

Etude d'un nouveau syndrome du veau Charolais nouveau-né : les gastro-entérites paralysantes

II. ETUDE DES MARQUEURS DE VIRULENCE CS31A et COL V DES *ESCHERICHIA COLI* ISOLES DES FECES

par Michel CONTREPOIS*, Daniel BAROUX**, Hervé NAVETAT***,
Jacques ESPINASSE****, Alain CHEVALIER***, Charles-Albert HAMM***
et Jean-François CHAUVEAU*****

RÉSUMÉ

Un syndrome diarrhéique associé à des troubles nerveux (gastro-entérites paralysantes = GEP) a été décrit antérieurement chez des veaux Charolais d'environ 10 jours. L'étude comparative des colibacilles de la flore fécale de 15 veaux malades et de 9 veaux témoins en bonne santé, a montré que le syndrome GEP est significativement associé à la présence d'une flore fécale colibacillaire où dominant des *E. coli* pouvant coloniser fortement l'intestin (plasmides p CS31A, p col V, p K99). Une hypothèse étiopathogénique est proposée selon laquelle une bactériémie colibacillaire d'origine digestive avec endotoxémie pourrait expliquer certaines manifestations cliniques des GEP.

Mots clés : *Escherichia coli* - Veau - Gastro-entérites paralysantes - Marqueurs de virulence.

SUMMARY

A NEW SYNDROME OF THE CHAROLAIS NEONATAL CALF : PARALYSIS IN GASTROENTERITIS

II. Virulence markers CS31A and col V in *Escherichia coli* isolated from feces

A diarrheic syndrome associated with nervous troubles (paralysing gastroenteritis) was previously described in 10 days old Charolais calves. Comparative studies of *E. coli* from fecal flora of 15 ill calves and 9 control healthy calves indicated that PGE was significantly associated with

* Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Microbiologie, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand - 63122 St-Genès-Champagnelle (France).

** Laboratoire des Services Vétérinaires de l'Allier, B.P. 1625 - 03016 Moulins cedex (France).

*** GRDEPV, rue Victor-Hugo - 03130 Le Donjon (France).

**** Ecole Nationale Vétérinaire, Chemin des Capelles - 31076 Toulouse cedex (France).

***** Groupement Vétérinaire de Digoin - 71160 Digoin (France).

a dominating *E. coli* fecal flora able to highly colonize the gut (p CS31A, p col V or p K99 plasmids). An etiopathogenic hypothesis is proposed. *E. coli* bacteriemia with a digestive origin associated with endotoxemia could explain a part of clinical signs in PGE.

Key words : *Escherichia coli* - Calf - Paralysis in gastroenteritis - Virulence markers.

INTRODUCTION

Un syndrome diarrhéique associé à des symptômes nerveux généraux et locomoteurs a été décrit chez des veaux Charolais âgés de moins de 2 semaines [8]. Pour apprécier le rôle étiologique éventuel de *E. coli* pathogènes dans cette maladie nous avons recherché si les colibacilles de la flore fécale possédaient certaines caractéristiques associées au pouvoir septicémique. On a étudié principalement la protéine de surface CS31A [1] et la colicine V marqueurs du pouvoir pathogène des colibacilles septicémiques [11]. Des travaux réalisés au cours de l'hiver 1987-1988 avaient montré que des colibacilles CS31A⁺ étaient identifiés très fréquemment chez les veaux à GEP. Afin de préciser la portée de ce résultat, une étude complémentaire a été effectuée au cours de l'hiver 1988-1989 en comparant l'incidence des *E. coli* CS31A⁺ et col V⁺ dans la flore fécale des veaux présentant le syndrome GEP et dans celle des veaux du même âge apparemment en bonne santé dans les mêmes exploitations.

MATERIELS ET METHODES

Collecte des échantillons

Le syndrome diarrhéique associé à des troubles nerveux (GEP) est décrit chez des veaux d'un âge moyen de 9,38 ± 2,5 jours. Les symptômes nerveux sont observés avant ou après des épisodes de constipation et (ou) de diarrhée. Les animaux présentent des signes d'abattement avec hypoesthésie accompagnée de signes ataxiques ou parétiques surtout localisés aux membres postérieurs. Un œdème des paupières, des signes d'œdème laryngé, des lésions hémorragiques sont observés avec une fréquence décroissante [8].

Des veaux de moins de 15 jours présentant ce syndrome ont été sélectionnés par les vétérinaires praticiens. Lorsqu'un veau du même âge, mais apparemment en bonne santé était présent dans l'exploitation, il servait de témoin « veau sain ». Des prélèvements de matières fécales du veau malade et du veau témoin, ont été envoyés au Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires pour analyse. Dix souches *E. coli* de la flore colibacillaire dominante ont été isolées et adressées au Laboratoire de Microbiologie de l'INRA, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand.

Techniques microbiologiques

Pour l'étude électrophorétique de la membrane externe des colibacilles, les bactéries cultivées à 37° C sur milieu gélosé Minca [5]

sont récupérées à la surface de la gélose dans 2 ml de tampon PBS stérile. Après chauffage à 60° C pendant 20 min puis centrifugation, le surnageant est collecté puis conservé à — 20° C.

Pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 15 %, 7 µl du mélange à parties égales du surnageant et du tampon de Laemli [6] sont déposés dans les puits. Après migration puis coloration à l'argent [9] on peut visualiser principalement les bandes correspondant aux molécules de LPS (profil électrophorétique de chaque séro-groupe 0) ainsi que celles correspondant aux sous-unités constitutives de certains fimbriae (29Kd pour CS31A, 18,5Kd pour K99). Ces électrophorèses permettent de savoir si les 10 souches *E. coli* isolées des matières fécales d'un veau sont toutes identiques ou se répartissent en plusieurs groupes. L'identification immunologique des protéines de surface CS31A ou K99 est effectuée par une méthode immunodot avec un sérum de lapin spécifique anti-CS31A ou anti-K99 puis un sérum anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase.

Pour étudier la production de colicine V on utilise la méthode de la double couche [3]. Les bactéries cultivées en spot à la surface d'un milieu gélosé de Luria sont lysées par les vapeurs de chloroforme. On coule alors une gélose à 7 %/∞ ensemencée soit avec une souche *E. coli* sensible à toutes les colicines, soit avec une souche *E. coli* spécifiquement résistante à la colicine V. Une souche *E. coli* qui produit une colicine mais qui est sans effet sur un *E. coli* résistant à la colicine V produit une colicine V.

RESULTATS

Pour cette étude, 15 veaux à GEP et 9 veaux témoins ont été sélectionnés sur des critères cliniques.

Parmi les 15 veaux malades, 10 étaient colonisés par des colibacilles CS31A⁺ (chez 3 veaux, *E. coli* CS31A⁺ et col V⁺). Parmi les 5 autres veaux, 2 excrétaient des *E. coli* K99⁺ et les 3 derniers, des *E. coli* col V⁺ (tab. 1). Parmi les 9 veaux témoins, 3 étaient colonisés par des *E. coli* CS31A⁺ (dont 2 par des *E. coli* CS31A⁺ et col V⁺). Un autre veau hébergeait des *E. coli* col V⁺. Parmi les colibacilles isolés des 5 autres veaux témoins, aucun des 3 marqueurs CS31A, col V ou K99 n'a été identifié (tab. 1).

La différence n'est pas significative lorsqu'on compare, selon un test de Khi-2 corrigé, le nombre de veaux malades ou témoins excrétaient des *E. coli* CS31A⁺ (tab. 2). On atteint presque la limite de la signification statistique si on prend en compte les *E. coli* CS31A ou K99 (p < 0,06). Si on ajoute le marqueur col V, la différence devient nettement significative (p < 0,01).

Tableau 1

Présence ou absence des marqueurs (CS31A⁺, col V⁺), (CS31A, col V⁻), (CS31A⁻, col V⁺) ou K99 parmi dix souches *Escherichia coli* de la flore colibacillaire dominante de 15 veaux à GEP et 9 veaux témoins

Nombre de souches *E. coli*

	CS31A ⁺ , col V ⁺	CS31A ⁺ , col V ⁻	CS31A ⁻ , col V ⁺	CS31A ⁻ , col V ⁻	K99	Total
Veaux à GEP	1				10	10
	2		10			10
	3	3	7			10
	4			10		10
	5		1	9		10
	6		5 + 2*		3	10
	7		7		1 + 2	10
	8			7 + 3		10
	9	10				10
	10		7 + 3			10
	11		3		6 + 1	10
	12			9 + 1		10
	13		10			10
	14	1	9			10
	15					9 + 1
Veaux témoins	1	2		8		10
	2	8				10
	3		9		2	10
	4				1	10
	5				5 + 5	10
	6				6 + 4	10
	7				10	10
	8			10	9 + 1	10
	9				10	10

* Deux chiffres indiquent qu'il s'agit de deux groupes de souches *E. coli* différentes d'après le profil électrophorétique des extraits aqueux à 60° C.

Tableau 2

Comparaison des nombres de veaux malades ou sains excréant des colibacilles possédant des marqueurs de virulence

Marqueurs de virulence des <i>E. coli</i>	Veaux		Signification statistique (Khi-2 corrigé)
	malades	sains	
CS31A ⁺	10/15	3/9	non significatif
CS31A ⁺ ou K99 ⁺	12/15	3/9	(p<0,06)
CS31A ⁺ ou K99 ⁺ ou col V ⁺	15/15	4/9	(p<0,01)

DISCUSSION

Dans la première étude décrivant le syndrome GEP [8], les colibacilles CS31A⁺ étaient isolés fréquemment chez les veaux malades. Dans une seconde étude au cours de l'hiver 1987-1988, *E. coli* CS31A⁺ a été identifié chez 82,1 % des veaux à GEP (résultats non publiés).

Afin de préciser une possible relation étiologique entre les colibacilles CS31A et le syndrome GEP, une expérimentation plus fine incluant des veaux témoins a été réalisée au cours de l'hiver 1988-1989. Pour caractériser les colibacilles nous avons tenu compte des marqueurs CS31A et col V mais aussi de K99. En effet, nos études montrent que les gènes gouvernant la synthèse de CS31A sont portés par des plasmides [4]. Ces derniers augmentent la capacité des colibacilles à coloniser l'intestin des jeunes animaux (CONTREPOIS *et al.*, publication en cours). De la même façon H.W. SMITH [12] avait montré que le plasmide gouvernant la synthèse de la colicine V augmentait le pouvoir pathogène et la survie des colibacilles dans l'intestin. De même K99 dont le déterminisme génétique est plasmidique, est un facteur de colonisation de l'intestin des veaux [10]. Si les colibacilles K99⁺ sont habituellement non invasifs, il est possible que certains soient à la fois entérotoxiques et bactériémiques. Une forte colonisation de l'intestin par des colibacilles septicémiques pourrait être à l'origine d'une bactériémie colibacillaire d'origine digestive. Les colibacilles possédant l'un ou l'autre de ces 3 marqueurs pour l'aptitude des *E. coli* à coloniser l'intestin des veaux, sont présents chez tous les veaux à GEP. La différence est significative comparativement aux veaux témoins. La présence de colibacilles possédant les marqueurs de virulence chez quelques veaux témoins n'est pas anormale, dans la

mesure où ces animaux sont voisins des malades excréant des colibacilles CS31A⁺ ou col V⁺. Ainsi, dans les enquêtes concernant les diarrhées du veau nouveau-né, des *E. coli* K99⁺ sont parfois isolés dans la flore colibacillaire dominante des veaux apparemment sains [7]. Par ailleurs, on sait que la résistance du jeune veau aux infections colibacillaires est largement tributaire de l'immunité colostrale transmise par la mère [11]. Chez les veaux à GEP âgés d'environ 10 jours, les immunoglobulines sériques sont encore d'origine colostrale. Selon que la gamma-globulinémie est élevée ou faible, la résistance des animaux sera plus ou moins grande. Il est possible que des veaux ayant une gamma-globulinémie correcte ne soient pas affectés par une forte colonisation intestinale par des *E. coli* CS31A⁺ ou col V⁺ et que les veaux malades soient prédisposés aux infections par un état hypo-gamma-globulinémique. La mesure des immunoglobulines sériques permettrait sans doute de mieux définir l'étiologie des GEP.

En conclusion, les résultats de cette enquête confortent l'hypothèse selon laquelle certains clones de colibacilles ayant des caractéristiques leur permettant de coloniser fortement l'intestin, pourraient être responsables d'une bactériémie colibacillaire d'origine digestive avec endotoxémie. Une endotoxémie subaiguë pourrait peut-être expliquer les manifestations cliniques des entérites paralysantes. Le dosage des endotoxines dans le sang des veaux malades permettrait de vérifier cette hypothèse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CONTREPOIS (M.), DUBOURGUIER (H. C.), PARODI (A. L.), GIRARDEAU (J. P.), OLLIER (J. L.). — *Vét. Microbiol.*, 1986, 12, 109-118.
- [2] DER VARTANIAN (M.). — *Infect. Immun.*, 1988, 56, 413-418.
- [3] FREDERICQ (P.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 107, 7-17.
- [4] GIRARDEAU (J. P.), DER VARTANIAN (M.), OLLIER (J. L.), CONTREPOIS (M.). — *Infect. Immun.*, 1988, 56, 2180-2188.
- [5] GUINÉE (P. A. M.), MOOI (F. R.), AGTERBERG (C. M.). — *Infect. Immun.*, 1976, 13, 1369-1377.
- [6] LAEMLI (U. K.). — *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- [7] MARTEL (J. L.), CONTREPOIS (M.), DUBOURGUIER (H. C.), GIRARDEAU (J. P.), GOUET (Ph.), BORDAS (C.), HAYERS (F.), QUILLERET-ÉLIEZ (A.), RAMISSE (J.), SENDRAL (R.). — *Ann. Rech. Vét.*, 1981, 12, 253-257.
- [8] NAVETAT (H.), ESPINASSE (J.), BLANC (F.), POULET (B.). — *Bull. Acad. Vét. de France*, 1989, 62, 337-344.
- [9] OAKLEY (B. R.), KIRSCH (D. R.), MARRIS (N. R.). — *Anal. Biochem.*, 1980, 105, 361-363.
- [10] ORSKOV (I.), ORSKOV (F.), SMITH (H. W.). — *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 1975, 83, 31-36.
- [11] SMITH (H. W.), HALLS (S.). — *J. Microbiol.*, 1968, 1, 61-72.
- [12] SMITH (H. W.), HUGGINS (B.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1976, 92, 335-350.