

Nominé pour le Prix CUNINOV 2003

Mise au point d'un vaccin vivant atténué contre la colibacillose du lapin

Présentation de l'équipe

Dr Séverine Boullier

Immunité et Physiopathologie des Muqueuses, UMR 1225

Ecole Nationale vétérinaire, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse

Tel : 05 61 19 32 61, Fax : 05 61 19 39 75, e-mail : s.boullier@envt.fr

L'équipe « Immunité et physiopathologie des muqueuses » appartient à l'UMR INRA-DGER 1225 (ex UMR 960) à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. L'équipe est composée de 2 enseignants chercheurs, A.Milon et S.Boullier et d'un technicien C.Tasca. Depuis sa création en 1992, le laboratoire s'intéresse aux pathologies du lapin et en particulier à la colibacillose.

Le laboratoire a caractérisé les souches de *E.coli* responsables des épisodes majeurs de colibacillose dans les élevages cunicoles (Camguilhem and Milon, 1989). Au vu de la haute fréquence des infections par les souches REPEC O103 :K-H2 rhamnose négative et de la très forte virulence de celles-ci, l'objectif a été de mettre au point un vaccin contre ce sérovar.

Des essais préliminaires ont montré que l'administration parentérale des bactéries O103 :K- :H2 rhamnose négative tuées par la chaleur ou formolées n'induisaient pas de protection contre une réinfection par la souche virulente (Camguilhem, 1986). En revanche, des administrations *per os* à très haute dose de ces bactéries formolées à des lapins au sevrage étaient capables de protéger les lapins contre une réinfection expérimentale (Camguilhem and Milon, 1990). Ces vaccins ont été testés dans différents élevages et ont donné de bons résultats de protection. Cependant, la lourdeur du protocole vaccinal et les doses nécessaires pour obtenir une bonne protection ont conduit à abandonner ce vaccin pour une utilisation à grande échelle sur le terrain. Des essais de protection croisée ont également été réalisés avec différentes souches *E.coli* non pathogènes. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les bactéries induisaient une réponse immunitaire protectrice et que la mise au point d'un vaccin efficace était possible (Milon *et al.*, 1992).

En parallèle, le laboratoire a développé des techniques de microbiologie cellulaire permettant d'identifier les facteurs de virulence des REPEC, et des techniques de biologie moléculaire permettant d'inactiver les gènes codant pour ces facteurs. Grâce à la découverte des gènes de virulence spécifiques des EPEC, différents mutants ont pu être envisagés comme candidats vaccinaux (Marchès *et al.*, 2000, Nougayrede *et al.*, 1999).

Ces travaux, à la fois très fondamentaux (caractérisation et inactivation des gènes de virulence) et de terrain (essais vaccinaux), ont permis d'obtenir une souche vaccinale contre la colibacillose du lapin.

L'équipe « Immunité et physiopathologie des muqueuses » poursuit actuellement son travail sur les pathologies du lapin en développant de nouveaux outils immunologiques, inexistant chez le lapin, qui permettent de suivre les réponses immunitaires induites. Ces outils pourront être utilisés par la communauté scientifique pour mieux comprendre la physiopathologie de nombreuses infections du lapin.

Présentation du travail

Mise au point d'un vaccin vivant atténué contre la colibacillose du lapin

Les *Escherichia coli* entéropathogènes ou EPEC sont des bactéries pathogènes du tube digestif. Elles sont responsables de diarrhées parfois mortelles chez les enfants en bas âge et dans de nombreuses espèces animales. Les lapins sont des animaux très sensibles aux infections digestives et la pathologie digestive est la cause principale des pertes économiques dans les élevages cynicoles, tant par la mortalité induite que par les pertes indirectes (retards de croissance, frais de traitement, ect.) qu'elle provoque. Parmi les pathologies digestives du lapin, l'infection par les EPEC représente, avec l'Entérocolite Epizootique, dont l'agent infectieux reste à déterminer, la cause principale de diarrhées dans les élevages.

La colibacillose du lapin touche principalement les lapereaux juste après le sevrage. Différents sérovars ont été impliqués, en fonction des pays. En France, en Espagne et en Italie, les études épidémiologiques ont révélé une très forte prédominance des souches *E.coli* O103 :K-H2 rhamnose négative. Ces souches induisent des diarrhées sévères qui peuvent être létales, avec des inocula oraux aussi réduits que 10⁴ UFC. Dans les élevages, la maladie apparaît sous forme d'épizootie brutale avec de très fort taux de mortalité, se traduisant par des pertes de poids, des retards de croissance et de la mortalité, les animaux mourant après l'installation d'une très forte diarrhée. Les particularités fonctionnelles du système digestif du lapin rendent très délicate l'utilisation de l'antibioprévention et de l'antibiothérapie pour lutter contre la colibacillose. De plus, les nouvelles normes européennes imposent des réductions importantes de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages cynicoles.

L'objectif de ce travail était de mettre au point un vaccin efficace et facile d'utilisation, destiné à protéger les lapereaux contre la colibacillose pendant la phase d'engraissement.

Grâce à la découverte des mécanismes de virulence des EPEC, nous avons choisi de fabriquer une souche vaccinale vivante pour laquelle 2 gènes de virulence majeurs ont été inactivés, les gènes *espB* et *tir*. Cette souche vaccinale a été obtenue à partir de la souche virulente O103 :K- :H2 rhamnose négative, E22. Dans une première étape, nous avons vérifié l'innocuité de cette souche vaccinale, appelée

E22Δ*tir/espB*. Nous avons montré que cette souche a perdu son pouvoir pathogène et ne présente pas de virulence résiduelle. Nous avons ensuite vérifié ses capacités de protection contre l'infection par la souche parentale E22. La souche vaccinale induit une réponse humorale spécifique dès le 7^{ème} jour suivant la vaccination. Nous avons montré que cette souche vaccinale protège les lapereaux pendant toute la phase d'engraissement avec une seule dose d'inoculation par voie orale.

Ce vaccin a fait l'objet d'un dépôt de brevet et va être prochainement commercialisé par la société BIOVE. La construction de la souche vaccinale, les tests d'innocuité et de protection ont fait l'objet d'une publication (Boullier *et al.*, 2003).

Références

- Boullier, S., Nougayrède, J., Marches, O., Tasca, C., Boury, M., Oswald, E., De Rycke, J., and Milon, A. (2003) Genetically engineered Enteropathogenic *E.coli* strain elicits a specific immune response and protects against a virulent challenge. *Microbes and Infection* 5: 857-867.
- Camguilhem, R. (1986) Essai de vaccination des lapins par voie intradermique contre l'entérite colibacillaire à *E.coli* O103. In *C.R. des IVèmes journées de la recherche cynicoles*. Vol. Communication n°35. ITAVI, I. (ed.) Paris.
- Camguilhem, R., and Milon, A. (1989) Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *J Clin Microbiol* 27: 743-747.
- Camguilhem, R., and Milon, A. (1990) Protection of weaned rabbits against experimental *Escherichia coli* O103 intestinal infection by oral formalin-killed vaccine. *Vet Microbiol* 21: 353-362.
- Marchès, O., Nougayrède, J.-P., Boullier, S., Mainil, J., Charlier, G., Raymond, I., Pohl, P., Boury, M., De Rycke, J., Milon, A., and Oswald, E. (2000) Role of Tir and Intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (REPEC) of serotype O103:H2. *Infect Immun*. 68: 2171-2182.
- Milon, A., Esslinger, J., and Camguilhem, R. (1992) Oral vaccination of weaned rabbits against enteropathogenic *Escherichia coli*-like *E. coli* O103 infection: use of heterologous strains harboring lipopolysaccharide or adhesin of pathogenic strains. *Infect Immun* 60: 2702-2709.
- Nougayrède, J.P., Marches, O., Boury, M., Mainil, J., Charlier, G., Pohl, P., De Rycke, J., Milon, A., and Oswald, E. (1999) The long-term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is Esp dependent but intimin independent. *Mol Microbiol* 31: 19-30.