOCHOWSKI S., GARRE M. Bactériémie à *Sphingobacterium spiritivorum*. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2002, **32**, 200-201.
- HOLMSTROM K., COLLINS M.D., MOLLER T., FALSEN E., LAWSON P.A. *Subdoligranulum variabile* gen. nov., sp. nov. from human feces. *Anaerobe*, 2004, **10**, 197-203.
- HSUAN S., LIAO C., HUANG C., WINTON J.R., CHEN Z., LEE W., LIAO J., CHEN T., CHIOU C., YEH K., CHIEN M. Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine. *Vaccine*, 2009, **27**, 2923-2929.
- HUGHES J.B., HELLMANN J.J., RICKETTS T.H., BOHANNAN B.J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4399-4406.
- HUSE S.M., HUBER J.A., MORRISON H.G., SOGIN M.L., WELCH D.M. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol.*, 2007, **8**, R143.
- IBLER K., TRUBERG JENSEN K., OSTERGAARD C., SONKSEN U.W., BRUUN B., SCHONHEYDER H.C., KEMP M., DARGIS R., ANDRESEN K., CHRISTENSEN J.J. Six cases of *Aerococcus sanguinicola* infection: clinical relevance and bacterial identification. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2008, **40**, 761-765.
- JACQUET M., TELLER C., VAN SANTFOORT L. Résultats de deux centres de référence et d'expérimentation de production du lapin en Belgique : engraissement en parc sur litière et conduite en bande unique à 49 jours 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI Ed.
- JACQUINET C., LE NORMAND B., NOUAILLE L. Etude nationale des pratiques et des comportements des éleveurs cuniques face à l'entérocolite à l'aide d'un programme interactif. 9^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 2001, ITAVI Ed.
- JAGLIC Z., JEKLOVA E., LEVA L., KUMMER V., KUCEROVA Z., FALDYNA M., MASKOVA J., NEDBALCOVA K., ALEXA P. Experimental study of pathogenicity of *Pasteurella multocida* serogroup F in rabbits. *Vet. Microbiol.*, 2008, **126**, 168-177.

Bibliographie

- JAMES A.E., HAMILTON R., CAMPBELL N., PRESIDENTE P. The pseudoparasite *Cyniclomyces guttulatus* (syn. *Saccharomycopsis guttulatus*) in rabbit faeces. *Animal Technology*, 1998, **49**, 35-38.
- JENTZER A. Performances moyennes des élevages cynicoles en 2007 *Cuniculture magazine*, 2008, **35**, 39-44.
- JIN J., ZHAO Y., NAKAMURA N., AKAO T., KAKIUCHI N., MIN B., HATTORI M. Enantioselective dehydroxylation of enterodiol and enterolactone precursors by human intestinal bacteria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, **30**, 2113-2119.
- JOBERT J.L., EONO F., LEGALL-RECUÉ G., GUITTET M. Reproduction expérimentale du syndrome d'Entérocolite Epizootique du Lapin : étude anatomo-clinique et hématologique. 9^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 2001, ITAVI Ed.
- JONES J.R., DUFF J.P. Rabbit epizootic enterocolitis. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 532.
- KANG M.S., IM W.T., JUNG H.M., KIM M.K., GOODFELLOW M., KIM K.K., YANG H.C., AN D.S., LEE S.T. *Cellulomonas composti* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from cattle farm compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, **57**, 1256-1260.
- KIM S.H., JIA W., PARREIRA V.R., BISHOP R.E., GYLES C.L. Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157 : H7 and its association with PmrC. *Microbiology*, 2006, **152**, 657-666.
- KNOBLOCH J.K., NEDELMANN M., KIEL K., BARTSCHT K., HORSTKOTTE M.A., DOBINSKY S., ROHDE H., MACK D. Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 5812-5818.
- KOBAYASHI M., TSUDA Y., YOSHIDA T., TAKEUCHI D., UTSUNOMIYA T., TAKAHASHI H., SUZUKI F. Bacterial sepsis and chemokines. *Curr. Drug Targets*, 2006, **7**, 119-134.
- KOOP G., VAN WERVEN T., SCHUILING H.J., NIELEN M. The effect of subclinical mastitis on milk yield in dairy goats. *J. Dairy Sci.*, 2010, **93**, 5809-5817.
- KPODEKON M., RIDEAUD P., COUDERT P. Pasteurellosis in rabbits: a review. *Revue de Médecine Veterinaire*, 1999, **150**, 221-232.
- KUMHAR G.D., RAMACHANDRAN V.G., GUPTA P. Bacteriological analysis of blood culture isolates from neonates in a tertiary care hospital in India. *J. Health Popul. Nutr.*, 2002, **20**, 343-347.
- LA SCOLA B., RAOULT D. Molecular Identification of *Gemella* Species from Three Patients with Endocarditis. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 866-871.
- LAI P.C., CHEN Y.S., LEE S.S. Infective endocarditis and osteomyelitis caused by *Cellulomonas*: a case report and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2009, **65**, 184-187.
- LANGAN J., BEMIS D., HARBO S., POLLOCK C., SCHUMACHER J. Tyzzer's disease in a red panda (*Ailurus fulgens fulgens*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2000, **31**, 558-562.

LAROUR G., JOBERT J.L., BALAINE L., EONO F., KLEIN M.F., LEDEIN T., BOUQUIN S.L., GUITTET M. Etude des facteurs de risque de l'expression aiguë de l'enterocolite épizootique du lapin en engraissement. *Epidemiologie et Sante Animale*, 2004, 91-99.

LAVAZZA A., CAPUCCI L. Viral infection of rabbits. 9th World Rabbit Congress, Verona, 2008.

LE GALL J.P., PICAULT J.P., ALLÉE C., LE BIHANNIC P., COLIN P. Essais de reproduction expérimentale de l'entérite épizootique du lapin (E.E.L.). 7èmes journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 1998, ITAVI Ed.

LE NORMAND B., LE GUENEC J., MOALIC P.Y. Contribution à l'étude toxintypique des souches de Clostridium perfringens isolées dans l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). Relation avec la clinique observée. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

LE NORMAND B., LICOIS D., NIEPCERON A., CHATELLIER S. Description d'un cas de maladie de Tyzzer en élevage intensif de lapins de chair 11^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI ed.

LEBAS F., COUDERT P., DE ROCHAMBEAU H., THÉBAULT R.G. The rabbit husbandry, health and production. Editor: Rome, 1997, Pages p.

LEBAS F. Entérocolite épizootique et alimentation du lapin. 7èmes journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 1998, ITAVI Ed.

LEBAS F. Historique de la domestication et des méthodes d'élevage des lapins. [en ligne] (sans date) Adresse url: <http://www.cuniculture.info/Docs/Elevage/Histori-01.htm>, consulté le 11/05/2007.

LEROYER J., COULOMBEL A. Un atelier cunicole biologique qui fonctionne ! *Cuniculture magazine*, 2009, **36**, 1-4.

LEY R.E., HAMADY M., LOZUPONE C., TURNBAUGH P.J., RAMEY R.R., BIRCHER J.S., SCHLEGEL M.L., TUCKER T.A., SCHRENZEL M.D., KNIGHT R., GORDON J.I. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, **320**, 1647-1651.

LICOIS D. Tyzzer's disease, a review. *Ann. Rech. Vet.*, 1986, **17**, 363-386.

LICOIS D. Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'entérocolite épizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie. 7èmes journées de la Recherche Cunicole: Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, Lyon, 1998, ITAVI Ed.

LICOIS D., VAUTHEROT J.F., COUDERT P., DAMBRINE G. Experimental reproduction of epizootic enterocolitis in SPF rabbits. *World Rabbit Sci.*, 1998, **6**, 349-353.

LICOIS D., COUDERT P., CERÉ N., VAUTHEROT J.F. Epizootic enterocolitis of the rabbit : review of current research. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.

LICOIS D., COUDERT P. Entéropathie Epizootique du Lapin : reproduction expérimentale, symptômes et lésions observées. 9^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 2001, ITAVI Ed.

LICOIS D., DEWREE R., COUDERT P., VINDEVOGEL H., MARLIER D. Essai de reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) avec des inoculums originaires de Belgique et des Pays-Bas et avec des souches bactériennes isolées de ces inoculums ainsi que de TEC2 et TEC3 (inoculums INRA). 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

Bibliographie

LICOIS D. Domestic rabbit enteropathies. 8th world Rabbit Congress, Puebla, Mexico, 2004.

LICOIS D., COUDERT P. Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4 : effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps. 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI Ed.

LICOIS D., WYERS M., COUDERT P. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 601-613.

LICOIS D., COUDERT P., MARLIER D. Epizootic rabbit enteropathy. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 163 - 170.

LICOIS D. Etude *in vivo* de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4, inoculum utilisé pour la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin. 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 2007, ITAVI Ed.

LICOIS D., MARLIER D. Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Prod. Anim.*, 2008, **21**, 257-268.

LU G., MORIYAMA E.N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinform.*, 2004, **5**, 378-388.

LUDERT J.E., ABDUL-LATIFF L., LIPRANDI A., LIPRANDI F. Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. *Res. Vet. Sci.*, 1995, **59**, 222-225.

MACCHIONI P., MARIANI G., FINZI A. Epidemiology of epizootic rabbit enterocolitis in rabbits raised without chemical treatments. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.

MACFARLANE S., MACFARLANE G.T. Bacterial Diversity in the Human Gut. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004, **54**, 261-289.

MAERTENS L., CORNEZ B., VERECKEN M., VAN OYE S. Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S(R)) in a chronically infected Epizootic Rabbit Enteropathy environment. *World Rabbit Sci.*, 2005, **13**, 165-178.

MAERTENS L., FALCAO-E-CUNHA L., MAROUNEL M. Feed additives to reduce the use of antibiotics. In: L. Maertens and P. Coudert, Recent advances in rabbit sciences. ILVO: Melle, Belgium, 2006, 259-265.

MAERTENS L., STRUKLEC M. Technical note: preliminary results with a tannin extract on the performance and mortality of growing rabbits in an enteropathy infected environment. *World Rabbit Sci.*, 2006, **14**, 189-192.

MAERTENS L. Optimiser la gestion et l'hygiène dans l'élevage cunicole. *Filière avicole et cunicole*, 2008, **27**, 6-9.

MAINIL J.G., DAUBE G. Verotoxigenic Escherichia coli from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 1332-1344.

MAJ D., BIENIEK J., LAPA P., STERNSTEIN I. The effect of crossing New Zealand White with Californian rabbits on growth and slaughter traits. *Arch. Tierz.-Arch. Anim. Breed.*, 2009, **52**, 205-211.

MARCATO P.S., SJA'BAN M. Mucoïd enteritis in rabbits. *Nuova Veterinaria*, 1967, **43**, 546-556.

MARGULIES M., EGHOLM M., ALTMAN W.E., ATTIYA S., BADER J.S., BEMBEN L.A., BERKA J., BRAVERMAN M.S., CHEN Y.J., CHEN Z., DEWELL S.B., DU L., FIERRO J.M., GOMES X.V., GODWIN B.C., HE W., HELGESEN S., HO C.H., IRZYK G.P., JANDO S.C., ALENQUER M.L., JARVIE T.P., JIRAGE K.B., KIM J.B., KNIGHT J.R., LANZA J.R., LEAMON J.H., LEFKOWITZ S.M., LEI M., LI J., LOHMAN K.L., LU H., MAKHIJANI V.B., MCDADE K.E., MCKENNA M.P., MYERS E.W., NICKERSON E., NOBILE J.R., PLANT R., PUC B.P., RONAN M.T., ROTH G.T., SARKIS G.J., SIMONS J.F., SIMPSON J.W., SRINIVASAN M., TARTARO K.R., TOMASZ A., VOGT K.A., VOLKMER G.A., WANG S.H., WANG Y., WEINER M.P., YU P., BEGLEY R.F., ROTHBERG J.M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, **437**, 376-380.

MARLIER D., VINDEVOGEL H. L'entérocolite épizootique du lapin. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 281-284.

MARLIER D., DEWREE R., DELLEUR V., LICOIS D., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Annales de Médecine Veterinaire*, 2003, **147**, 385-392.

MARLIER D., DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H. L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 2003, ITAVI Ed.

MARLIER D., DEWREE R., LASSENCE C., LICOIS D., MAINIL J., COUDERT P., MEULEMANS L., DUCATELLE R., VINDEVOGEL H. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet. J.*, 2006, **172**, 493-500.

MATSUNAGA Y., CHINO F. Experimental infection of young rabbits with rabbit parvovirus. *Arch. Virol.*, 1981, **68**, 257-264.

MCINERNEY J.O., WILKINSON M., PATCHING J.W., EMBLEY T.M., POWELL R. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 1646-1648.

MCKENNA P., HOFFMANN C., MINKAH N., AYE P.P., LACKNER A., LIU Z., LOZUPONE C.A., HAMADY M., KNIGHT R., BUSHMAN F.D. The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog.*, 2008, **4**, e20.

MCLEOD C.G., KATZ W. Opportunistic bacteria isolated from the caecum of rabbits with mucoïd enteritis. *Br. Vet. J.*, 1986, **142**, 177-188.

MCLEOD C.G., KATZ W. Toxic components in commercial rabbit feeds and their role in mucoïd enteritis. *South African Journal of Science*, 1986, **82**, 375-379.

METCALF J.B., LEDERMAN M., STOUT E.R., BATES R.C. Natural parvovirus infection in laboratory rabbits. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 1048-1051.

MEZES M., BALOGH K. Mycotoxins in rabbit feed: a review. *World Rabbit Sci.*, 2009, **17**, 53-62.

MICHELLAND R.J., COMBES S., MONTEILS V., CAUQUIL L., GIDENNE T., FORTUN-LAMOTHE L. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe*, 2009, doi:10.1016/j.anaerobe.2009.05.002.

Bibliographie

- MICHELLAND R.J., DEJEAN S., COMBES S., FORTUN-LAMOTHE L., CAUQUIL L. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*, 2009, **9**, 1359 - 1363.
- MIDDELBOS I.S., VESTER BOLER B.M., QU A., WHITE B.A., SWANSON K.S., FAHEY G.C., JR. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS One*, 2010, **5**, e9768.
- MOGOLLON G J.D., PENA B N.E., JIMENO M.C.D., RODRIGUEZ M G. Complex mucoid enteritis of rabbits. II. Causal interrelation between aflatoxins and *C. perfringens*. *Revista Instituto Colombiano Agropecuario*, 1981, **16**, 97-111.
- MOLETTE C., NICOT M.C., COULMIER D., FARIZON Y., GIDENNE T. Impact d'une incorporation élevée de drèches de distillerie de blé, dans un aliment à formulation simplifiée, sur la croissance, la qualité de la carcasse et la composition en acides gras de la viande de lapin. 13èmes journées de la recherche cunicole, Le Mans, 2009, ITAVI ed.
- MOLINA J.M., CORDOBA J., RAMIREZ P., GOBERNADO M. [Automatic detection of bacterial and fungal infections in blood]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2008, **26 Suppl 9**, 75-80.
- MONTEILS V., CAUQUIL L., COMBES S., GODON J.J., GIDENNE T. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **66**, 620-629.
- MORISSE J.P., BOILLETOT E., MARTRENCAR A. Preference testing in intensively kept meat production rabbits for straw on wire grid floor. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 1999, **64**, 71-80.
- MORTON D.J., SEALE T.W., BAKALETZ L.O., JURCISEK J.A., SMITH A., VANWAGONER T.M., WHITBY P.W., STULL T.L. The heme-binding protein (HbpA) of *Haemophilus influenzae* as a virulence determinant. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2009, **299**, 479-488.
- MUDIT C., DEEPTI, GURPREET K., TARUNVEER S. Isolation of *Corynebacterium bovis* from hog deer - a case report. *Zoos' Print*, 2010, **25**, 25.
- MUNOZ P., CRUZ A.F., RODRIGUEZ-CREIXEMS M., BOUZA E. Gram-negative bloodstream infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2008, **32 Suppl 1**, S10-14.
- NIEMANN H.H., SCHUBERT W.D., HEINZ D.W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect.*, 2004, **6**, 101-112.
- NJIRO S.M., NGATIA T.A., KURIA J.K.N. Mucoid enteritis of rabbits in Kabete area, Kenya: a review of post-mortem cases. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 1988, **36**, 87-88.
- NORIN E., MIDTVEDT T. Intestinal microflora functions in laboratory mice claimed to harbor a "normal" intestinal microflora. Is the SPF concept running out of date? *Anaerobe*, 2009.
- OU G., HEDBERG M., HORSTEDT P., BARANOV V., FORSBERG G., DROBNI M., SANDSTROM O., WAI S.N., JOHANSSON I., HAMMARSTROM M.L., HERNELL O., HAMMARSTROM S. Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 2009, **104**, 3058-3067.

- PACINI N., FERRARI A., ZANCHI R., CORTI M., GREPPI G.F. The effects of protein dietary sources on serum cholesterol and bile acid microbiological transformations in rabbits. *Nutrition Reports International*, 1989, **39**, 851-859.
- PARK H.K., SHIM S.S., KIM S.Y., PARK J.H., PARK S.E., KIM H.J., KANG B.C., KIM C.M. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J Microbiol*, 2005, **43**, 345-353.
- PATTERSON-KANE J.C., DONAHUE J.M., HARRISON L.R. Septicemia and peritonitis due to *Actinobacillus equuli* infection in an adult horse. *Vet. Pathol.*, 2001, **38**, 230-232.
- PEETERS J.E., POHL P., CHARLIER G. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits: a field study. *Ann. Rech. Vet.*, 1984, **15**, 335-340.
- PEETERS J.E., GEEROMS R., CARMAN R.J., WILKINS T.D. Significance of *Clostridium spiroforme* in the enteritis-complex of commercial rabbits. *Vet. Microbiol.*, 1986, **12**, 25-31.
- PEETERS J.E., GEEROMS R., RSKOV F. Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 1442-1448.
- PEREGUDOV S.I., KHANEVICH M.D. The small intestine as the origin of bacteremia in acute diffuse peritonitis. *Nutr. Hosp.*, 1996, **11**, 317-320.
- PERSILLON C., FRANCHET C., D L., RAVOT G. Détection de différents agents potentiellement pathogènes chez des lapins atteints d'entéropathie épizootique du lapin. Recherche de corrélation entre la présence des ces agents et l'observation de la pathologie par comparaison avec des lapins non atteints. 11èmes journées de la recherche cunicole, Paris, 2005, ITAVI Ed.
- PIETTE A., VERSCHRAEGEN G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.*, 2009, **134**, 45-54.
- POHL P.H., PEETERS J.E., JACQUEMIN E.R., LINTERMANS P.F., MAINIL J.G. Identification of *eae* sequences in enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 2203-2206.
- POPESCU G.A., BENE A., MITACHE E., PIPER C., HORSTKOTTE D. An unusual bacterium, *Aerococcus viridans*, and four cases of infective endocarditis. *J. Heart Valve Dis.*, 2005, **14**, 317-319.
- POROYKO V., WHITE J.R., WANG M., DONOVAN S., ALVERDY J., LIU D.C., MOROWITZ M.J. Gut Microbial Gene Expression in Mother-Fed and Formula-Fed Piglets. *PLoS One*, 2010, **5**.
- POUT D. Mucoid enteritis in rabbits. *Vet. Rec.*, 1971, **89**, 214-216.
- PRAVIN D., ATYA K., PUROHIT H.J. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2007, **14**, 7-11.
- RAHARJO Y.C. Strategy on the development of small- and medium-scale rabbit farming based on farmers cooperation. a case of rabbit production in indonesia. 9th World Rabbit Congress, Verona, 2008.
- RAI R.B., AHLAWAT S.P.S. Enteric diseases in rabbits - aetiopathological studies. *Indian Vet. J.*, 1993, **70**, 211-214.

Bibliographie

REIER-NILSEN T., FARSTAD T., NAKSTAD B., LAUVRAK V., STEINBAKK M. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr*, 2009, **9**, 5.

RICHARD A., REMOIS G., LAFARGUE-HAURET P. Effect of bacitracin on epizootic rabbit enterocolitis. 7th world Rabbit Congress, Valencia, 2000, World Rabbit Sci.

RILEY L.K., FRANKLIN C.L. Tyzzer's disease, rat, mouse, and hamster. In, Digestive system. Springer-Verlag: Berlin Germany, 1997, 201-209.

ROCHAMBEAU H.D., LICOIS D., GIDENNE T., VERDELHAN S., COUDERT P., ELSSEN J.M. Genetic variability of the resistance for three types of enteropathy in the growing rabbit. *Livestock Science*, 2006, **101**, 110-115.

RODRIGUEZ-DE LARA R., CEDILLO-PELAEZ C., CONSTANTINO-CASAS F., FALLAS-LOPEZ M., COBOS-PERALTA M.A., GUTIERREZ-OLVERA C., JUAREZ-ACEVEDO M., MIRANDA-ROMERO L.A. Studies on the evolution, pathology, and immunity of commercial fattening rabbits affected with epizootic outbreaks of diarrhoeas in Mexico: a case report. *Res. Vet. Sci.*, 2008, **84**, 257-268.

ROESCH L.F., FULTHORPE R.R., RIVA A., CASELLA G., HADWIN A.K., KENT A.D., DAROUB S.H., CAMARGO F.A., FARMERIE W.G., TRIPLETT E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Isme J*, 2007, **1**, 283-290.

ROMERO C., NICODEMUS N., GARCIA-REBOLLAR P., GARCIA-RUIZ A.I., IBANEZ M.A., BLAS J.C.D. Dietary level of fibre and age at weaning affect the proliferation of *Clostridium perfringens* in the caecum, the incidence of Epizootic Rabbit Enteropathy and the performance of fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, **153**, 131-140.

RYAN K.J., RAY C.G. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. In: K. J. Ryan, C. G. Ray and J. C. Sherris. McGraw-Hill Professional, 2004.

SAMKOL P., LUKEFAHR S.D. A challenging role for organic rabbit production towards poverty alleviation in south east asia 9th World Rabbit Congress, Verona, 2008.

SAMPIMON O.C., BARKEMA H.W., BERENDS I.M.G.A., SOL J., LAM T.J.G.M. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.*, 2009, **134**, 37-44.

SANO N., MATSUNAGA S., AKIYAMA T., NAKASHIMA Y., KUSABA K., NAGASAWA Z., KOIZUMI S., GOTO M., MIYAMOTO H. *Moraxella catarrhalis* bacteraemia associated with prosthetic vascular graft infection. *J. Med. Microbiol.*, 2010, **59**, 245-250.

SASSEVILLE V.G., SIMON M.A., CHALIFOUX L.V., LIN K.C., MANSFIELD K.G. Naturally occurring Tyzzer's disease in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Comp. Med.*, 2007, **57**, 125-127.

SCHLOSS P.D., WESTCOTT S.L., RYABIN T., HALL J.R., HARTMANN M., HOLLISTER E.B., LESNIEWSKI R.A., OAKLEY B.B., PARKS D.H., ROBINSON C.J., SAHL J.W., STRES B., THALLINGER G.G., VAN HORN D.J., WEBER C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75**, 7537-7541.

- SCHOLES S.F.E., EDWARDS G.T. Tyzzer's disease (Clostridium piliforme infection) and possible copper toxicity in a lamb. *Vet. Rec.*, 2009, **164**, 470-471.
- SCHWARZ D., DIESTERBECK U.S., FAILING K., KONIG S., BRUGEMANN K., ZSCHOCK M., WOLTER W., CZERNY C.P. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany-A longitudinal study. *J. Dairy Sci.*, 2010, **93**, 5716-5728.
- SIQUEIRA J.F., JR., ROCAS I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J. Endod.*, 2005, **31**, 411-423.
- SMITH G.R., OLIPHANT J.C., PARSONS R. The pathogenic properties of Fusobacterium and Bacteroides species from wallabies and other sources. *J. Hyg. (Lond)*. 1984, **92**, 165-175.
- SRAKA B., BOUCHER S. Lésions observées et bactéries isolées au laboratoire sur le lapin d'élevage (Oryctolagus cuniculus), entre 1998 et 2008. 13èmes journées de la recherche cunicole, Le Mans, 2009, ITAVI ed.
- SUCHODOLSKI J.S., RUAUX C.G., STEINER J.M., FETZ K., WILLIAMS D.A. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 4702-4708.
- SUCHODOLSKI J.S., DOWD S.E., WESTERMARCK E., STEINER J.M., WOLCOTT R.D., SPILLMANN T., HARMOINEN J.A. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol.*, 2009, **9**, 210.
- SZALO I.M., MARLIER D. (2006). Rapport scientifique: Janvier 2006 CONVENTION n° S - 6143 du Ministère de la Santé Publique, de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire et de l'Environnement : . L'entéropathie épizootique du lapin (Oryctolagus cuniculus): étude approfondie du (des) agent(s) infectieux responsable(s) et développement de vaccins. **Données confidentielles: 74**.
- SZALO I.M., LASSENCE C., LICOIS D., COUDERT P., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H., MARLIER D. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J.*, 2007, **173**, 652-657.
- TERADA A., UCHIDA K., MITSUOKA T. The Bacteroidaceae flora in the faeces of pigs. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Erste Abteilung, Originale*, 1976, **234A**, 362-370.
- THOULESS M.E., DIGIACOMO R.F., DEEB B.J., HOWARD H. Pathogenicity of rotavirus in rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 943-947.
- THOULESS M.E., DIGIACOMO R.F., DEEB B.J. The effect of combined rotavirus and Escherichia coli infections in rabbits. *Lab. Anim. Sci.*, 1996, **46**, 381-385.
- TOOFANIAN F., TARGOWSKI S. Experimental production of rabbit mucoid enteritis. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 705-708.
- TURNBAUGH P.J., HAMADY M., YATSUNENKO T., CANTAREL B.L., DUNCAN A., LEY R.E., SOGIN M.L., JONES W.J., ROE B.A., AFFOURTIT J.P., EGHOLM M., HENRISSAT B., HEATH A.C., KNIGHT R., GORDON J.I. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 2009, **457**, 480-484.

Bibliographie

- VAN KRUIJNINGEN H.J., WILLIAMS C.B. Mucoïd enteritis of rabbits. Comparison to cholera and cystic fibrosis. *Vet. Pathol.*, 1972, **9**, 53-77.
- VANDEKERCHOVE D., ROELS S., CHARLIER G. A naturally occurring case of epizootic enteropathy in a specific-pathogen-free rabbit colony. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2001, **70**, 486-490.
- VETESI F., KUTAS F. Mucoïd enteritis in the rabbit associated with *E. coli*. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1974, **24**, 303-311.
- WADA E. Studies on *Fusobacterium* species in the rumen of cattle. I. Isolation of genus *Fusobacterium* from rumen juice of cattle. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 1978, **40**, 435-439.
- WALDOR M.K., FRIEDMAN D.I. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, **8**, 459-465.
- WANG Q., GARRITY G.M., TIEDJE J.M., COLE J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5261-5267.
- WOLIN M.J., MILLER T.L., COLLINS M.D., LAWSON P.A. Formate-dependent growth and homoacetogenic fermentation by a bacterium from human feces: description of *Bryantella formatexigens* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 6321-6326.
- WU G.D., LEWIS J.D., HOFFMANN C., CHEN Y.Y., KNIGHT R., BITTINGER K., HWANG J., CHEN J., BERKOWSKY R., NESSEL L., LI H.Z., BUSHMAN F.D. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol.*, 2010, **10**.
- XYLOURI E., FRAGKIADAKIS M. Epizootic rabbit enteropathy - current data and control. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2006, **57**, 302-314.
- XYLOURI M.E., SABATAKOU A.O., KALDRYMIDOU E., SOTIRAKOGLOU A.K., FRAGKIADAKIS G.M., NOIKOKYRIS N.P. Histochemical and biochemical study of rabbit intestine in healthy and affected by epizootic enteropathy animals. *Deltion tes Ellenikes Kteniatrikes Etaireias = Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2008, **59**, 357-366.
- YANG M.-L., CHEN Y.-H., CHEN T.-C., LIN W.-R., LIN C.-Y., LU P.-L. Case report: Infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC Infect. Dis.*, 2006, **6**, 179.
- YOON M.H., TEN L.N., IM W.T., LEE S.T. *Cellulomonas chitinilytica* sp. nov., a chitinolytic bacterium isolated from cattle-farm compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, **58**, 1878-1884.
- YU Z., MORRISON M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 4800-4806.
- ZIEBUHR W., HENNIG S., ECKART M., KRANZLER H., BATZILLA C., KOZITSKAYA S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2006, **28 Suppl 1**, S14-20.