

« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

Mardi 31 Janvier 2017

**Samuel BOUCHER – Bernadette LE NORMAND
– Dominique LICOIS – Sylvie COMBES**

« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

Généralités



32 publications (dont 1 synthèse) : 15 sur les parasites (10/coccidies), 6 VHD
Contributeurs : Chine puis France



« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

VHD

Une table ronde la VHD lors du Congrès

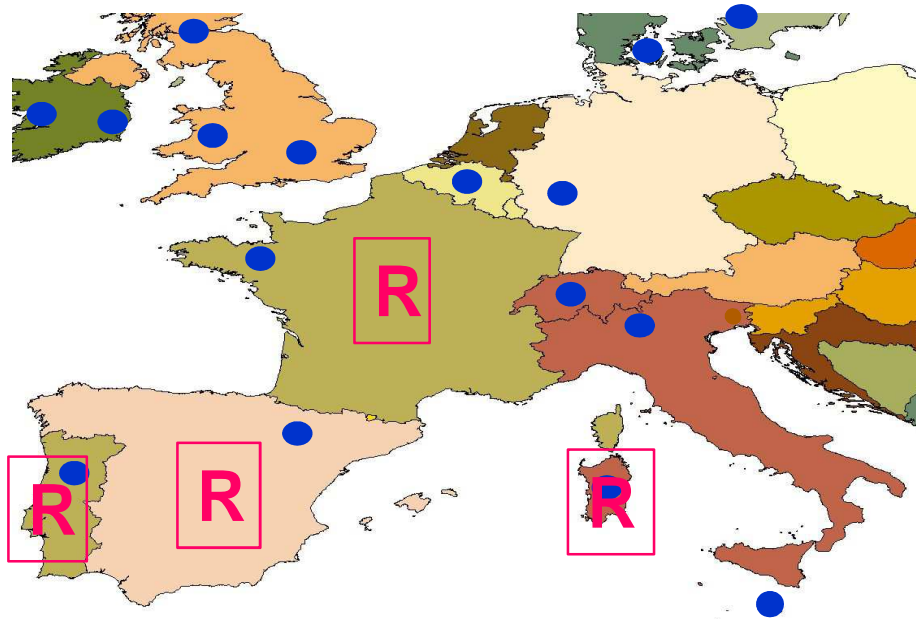


Une table ronde sur la VHD a été organisée durant le Congrès mondial de Qingdao. Chaque pays a présenté l'avancée du virus variant dans son pays.

- le Portugal, l'Espagne, la France, la Sardaigne : RHDV2 seul*
- contamination de lièvres (Lepus europeus , Lepus corsicanus ou Lepus capensis) par le RHDV2.*
- crainte face au développement de l'épizootie.*
- la plupart des pays ont désormais des vaccins propres à leur pays ou importés.*

La France est-elle le seul pays touché ?

En Europe



Remplacement des RHDV classiques

• Espagne : **mai 2011** (sauvage ; *Calvete et al. 2012*)

Italie : **juin 2011**, Sardaigne : **octobre 2011**, (sauvage ; *Le Gall-Reculé et al., 2013*), Malte : **2012** (sauvage ; *Lavazza A., comm. pers.*)

Portugal : **août 2012** (sauvage ; *Abrantes et al., 2013*)

Allemagne : **septembre 2013** (élevage ; *Dalton et al., 2015*)

Angleterre, Pays de Galles, Ecosse : **août 2013** (sauvage ; *Baily et al., 2014 ; Westcott et al., 2014*)

Norvège : **mai 2014** (domestique ; *OIE, juin 2014*)

Danemark : **novembre 2014** (élevage ; *OIE, déc. 2014*)

Suède : **juin 2015** (domestique ; *OIE, sept. 2015*)

Belgique : **printemps 2015** (élevage ; *Marlier D., comm. pers.*)

Suisse : **avril 2016** (domestique ; *OIE, mai 2016*)

Finlande : **avril 2016** (sauvage ; *OIE, mai 2016*)

Irlande : **septembre 2016** (domestique ; *OIE, oct. 2016*)

Hors Europe continentale

✓ Australie : **janvier 2014** (élevage ; *OIE, fév. 2014*) **et mai 2015** (Sauvage ; *OIE, juillet 2015*)

✓ Les Açores : **décembre 2014** (sauvage ; *Duarte et al. 2015*)

✓ Iles des Canaries : **2015** (sauvage et élevage ; *Martin-Alonso et al., 2016*)

✓ Tunisie : **février 2015** (élevage ; *OIE, juillet 2015*)

✓ Bénin : **juillet 2015** (élevage ; *OIE, novembre 2015*)

✓ Côte d'Ivoire : **février 2016** (élevage ; *OIE, août 2016*)

✓ Canada : **août 2016** (élevage ; *OIE, août 2016*)

Du virus classique en Chine, variant à l'Ouest de l'Europe



Chine : isolement d'un nouveau RHDV classique du groupe G2

8 isolats viraux

6 provinces chinoises

2009 et 2014.

- 7 virus du génogroupe 6 (RHDVa) majoritaire en Chine.

-1 souche du groupe 2 (RHDV) originel.

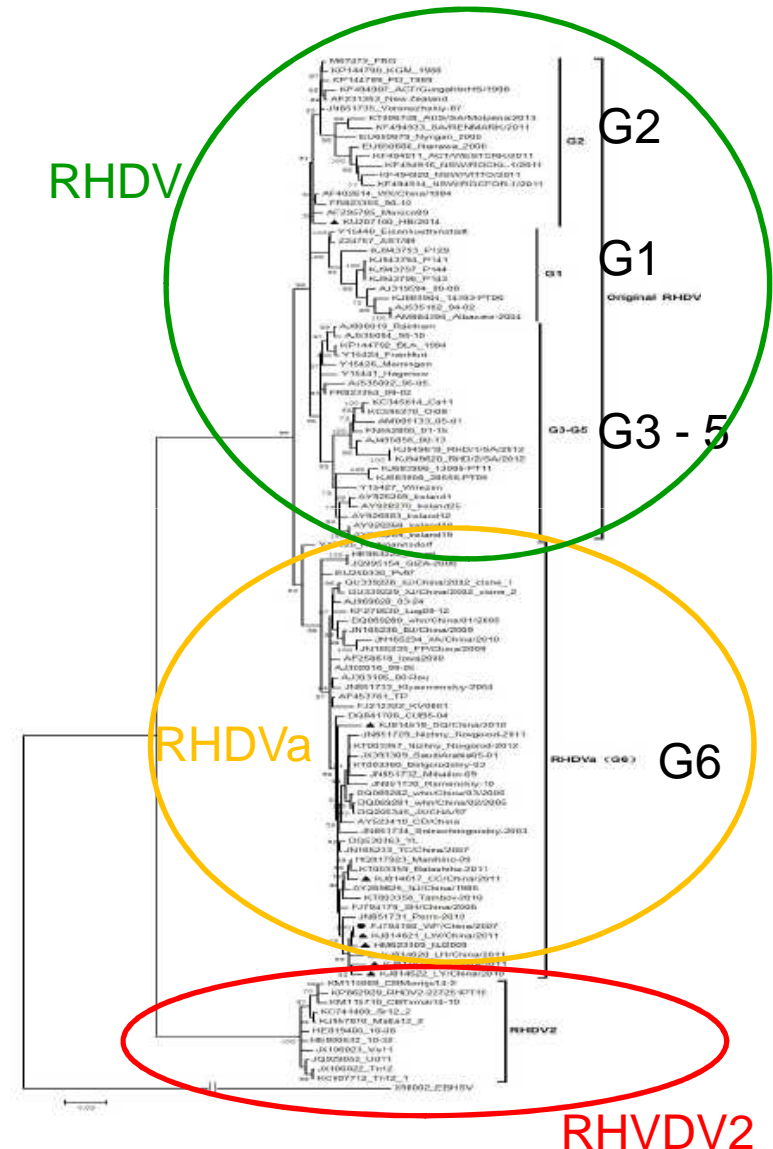
- coévolution des groupes viraux en Chine.

Italie : présence de RHDV2 sur son territoire,

-faune sauvage

-lapin domestique.

-étude de 13 cas / Italie du Sud, élevages rationnels ou fermiers : encore virus RHDV et RHDVa avec variant RHDV2 entre mars 2013 et mai 2015.





Effacité et innocuité d'un vaccin anti-RHDV2 en Espagne

Mesure des Aanticorps : **immunité croisée RHDV/RHDV2 extrêmement faible**

→ nécessité de disposer de vaccins avec valence RHDV2.

Protocole : 60 lapins de 28 jours répartis en 3 groupes de 20 sujets vaccinés :

- soit avec un vaccin classique et RHDV2 (bivalent),
- soit un vaccin RHDV2 seul (monovalent),
- soit du PBS (témoin),

Puis challenge viral 7 jours après vaccination : inoculation virus RHDV2.

-Aucun signe clinique ou lésion au point d'injection avant ou après vaccination sur les sujets vaccinés qui séroconvertissent 7 j après l'épreuve.

- Lapins vaccinés : 0 mort à l'issue du challenge vaccinal. Lapins témoins : 63% mortalité soit 12 lapins morts.

Conclusion des auteurs : les deux types de vaccination contre la VHD à RHDV2 sont identiques en termes d'efficacité de protection contre le RHDV2 ou d'innocuité et qu'**il n'y a pas d'interaction entre les 2 types de vaccination.**

De l'utilité de ce vaccin

- En Espagne en 2011, co-circulaient les virus RHDV classique et RHDV2.
 - La mise en place d'un **plan de surveillance** par le gouvernement et d'un **plan de vaccination** anti-RHDV2 par l'Agence espagnole du Médicament ont eu lieu pour contrôler l'épizootie espagnole.
 - Le travail présenté compare **deux périodes, avant et après vaccination** des élevages (octobre 2013 juillet 2014 puis juillet 2014/ août 2015) et il montre une **corrélation entre le nombre de cas et le programme de vaccination anti-RHDV2**.
 - Au final, sur 104 exploitations situées sur 17 provinces, 65 cas ont pu être attribués à la forme variante 2010 de la maladie.
 - Sur toute la période d'enregistrement, 48,51% des échantillons collectés en élevage ont été positifs alors qu'après vaccination, cette valeur tombe à 44,07%.
 - Les auteurs montrent aussi que **les virus RHDV2 français et italiens sont plus proches entre eux qu'ils ne le sont des virus RHDV2 espagnols ou portugais** à une souche d'exception près.

Des vaccins différents qui prennent en compte le BEA



Rappel :

- peu d'immunité croisée.
- pas de culture des virus RHDV sur des tissus cellulaires en laboratoire donc vaccins issus d'animaux expérimentalement infectés.
- La technologie de l'ADN recombinant peut être utilisée pour la fabrication de vaccins anti VHD.
 - La VP60 peut se polymériser par exemple avec le VLPs (virus like particles) formant alors un nouveau vaccin ne contenant pas de matériel génétique viral. Ce second type de vaccination offre une bonne immunité et une bonne innocuité.
 - Les auteurs rapportent aussi l'utilisation, en France puis dans les autres pays, de virus recombinants comme celui de la myxomatose pour produire un vaccin contre la VHD, virus qui englobent l'ADN codant pour la VP60.
 - Des recombinaisons avec du matériel génétique de plantes et l'ADN codant pour la VP60 permettent aussi de créer une substance protégeant le lapin contre une épreuve virale à RHDV ce qui épargne des vies animales par rapport à la fabrication classique de vaccins.
- Les auteurs ont quant à eux développé un vaccin recombinant à l'aide d'un système *Baculovirus* (virus d'insecte donc hétérologue) exprimant la VP60.
 - Ce type de vaccin conférerait une immunité identique à celle que donne un vaccin traditionnel produit sur tissus, il protégerait en 7 jours pour une période de 7 mois et peut se conserver 24 mois entre 2 et 8 degrés.

Des anticorps monoclonaux issus de souris



Enfin, en dehors des vaccins, un article écrit par des chinois présente une méthode de fabrication sur souris BALB/c d'anticorps monoclonaux reconnaissant les virus RHDV et RHDV2.



Souris BALB/c photo Jackson laboratory

Un retour aux sources ?

La Chine ne fait pas état de l'apparition du RHDV2 chez elle. Les virus de génogroupe 2 initiaux (RHDV dits classiques qui avaient envahi le monde il y a plus de 20 ans) y sont toujours présents, même si le groupe dominant semble être aujourd'hui le G6. Le RHDV2 quant à lui colonise l'Europe et devient le virus dominant à l'Ouest de l'Europe. Va-t-il un jour gagner la Chine en passant d'Ouest en Est comme le RHDV, son ancêtre, l'avait fait entre 1984 et 1988 ?





« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

Parasites autres que Coccidies

Parasites autres que coccidies

1. France : sainfoin et challenge / nématodes (vers) – 40% sainfoin en substitution de la luzerne entre 28 et 75 j – 64 lapins au total

Niveaux d'excrétion œufs comparable entre traité et témoin

Éclosion des œufs diminuée avec sainfoin

- ➔ Mode d'action : effet des tanins
- ➔ Action de certains produits de phytothérapie sur les coccidies

Parasites autres que coccidies

2. France : utilisation d'une méthode Mini Flotac pour suivre les excréments d'œufs d'oxyures

Méthode développée pour la parasitologie dans les pays en voie de développement

Rapide et simple

→ **Echantillons sur nullipares de plus de 15 semaines et sur primipares : détection plus fiable du parasitisme dans un élevage**

→ Effet sur l'immunité et sur les résultats de fertilité

Parasites autres que coccidies

3. Chine : extraits alcooliques végétaux (écorce de *phellodendron* et graines de *cochinchina*) sur *Microsporium canis*, comparaison clotrimazole

Action *in vitro* : dégradation visible du champignon (microscopie électronique) avec le mélange des 2 plantes

Action *in vivo* : activité nettement supérieure du clotrimazole

- Phellodendron et Cochinchina : action sur la sécrétion de cortisol, sur les multiplications cellulaires
- Rappel / législation : propriétés pharmacologiques = autorisation préalable

« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

Antibiorésistance

Antibiorésistance

1. Italie : 32 élevages entre 2010 et 2014, 5 animaux/élevage : isolement *E. coli*

**Résistance aux tétracyclines 70,7%,
aux sulfamides 11,8%**
Niveaux de R élevés

➔ Niveaux alarmants même si baisse de l'usage des antibiotiques entre 2010 et 2014

Usage des antibiotiques en France et Italie

<i>mg/kg</i>	2010	2014	Chute
Italie	2673	1898	-29%
France	799	595	-26%

Etude 2010 Italie (*E. coli*) : 7,7% de sensibilité, 27% résistantes à au moins 3 antibiotiques

Comparaison France : 11% de sensibilité, 44% de souches résistantes à au moins 4 antibiotiques

Antibiorésistance

2. Canada (Ontario) : 27 élevages, 12 animaux/élevage ,
lapines et lapins croissance: prélèvements fécaux pour
isolement *E. coli* & *Salmonella*

***E. Coli* isolé dans tous les élevages, 19% souches
résistantes à au moins 1 famille d'antibiotiques**

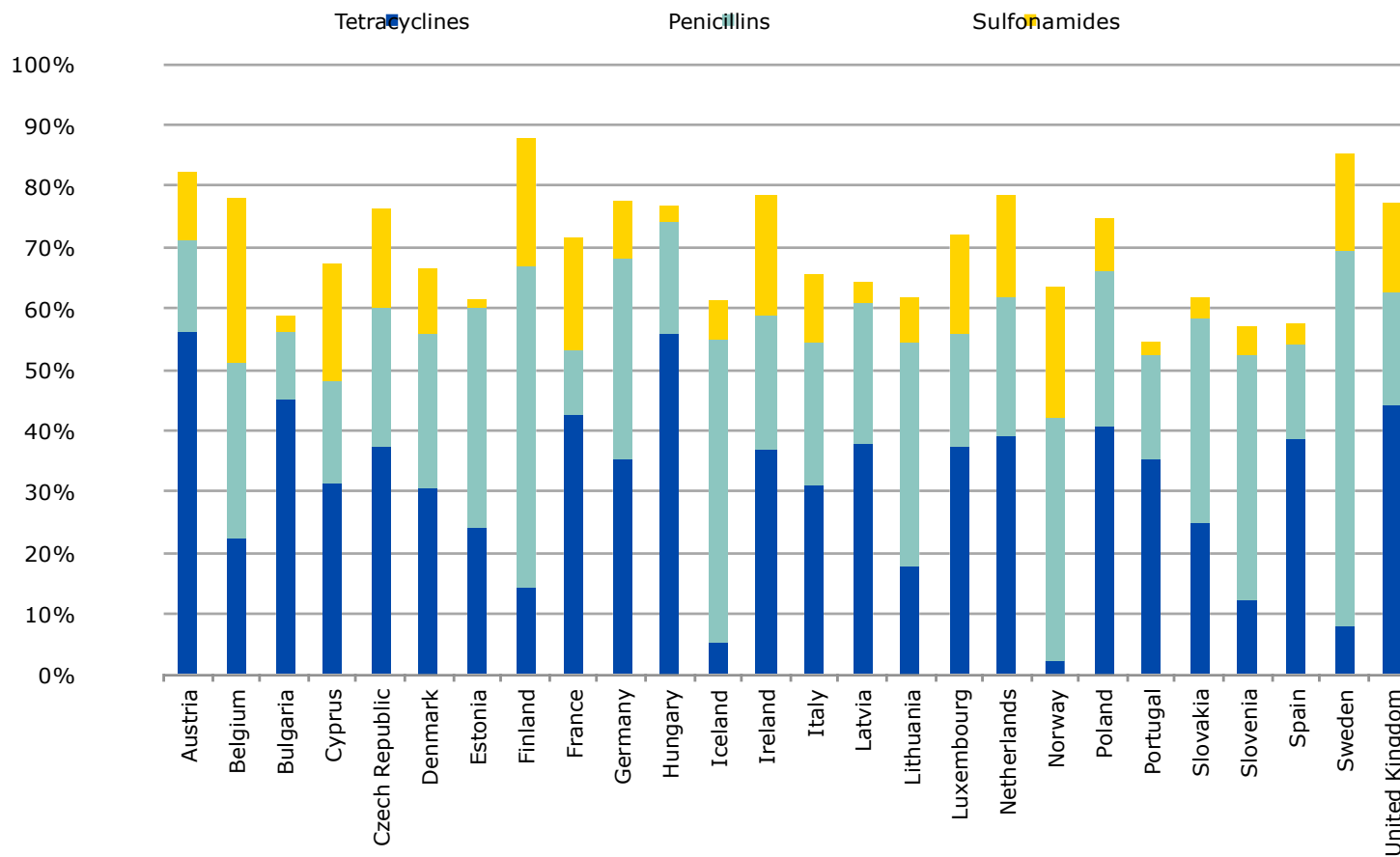
Résistance la plus fréquente = tétracyclines

***Salmonella* : 2 souches isolées dans le même élevage**

(*london, kentucky*)

→ **Salmonelles non isolées en France dans les élevages
rationnels de lapins**

Figure 12. Sales of tetracyclines, penicillins and sulfonamides as a percentage of the total sales for food-producing species (including horses), in mg/PCU, by country, for 2012



Hélène Aubry-Damon, Antoine Andremont, Michel Liénard, Didier Delzescaux et al

Résistance aux antibiotiques des bactéries commensales isolées chez les éleveurs de porcs



Comparaison de la résistance de la
flore commensale digestive chez
112 personnes exposées et 112
non exposées :

70,9 vs 43 % R tétracyclines

Antibiorésistance



3. Italie : poursuite d'une étude sur un élevage contaminé par une souche de *S. aureus* de type MRSA (suivi sur 3 ans – 4 prélèvements) :

Lapins porteurs de *S. aureus* : 92 – 98 – 53 – 93% des animaux prélevés (25/60/60/60 lapins)

Lapins porteurs de MRSA : 52 – 25 – 100 – 100% des lapins porteurs de *S.aureus*

Personnes au contact direct des animaux : 6/6 porteurs de MRSA

Personnes en relation : 5/10 porteurs

- ➔ Eleveurs et leur famille = premiers concernés par l'antibiorésistance
- ➔ Epidémiologie des staphylocoques : élevage porcs (réservoir) / diffusion rapide dans un élevage pour une installation durable
- ➔ Etude Le Normand-Boucher (JRC 2015) : pas de détection de MRSA sur plus de 300 isolats en France

Conclusions



Le MRSA est présent chez toutes les espèces animales

Le MRSA animal peut être multi-résistant: (Tet, KT, fluoroquinolones)

Le MRSA animal est rare en France (infection et portage),
sauf chez le porc (portage sain), et peut-être le chien (infection)

Le clone ST398 MRSA : n'est pas le seul MRSA animal
est peu virulent

Le risque de transmission animal – homme semble limité aux fortes expositions
(milieu professionnel)

« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

Divers

Cicatrisation ombilic

Etude cicatrisation ombilic sur 2862 lapereaux nouveaux nés hybrides et 40 nains (races pures).

(Problème de Législation/transport des animaux)

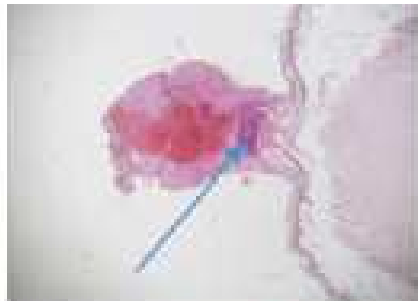


Figure 7: D6-disjunction navel groove (x 25)

Ombilic cicatrisé macroscopiquement à J2
Ombilic fermé histologiquement à J6

- Les lapereaux peuvent voyager très jeunes
- Les sélectionneurs ont des données fournies sur les niveaux de viabilité des lapereaux après transport

Devenir des lapereaux en parcs selon leur vécu en maternité (Hollande)



Lapereaux à pb de santé au nid (>40% fonte) ou non (<15% fonte) mais visiblement sains : quel devenir ensuite ?

3 types de parcs avec des lapereaux apparemment sains +

4/5 lapereaux issus de nids à pb => parcs challenges

OU 4/5 lapereaux issus de nids sans pb => parcs contrôles

Les lapereaux issus de portées à pb meurent plus MAIS différence non significative ET pas de différence de mortalité entre les parcs challenges et les parcs contrôles

Mortalité = quelle cause ? Manque une approche sanitaire précise.

La conclusion « les lapins issus de litières à pb ne les véhiculent pas en engraissement » n'est pas possible si les causes ne sont pas clarifiées.

Ajout de crottes dans le nid : impact sur la santé digestive ?



Elevage terrain sans antibiotiques, 363 nids, 5 bandes.

183 nids avec 5 crottes de jeunes femelles de J2 à J18 – 180 nids sans crottes.

Pas de différences significatives répétées sur les bandes pour les critères de viabilité ou de performance.

Approche scientifique actuelle :

animal = organisme + environnement + microbiote

Ici le groupe C n'a pas eu de crottes rajoutées MAIS des lapines mères qui ont transmis leur flore : difficulté des études terrain

Etudes sur le microbiote indispensables dans toutes les espèces



« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

Coccidies et coccidioses

COCCIDIES ET COCCIDIOSES

→ **10/32** des communications de la session Pathologie

→ **8/10** de Chine : 1 synthèse + 7 communications

Importance des coccidioses en Chine ?

Importance que les Chinois leur accordent ?

→ **Vaccination** : synthèse + 6 communications

LES DIFFÉRENTS TYPES DE VACCINS



Vaccins vivants

Vaccins vivants atténués (plusieurs passages en cultures cellulaires, ...)

Vaccins inactivés = tués (chaleur, formol...)

Antigènes vaccinaux purifiés (protéines responsables d'une activité du pathogène : Ex : toxines inactivées avant leur administration (**anatoxines**) mais présentant la même immunogénicité).

Vaccins recombinants vivants

- Vecteurs bactériens
- Vecteurs viraux

Vaccination à ADN = vaccination génique

Synthèse de Xun Suo et *al.*

.

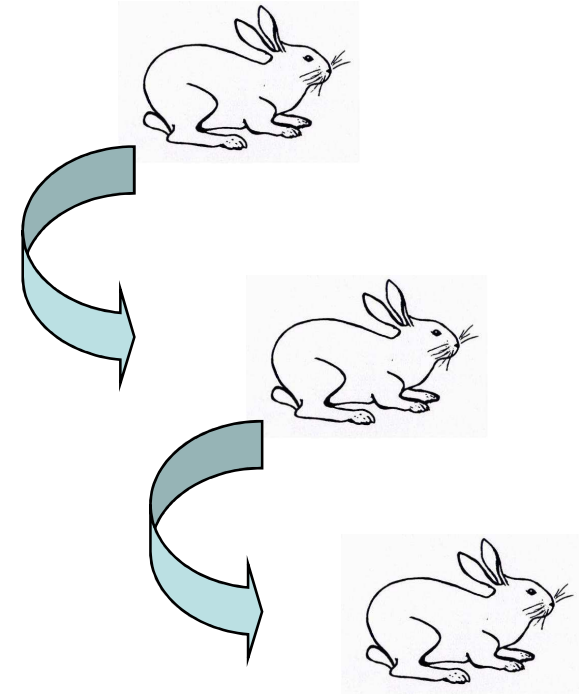
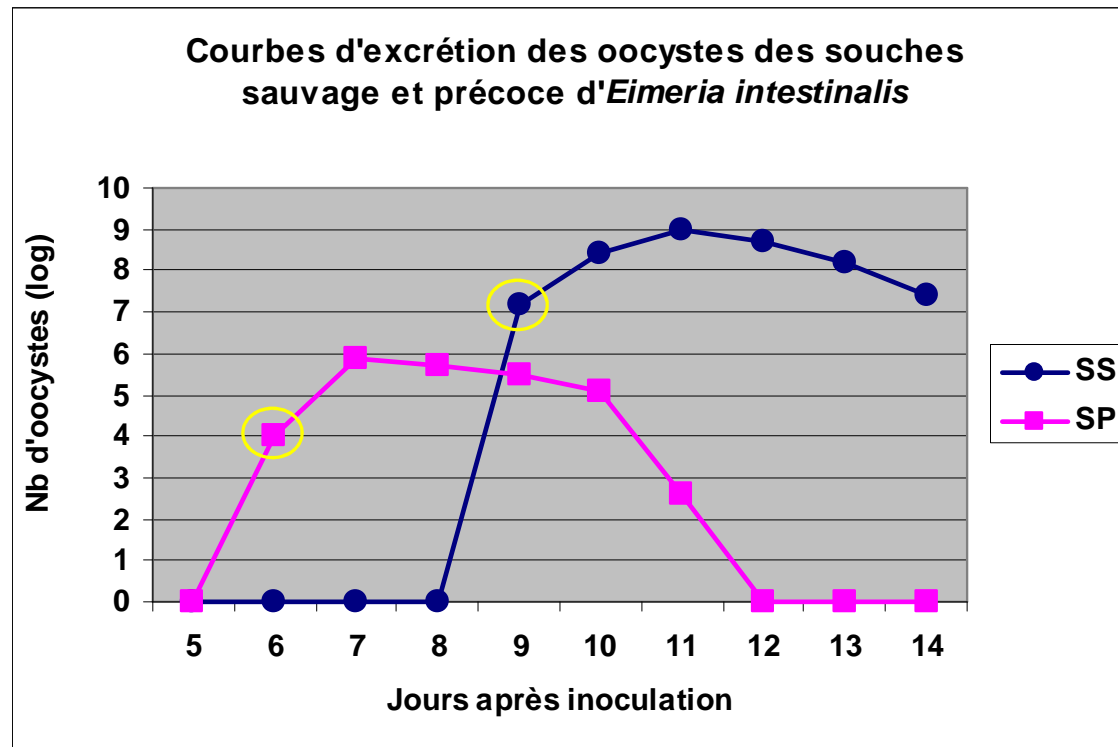
Avant les années 2000 :

- Impossible de vacciner avec des parasites inactivés ou des fractions parasitaires
- Mais possible avec des souches atténuées → développement des **souches précoces**

chez le poulet : vaccins commercialisés (Paracox5®, Paracox8®, Livacox®...).

puis chez le lapin (Licois et *al.* et Pakandl et *al.*)

Multiplication *in vivo* par sélection des premiers oocystes et passages successifs chez l'animal



Les souches ainsi obtenues ont un cycle raccourci (de plusieurs jours)

→ souches précoces

Ces souches sont 500 à 1000 fois moins pathogènes tout en conservant leur propriétés immunogènes



3 communications (chinoises) relatives aux vaccins vivant ont été présentées

Gu et al., et Li et al. : obtention de souches précoces respectivement pour *E. media* et *E. intestinalis*.

→ Les auteurs démontrent que les souches précoces sont peu ou pas pathogènes mais qu'elles protègent les lapins vis-à-vis des souches sauvages dont elles dérivent.

Wang et al. : utilisation de vaccins vivants (non atténués)

3 espèces de coccidies (*Eimeria intestinalis*, *E. magna* et *E. media*) administrées en mono-espèce ou en co-infection (les 3 espèces).

→ Résultats similaires à ceux obtenus dans notre laboratoire (INRA). Bonne efficacité du vaccin.

→ Les chinois ont isolé une souche d'*E. intestinalis* peu ou pas pathogène.

Depuis le début des années 2000

→ **Développement de la biologie moléculaire** : en évolution constante :

au plan des matériels et équipements,
au plan des techniques en génie génétique

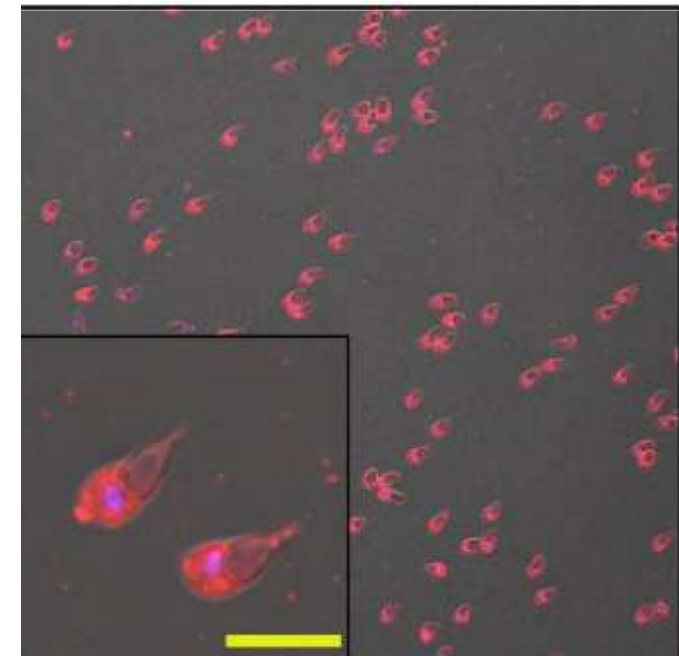
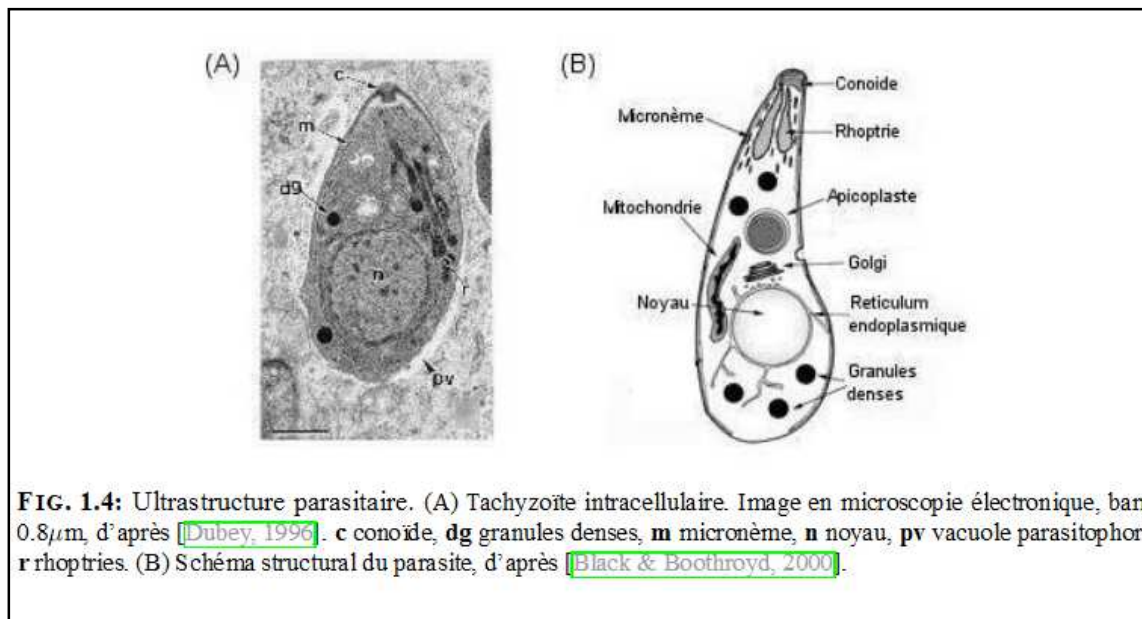
→ **Chez le poulet, le génome d'*E. tenella* a été séquencé (60 Mb - 14 chromosomes de 1 Mb à > 6 Mb).**

→ De nouvelles stratégies se sont développées avec notamment le recours aux **antigènes recombinants** pour les vaccins et particulièrement ici pour les **vaccins antiparasitaires**.

3 communications = obtention d'antigènes recombinants (pouvant potentiellement être utilisés comme vaccin)

Tao et al. ont utilisé *E. magna* et se sont intéressés à une protéine, la "**profiline**" (déjà identifiée chez *E. tenella* et *E. acervulina*) → rôle dans l'invasion de la cellule hôte et de la migration du parasite jusqu'à son site de développement, chez les apicomplexes (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Eimeria* spp...).

La séquence génomique codante (522 pb) pour la profiline a d'abord été identifiée chez *E. magna*, puis clonée et enfin son expression révélée au niveau postérieur du cytoplasme et au niveau membranaire des sporozoites d'*E. magna*.



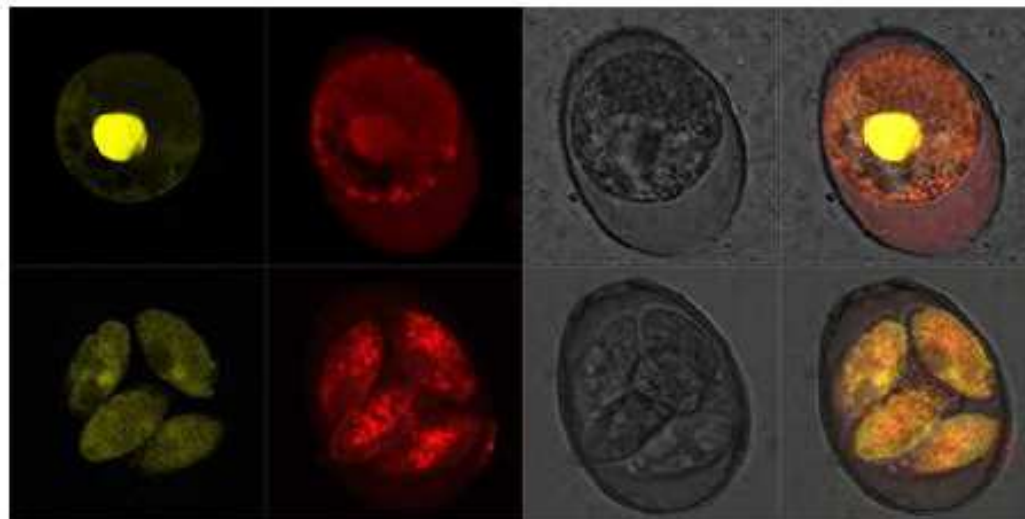
Les mêmes auteurs, **Tao et al.**, ont construit par transfection (électroporation des sporozoïtes) et en utilisant des séquences régulatrices de *E. tenella* et *Toxoplasma gondii*, une **lignée transgénique de *E. magna*** exprimant des gènes marqueurs :

- une protéine fluorescente jaune → marquage du **noyau**
- une protéine fluorescente rouge → marquage du **cytoplasme**

A



C





Ces marqueurs fluorescents ont permis de vérifier qu'ils étaient exprimés **durant toutes les étapes du cycle parasitaire** (schizogonies, gamogonie, et sporogonie).

Shi et al. Même technologie que Tao et *al*, mais avec un seul marqueur fluorescent et chez *E. intestinalis*,

→ résultats similaires concernant l'expression du gène marqueur, **tout au long du cycle du parasite.**

→ **Essais *in vivo*** : la souche transfectée **se multiplie moins et est moins virulente** que la souche sauvage mais **reste très immunogène** (protège le animaux vis-à-vis d'une inoculation d'épreuve avec la souche sauvage



Toutes ces approches démontrent qu'il **est possible de transférer des sporozoïtes et d'obtenir des lignées de coccidies susceptibles d'exprimer des gènes d'intérêt**, dans le cadre d'une vaccination ou **d'être utilisée en tant que telles comme vaccin**.

Mais pour le moment la plupart des travaux présentés constituent plutôt **des mises au point méthodologiques** pour construire des souches transgéniques par ingénierie génétique, que de véritables essais de vaccination.

De plus, un long chemin reste à parcourir avant d'obtenir des vaccins recombinants commercialisables, car **de nombreuses questions restent en suspens** :

- Quels sont les antigènes et combien seront nécessaires pour induire une immunité protectrice contre plusieurs espèces sur le terrain ?
- Quelle est la meilleure voie d'administration ?
- Comment faire en sorte que l'expression de l'antigène exogène soit suffisante pour induire des réponses immunitaires protectrices, tant quantitatives que qualitatives ?
- Quelle réponse faut-il privilégier (humorale, cellulaire, muqueuse ?), etc...

Li et al. → action thérapeutique et prophylactique du **Ponazuril**
= triazine dérivée du toltrazuril, **anticoccidien** de synthèse.

- Mesures de **l'excrétion oocystale** et **des performances zootechniques** après inoculation expérimentale (10^5 oocystes/animal) de 5 espèces (*E. flavescens*, *E. intestinalis*, *E. magna*, *E. perforans* and *E. stiedai*.)

Doses = 10 et 20 mg/kg, en préventif (7 jours avant inoculation)
= 15 et 30 mg/kg, en curatif (7 jours après inoculation)

- **Essai terrain** : 0, 10, 30 and 60 mg/kg

→ Le Ponazuril s'avère globalement efficace dans la gamme 10-30 mg/kg en réduisant l'excrétion d'oocystes et en maintenant le GMQ à un bon niveau (en préventif ou curatif).

→ Equivalent à 1mg/kg de diclazuril

→ A 60 mg/kg, des problèmes d'appétence ont été observés (gaspillage d'aliment) et IC augmente nettement

Les 2 dernières communications = **état des lieux sur les différentes espèces d'*Eimeria* identifiées** et leur fréquence :

Kimse et al. : Côte d'Ivoire :

→ 11 espèces de coccidies décrites chez le lapin ont été retrouvées dans les élevages, le plus souvent par association de 3 espèces.

Yang et al. : région montagneuse de **Chine** (Réserve des Trois Gorges) → 45 millions de lapins y sont élevés .

→ 9 espèces identifiées

E. irresidua est l'espèce la plus représentée (> 43%). Puis viennent *E. perforans*, *E. intestinalis* , *E. magna*

Personnellement → doute sur l'identification précise des *Eimeria*



« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

EEL

Pas de communication concernant l'EEL mais un rapport intitulé :
« **Recent advances on ERE in growing rabbits** », présentée par
Badiola I. et al. (Espagne).



Article décevant en terme de qualité scientifique et plutôt qu'une synthèse,
= somme de travaux de l'équipe, non publiés par ailleurs, collés bout à
bout, mal décrits et incomplets.

Rôle de ***Clostridium perfringens*** : reproduction des symptômes de
l'EEL (impaction caecale / 45% de mortalité) avec certaines souches.

→ Aucune précision sur les souches en question : Toxinotype ? Gènes
codant pour des toxines ?

→ Chez quel type d'animaux : conventionnels ? EOPS ?

→ Aucune publication de confirmation

→ Mais Badiola souligne que l'EEL est une **maladie multifactorielle !**



Trois expérimentations sont ensuite présentées :

1^{ère} expé → effet de l'âge sur l'évolution du microbiote caecal

→ Globalement, l'auteur confirme l'évolution du microbiote avec l'âge et notamment l'augmentation des Firmicutes, au détriment des Bactéroidetes

2^{ème} expé = EEL → Animaux, avec ou sans EEL, au sevrage (28-30j) ou à l'abattoir (60 et 75 j)

→ *Clostridium perfringens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* et *Akkermansia muciniphila*, seraient liés aux symptômes d'EEL

→ identification de protéines de hauts poids moléculaires : activité mucinase

3^{ème} expé → inoculation de 4 souches de *Bacteroides*, chez des lapereaux de 8 jours, directement dans l'estomac : **hypothèse probiotique**

→ Les lapins inoculés avec des souches de *Bacteroides* présenteraient, après sevrage des taux plus bas de *Bactéroides* que chez les témoins.

→ Effet sur l'expression des cytokines et sur la diversification des chaînes des immunoglobulines



« Journée Ombres et Lumières »

Pathologie et Hygiène

MERCI
pour votre ATTENTION