

*Bull. Acad. Vét. de France*, 1988, 61, 365-375

## **Infection expérimentale du veau par le colibacille K 99<sup>+</sup> : effet protecteur de la smectite (1)**

par H. NAVETAT\*, M.Th. DROY\*\* et J. ESPINASSE\*\*\*

---

### **RÉSUMÉ**

Chez les veaux nouveau-nés, l'infection colibacillaire est responsable de gastro-entérite. Douze heures après l'inoculation d'une souche d'E. coli entérotoxigène apparaît la diarrhée puis la déshydratation. L'observation ultrastructurale en microscopie électronique à balayage confirme l'effet pathogène du colibacille qui se manifeste par un allongement des villosités intestinales et une altération des entérocytes.

Si les veaux reçoivent en même temps que l'inoculum de la smectite à la dose de 500 mg/kg/4 jours, les signes diarrhéiques sont réduits et sans déshydratation.

Ces résultats sont confirmés par les mesures de concentrations plasmatiques des ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, et de l'acide lactique. Par ailleurs, d'un point de vue ultrastructural, les villosités intestinales gardent un aspect normal.

En conclusion, la smectite, argile colloïdale, par ses propriétés d'adsorption du colibacille et ses effets sur le mucus protège la muqueuse iléale des effets pathogènes des colibacilles entérotoxigènes.

*Mots clés* : Veau - Gastroentérite - Colibacille - Cytoprotection - Smectite.

### **SUMMARY**

#### **E. COLI K99<sup>+</sup> INFECTION IN CALVES : PROTECTIVE EFFECT OF SMECTITE**

In new-born calves, E. coli infection causes gastroenteritis. Twelve hours after inoculation of an enterotoxinogenic strain of E. coli diarrhea occurs fol-

---

(1) Conférence prononcée au XV<sup>e</sup> Congrès Mondial de Buiatrie, octobre 1988, Palma de Mallorca (Espagne).

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

\*\* Docteur en Médecine, Institut Henri Beaufour, 92350 Le Plessis-Robinson (France).

\*\*\* Ecole Nationale Vétérinaire, 31076 Toulouse (France).

lowed by dehydration. Ultrastructural observation under electron microscopy confirms the pathogenic effect of *E. coli* which is shown as the elongation of the intestinal villi and damage of the enterocytes.

If calves receive smectite at a dose of 500 mg/kg/4 days, at the same time as the inoculum, the signs of diarrhea are reduced and dehydration does not occur.

These results are confirmed by determinations of plasma concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ions and of lactic. Furthermore, from the ultrastructural viewpoint the intestinal villi retain their normal appearance.

To conclude, smectite, a colloidal clays, as a result of its absorption of *E. coli* and its effects on the mucus, protects the ileal mucosa from the pathogenic effects of enterotoxinogenic *E. coli*.

*Key words* : Calf - Gastroenteritis - Colibacille - Cytoprotection - Smectite.

## INTRODUCTION

La thérapeutique princeps des affections gastro-entériques colibacillaires du veau est basée sur l'antibiothérapie, mais l'apparition et la fréquence des souches résistantes aux antibiotiques obligent le thérapeute à s'orienter vers d'autres thérapeutiques. C'est pourquoi la réhydratation orale et les médications antidiarrhéiques prennent de plus en plus d'importance dans l'arsenal thérapeutique. L'effet protecteur obtenu avec la smectite dans le traitement des gastro-entérites à rotavirus [5, 8, 9] a orienté nos investigations dans les affections diarrhéiques d'origine colibacillaire.

La reproduction expérimentale de la maladie peut constituer non seulement une source d'étude de la maladie elle-même, mais aussi un moyen de contrôle rigoureux des mesures prophylactiques ou thérapeutiques spécifiques ou symptomatiques.

Le but de ce travail est de rechercher l'effet de la smectite dans le traitement des gastro-entérites du veau, après infection par un colibacille entérotoxigène porteur du facteur d'attachement K99.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. LA SMECTITE

La smectite est un silicate d'alumine hydraté de structure phylliteuse. Cette argile se présente sous forme de poudre constituée de particules de 1 à 3  $\mu$ . Chaque feuillet est composé de deux couches de tétraèdres de silice entourant une couche d'octaèdres d'alumine.

La smectite est dotée d'une série de propriétés pharmacologiques justifiant son emploi dans les gastro-entérites :

— pouvoir d'adsorption couvrant et d'adhésion au mucus gastro-intestinal par interaction entre les particules d'argiles et les glycoprotéines du mucus ;

— pouvoir améliorateur de la qualité du mucus mesuré par une augmentation de sa filance ;

— pouvoir protecteur vis-à-vis des sels biliaires (détergents pour le mucus gastrique), de l'alcool (action nécrotique sur l'estomac), des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des stress (facteurs d'ulcères gastriques) ;

— pouvoir protecteur vis-à-vis du ou des micro-organismes pathogènes de l'intestin : virus (*Rotavirus*), bactéries (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*).

## 2. LES ANIMAUX

L'étude a porté sur 2 groupes de 5 veaux frisons d'un poids moyen de 45 kg. A la naissance, les veaux sont privés de colostrum et est inoculée dans les heures qui suivent une souche d'*Escherichia coli* porteur de facteur d'attachement K99, de référence internationale : E. COLI B44 09 K30 H<sup>-</sup>K99<sup>+</sup> F 41. Chaque inoculum contient environ  $2.10^{10}$  à  $5.10^{10}$  germes.

Le premier groupe : les veaux A, C, F, I, J servent de témoins.

Le deuxième groupe : les veaux B, D, E, G, H reçoivent en plus de la smectite à la dose de 500 mg/kg de poids vif en deux prises journalières pendant 4 jours consécutifs.

Tout au long de l'étude, les veaux reçoivent du lait provenant de vaches non vaccinées contre E. COLI K99<sup>+</sup>.

Les veaux sont observés de J1 à J4 matin et soir. Chaque veau fait l'objet d'un suivi clinique avec une notation des symptômes (1 à 3) à laquelle nous appliquons un coefficient qui permet d'obtenir une note moyenne globale.

Sont envisagés successivement :

- Le refus alimentaire (coefficient 2)

- 1 Absent

- 2 Partiel

- 3 Total

- La consistance des fécès (coefficient 3)

- 1 Normale

- 3 Ramollie

- 3 Liquide

● Le degré de déshydratation —d— (coefficient 3)

1  $d < 2,5 \%$

2  $2,5 \% < d < 5 \%$

3  $d > 5 \%$

La note moyenne globale (NMG) est obtenue en divisant le total des notes par 8 (=  $\Sigma$  des coefficients). Cette NMG permet de déterminer la sévérité de l'affection.

N M G = 1 veau sain ou guéri

N M G = 1,1 à 2 affection moyenne

N M G = 2,1 à 2,9 affection grave

N M G = 3 affection sévère

Les veaux ne reçoivent aucune thérapeutique, ni anti-infectieuse, ni réhydratante.

Des prélèvements de fécès sont effectués avant l'inoculation et tous les jours pendant 4 jours, afin de rechercher *E. coli* K99<sup>+</sup>.

Après sacrifice des veaux à J4 ou mort naturelle avant J4, des prélèvements de muqueuse iléale sont effectués et fixés dans du liquide de Trump pour la microscopie électronique à balayage.

Des prélèvements sanguins sont effectués quotidiennement afin d'effectuer le dosage du glucose, du lactate, de l'alanine, du glutamate, de l'urée, du sodium, du potassium, du magnésium et du calcium.

## RESULTATS

### 1. OBSERVATION CLINIQUE

Les résultats cliniques sont rapportés dans les tableaux 1 - 2 et les figures 1 - 2.

Dans le groupe I (témoin) la diarrhée s'accompagne très vite d'un état de déshydratation (NMG > 2).

Deux veaux meurent l'un à 48 heures, l'autre à 72 heures après l'inoculation, après une déshydratation sévère. 2 veaux sur 3 sont très malades (NMG > 2). Notons qu'un veau témoin a présenté quelques signes diarrhéiques à 36 heures.

Dans le groupe II (traité), la diarrhée ne s'accompagne pas de déshydratation (4 veaux sur 5). Les signes diarrhéiques régressent à partir de la 60<sup>e</sup> heure pour disparaître à partir de la 72<sup>e</sup> heure. Notons cependant qu'un veau est mort à 48 heures (veau D).

Les veaux F et D sont morts à 48 heures, or ces deux veaux étaient porteurs à la naissance d'un *E. coli* K99<sup>+</sup> (souche hétérologue). Le fait

OBSERVATIONS	t - to	T/S	J1	J2	J3	J4
A	12 H	T	1 1 1	1 3 1	1 1 1	1 1 1
			1 1 1	1 3 1	1 1 1	1 1 1
C	1 H	T	1 1 1	1 3 1	3 3 3	
			1 1 1	3 3 2	3 3 3	
F	4 H	T	1 1 1	2 3 2		
			1 1 1	3 3 3		
I	2 H	T		1 3 1	2 3 1	2 3 2
			1 1 1	1 3 1	1 3 1	3 3 3
J	8 H	T		1 3 1	2 3 1	2 3 1
			1 1 1	1 3 1	2 3 1	2 3 2
B	12 H	S	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
			1 1 1	1 2 1	1 1 1	1 1 1
D	10 H	S		3 3 3		
			1 1 1	3 3 3		
E	10 H	S	1 1 1	1 3 1	1 1 1	1 1 1
			1 1 1	1 3 1	1 1 1	1 1 1
G	1 H	S	1 1 1	1 3 1	2 3 1	1 1 1
			1 1 1	1 3 1	1 3 1	1 1 1
H	4 H	S	1 1 1	1 3 1	2 3 1	1 1 1
			1 1 1	1 3 1	1 3 1	1 1 1

TABLEAU 1 — Notation des symptômes

TABLEAU 2 — Note moyenne générale

OBSERVATIONS	T/S	J1	J2	J3	J4
A	T	1	1,75	1	1
		1	1,37	1	1
C	T	1	1,75	3	
		1	2,62	3	
F	T	1	2,37		
		1	3		
I	T	1	1,75	2	2,37
			1,75	1,75	3
J	T		1,75	2	2
		1	1,75	2	2,37
B	S	1	1	1	1
		1	1,37	1	1
D	S		3		
		1	3		
E	S	1	1,75	1	1
		1	1,75	1	1
G	S	1	1,75	2	1
		1	1,75	1,75	1
H	S	1	1,75	2	1
		1	1,75	1,75	1

T = Témoin.

S = Traité Smectite.

t — to = délai écoulé entre la naissance et l'inoculation.

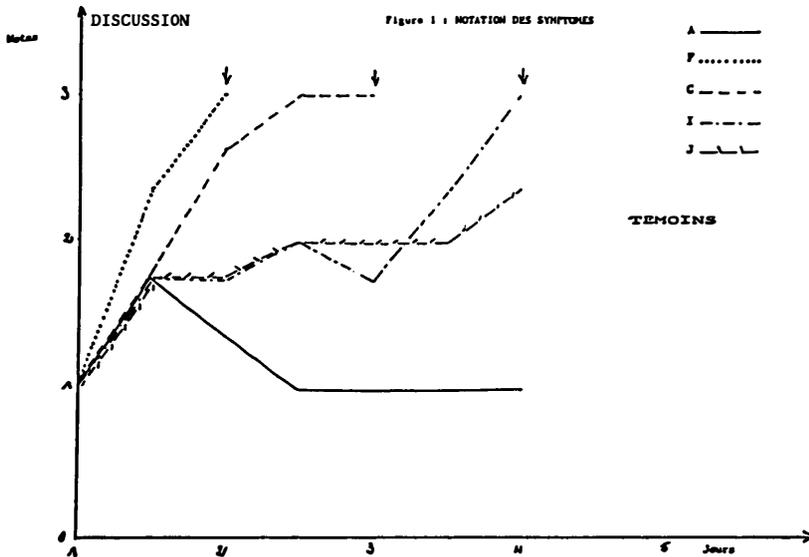


Figure 1  
Notation des symptômes

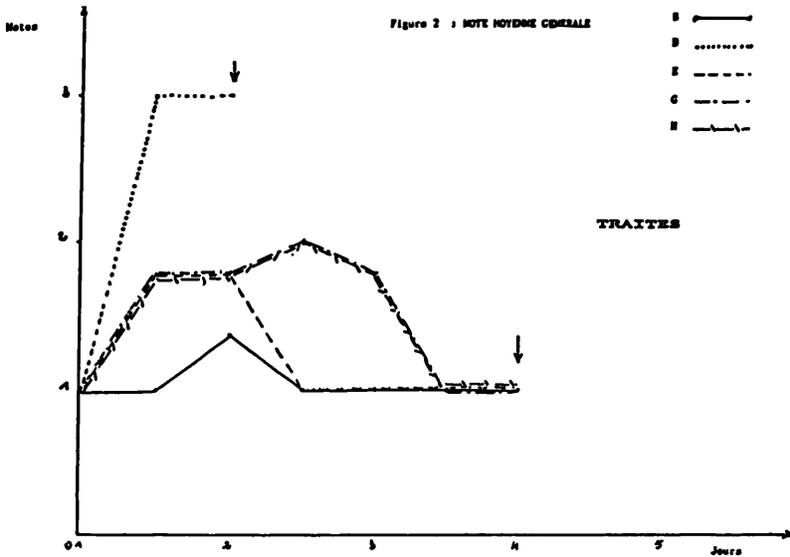


Figure 2  
Note moyenne générale

d'inoculer ces veaux avec une souche hétérologue a peut-être potentialisé l'effet des *E. coli* K99<sup>+</sup> présents et explique ces deux morts brutales avec déshydratation sévère.

## 2. RÉSULTATS BACTÉRIOLOGIQUES (tableau 3)

L'examen des fécès de J1 à J4 a permis de mettre en évidence la présence de *E. coli* K99<sup>+</sup> et montre que l'excrétion de *E. coli* K99 accompagne les signes diarrhéiques.

Seuls 2 veaux (A et B) n'excrètent pas de *E. coli* K99<sup>+</sup> ; ce sont précisément ces mêmes veaux qui ont eu un épisode diarrhéique transitoire.

## 3. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE À BALAYAGE

L'examen ultra-structural en microscopie à balayage de la muqueuse iléale montre, dans les jours qui suivent l'inoculation, quelques modifications de l'organisation des villosités intestinales.

Dans le groupe témoin, nous notons une désorganisation et un allongement des villosités, témoignant d'une agression intense. Quelques entérocytes présentent une dégénérescence avancée et leurs microvillosités

TABLEAU 3 — Résultats bactériologiques

ANX \ JOURS	0	1	2	3	4 *
A	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-
C	-	-	+	-	-
D	+	+	-	-	-
E	-	-	+	+	+
F	+	+	-	-	-
G	-	+	+	+	+
H	-	-	+	+	+
I	-	+	+	+	+
J	-	+	+	+	+

Résultats : Escherichia coli K99 Positif « + »

Escherichia coli K99 Négatif « — »

\* Différence non significative.

sont desquamées ou boursoufflées avec parfois disparition du glycocalyx. Il faut noter également une décharge massive du mucus.

Dans l'infection colibacillaire, la diarrhée n'est donc pas le résultat de lésions majeures de la structure de la muqueuse intestinale. Elle est essentiellement due à l'action de l'entérotoxine thermostable, potentialisée par la capacité d'attachement des E. coli entérotoxigènes.

L'activité hypersécrétoire de l'intestin et sa décharge massive de mucus sont sans doute à relier aux endotoxines libérées lors de la prolifération bactérienne intensive [6, 7].

L'administration de smectite à la dose de 500 mg/kg/jour pendant 4 jours protège la muqueuse iléale de l'infection colibacillaire. Les villosités gardent un aspect normal.

#### 4. RÉSULTATS DES ANALYSES PLASMATIQUES (tableau 4)

Les résultats des concentrations plasmatiques en glucose, lactate, alanine, glutamate, urée, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup> laissent apparaître des variations par rapport aux valeurs normales obtenues chez des veaux sains de même âge [2].

L'inoculation avec une dose d'E. coli entérotoxigène d'environ 2 à 5.10<sup>10</sup> germes provoque chez les jeunes veaux une perte d'appétit marquée, l'émission intense de fécès très liquides 12 à 24 heures après l'inoculation et une déshydratation sévère. Ces résultats confirment ceux obtenus chez le veau par d'autres auteurs [6, 7]. Cependant, entre les deux groupes, traité et témoin, il n'y a pas de différence significative sur le plan clinique, due vraisemblablement au nombre limité d'animaux dans chaque lot expérimental. Il n'en reste pas moins vrai que dans le lot traité avec la smectite 4 veaux sur 5 guérissent de la diarrhée sans autre thérapeutique et ne présentent aucun signe de déshydratation clinique au bout de 4 jours.

TABLEAU 4 — Résultats des concentrations plasmatiques moyennes

Exprimées en mmol/l	GLUCOSE	LACTATE	ALANINE	GLUTAMATE	UREE	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>
Valeurs normales veaux âgés -8 jours	5,42	1,27	0,36	0,2	1,93	139	4,8	0,63	2,5
Moyenne A I J -à J0	4,43	4,45	0,46	0,49	6,62	134,66	4,21	0,8	2,67
à J1	4,39	2,64	0,42	0,48	4,75	121	4,64	0,61	2,13
à J2	4,77	1,82	0,36	0,52	5,70	122	5	0,75	2,54
à J3	5,05	2,54	0,49	0,94	11,83	117,66	5,21	0,86	2,51
à J4	4,69	1,71	0,38	0,66	17,29	119,66	4,76	1,05	2,67
Moyenne générale A I J -184 jours-	4,66	2,63	0,42	0,61	9,23	122,99	4,76	0,81	2,50
Moyenne BECM -à J0	4,18	3,58	0,39	0,35	5,82	127	4,51	0,69	2,47
à J1	4,60	2,00	0,32	0,41	3,95	129,5	5,15	0,70	2,41
à J2	3,85	1,70	0,31	0,51	3,72	132	4,77	0,67	2,56
à J3	3,65	1,49	0,30	0,44	4,00	132,5	4,50	0,66	2,50
à J4	3,90	1,18	0,27	0,47	6,43	130	4,17	0,67	2,42
Moyenne générale B E C H -184 jours-	4,03	2,00	0,31	0,43	4,78	130,2	4,62	0,67	2,47
Test de Student	P <0,01	NS	NS	P <0,05	NS	P <0,05	NS	P <0,05	NS

L'examen morphologique des lésions en microscopie électronique à balayage confirme le caractère pathogène de l'inoculum d'E. coli entérotoxinogène administré par voie orale. L'effet se traduit par un allongement des villosités et une légère desquamation épithéliale de certains sommets villositaires.

Un traitement quotidien de 4 jours par la smectite à la dose de 500 mg/kg protège la muqueuse iléale des effets pathogènes d'une souche d'E. coli. Les villosités gardent un aspect proche de celui de veaux sains. L'effet de la smectite sur le colibacille pourrait s'expliquer d'une part par ses propriétés d'absorption, d'autre part, par son effet sur le mucus.

La smectite en interagissant avec les glycoprotéines du mucus [1] augmente la filance [3] paramètre réologique, reflet de la polymérisation des glycoprotéines [10].

Cet effet de la smectite sur la qualité du mucus renforce la première ligne de défense de la barrière muqueuse intestinale aux agresseurs par exemple d'une souche d'E. coli. La toxine et les enzymes mucolytiques sont partiellement adsorbés par la smectite qui favorise l'absorption hydrique au niveau de la muqueuse iléale et s'oppose à l'excrétion aqueuse et à la fuite du sodium induite par E. coli [11, 12]. En effet, dans notre observation les veaux traités par la smectite (4 sur 5) n'ont pas tendance à se déshydrater (fig. 2, 1 ; tableau 4).

Par contre, l'administration de smectite ne permet pas de réduire l'excrétion d'E. coli dans les fèces des veaux atteints de gastro-entérites (tableau 3).

La smectite par sa capacité d'adsorption du colibacille et son effet sur la qualité du mucus, réduit, si elle est administrée en même temps que l'inoculum, les effets pathogènes du colibacille.

### CONCLUSION

L'effet protecteur obtenu avec la smectite dans les infections colibacillaires confirme les observations faites sur le terrain [5, 8, 9]. L'utilisation d'un agent cytoprotecteur permet de mieux contrôler la thérapeutique des gastro-entérites néonatales colibacillaires. A la suite des acquisitions récentes sur l'importance de la barrière muqueuse gastro-intestinale et sa cytoprotection les argiles colloïdales telles que la smectite méritent un intérêt tous les jours croissant.

### REMERCIEMENTS

*Nous remercions le laboratoire de microbiologie de l'I.N.R.A. de Theix qui nous a aimablement fourni l'inoculum d'E. coli ainsi que le laboratoire des maladies métaboliques de l'I.N.R.A. de Theix qui a réalisé les aminogrammes et les ionogrammes. Nous remercions également le Dr HENRY de sa collaboration.*

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALLEN (L.), LEONARD (A.). — Mucus Structure. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1985, n° 12 bis, 9-12.
- [2] DEMIGNE (C.), REMESY (C.), CHARTIER (F.), GARPIHAN (G.). — Intérêt de l'utilisation de réhydratants par voie orale et veineuse dans le traitement des diarrhées néonatales. *Bull. Tech. CRZV Theix INRA*, 1981 (46), 21-30.
- [3] DROY (M.Th.), DROUET (Y.), GERAND (G.), SCHATZ (B.). — La filance ; *Entérol. Clin. Biol.*, 1985, 9, n° 12 bis, 119-121.
- [4] DROY (M.Th.). — Pharmacologie de la smectite. In *Barrière muqueuse gastro-intestinale et cytoprotection*, G.R.D.E.P.V., Société Française de Buiatrie, Paris, 1986, 117-145.
- [5] ESPINASSE (J.), NAVETAT (H.), DROY (M.Th.). — Traitement et prévention des diarrhées des jeunes veaux à l'aide d'un agent de cytoprotection de la muqueuse intestinale : la smectite. *Bull. Soc. Vét. Prat.*, avril 1987, t. 71, n° 4, p. 237.
- [6] GOUET (Ph.), CONTREPOIS (M.), DUBOURGHIER (H.C.), RIOU (Y.), SCHERRER (R.), LAPORTE (J.), VAUTHEROT (J.F.), COHEN (J.), I'HARRIDON (R.). — The experimental protection of diarrhea in axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic E. Coli, rotavirus, coronavirus, and in combined infection of rotavirus and E. Coli. *Ann. Rech. Vet.*, 1978, 3, 420-430.
- [7] MANDARD (O.), DUBOURGHIER (H.C.), CONTREPOIS (M.), GOUET (Ph.). — Modification de la structure intestinale lors de l'infection simultanée à rotavirus et E. coli entéropathogènes. Société Française de Buiatrie, octobre 1979, 81-91.

- 
- [8] NAVETAT (H.), DROY (M.Th.), ESPINASSE (J.). — Effet de la smectite dans le traitement des gastro-entérites du veau en élevage allaitant. In *Barrière muqueuse gastro-intestinale et cytoprotection*, G.R.D.E.P.V., Société Française de Buiatrie, Paris, 1986. p. 147-154.
- [9] NAVETAT (H.), DROY (M.Th.), ESPINASSE (J.), PARODI (A.). — Infection par le rotavirus chez le veau : effet protecteur de la smectite. *Bull. Acad. Vét. de France*, 1988, 60, 55-61.
- [10] PUCHELLE (E.), ZAHM (J.M.), DUVIVIER (C.). — Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucus transport properties. *Biorehology.*, 1983, 30, 239-249.
- [11] RATEAU (J.G.), BRAYAC (M.), MORGANT (G.), AYMARD (P.), PARIER (J.L.). — Infectious diarrhoeas weakening of mucosa protection in rabbit ileal loops by a pathogenic *Escherichia Coli*. *Current Medical Research and opinow*, 1982, n° 4, 224-232.
- [12] RATEAU (J.G.), MORGANT (G.), DROY (M.Th.), PARIER (J.L.). — A histological, enzymatic and water electrolyte study of the action of smectite, a micro protective elay, on experimental infections diarrhoea in the rabbit. *Current Medical Research and opinion*, 1982, 8, n° 4, 233-241
-