

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE D'INFECTION REPRODUCTIBLE D'ENTEROCOCCUS CECORUM CHEZ LE POULET DE CHAIR

Paul Remiot †, Paul Henri Potier*, Pierre Yves Moalic§, Samuel Roulleau†, Frédéric Bourgeon§, Elodie Barbier† and Pascale Rigomier*

† MG2MIX, ZA la Basse Haye, 35220 Chateaubourg, France ;

* Chêne Vert, Rue Auguste Perret, 29400 Landivisiau, France ;

§ Bio Chêne Vert, Rue Blaise Pascal, 35220 Chateaubourg, France

p.remiot@mg2mix.fr

RÉSUMÉ : *Enterococcus cecorum* est un pathogène prédominant chez le poulet de chair à croissance rapide. Cette bactérie entraîne des boiteries chez le poulet de chair, avec un impact significatif sur le bien-être animal et les performances zootechniques, conduisant à des pertes économiques. L'objectif de cette étude était d'évaluer cinq souches d'*E. cecorum* isolées à partir de lésions cliniques et d'établir un modèle d'infection reproductible et répétable chez le poulet de chair. Un premier essai a été conduit sur 1 536 poussins répartis de manière aléatoire en 6 groupes, chacun répliqué 4 fois par lots de 64 animaux dans un bâtiment d'élevage standardisé. Le premier jour J0, 5 groupes ont été inoculés par voie intra-jabot avec une souche distincte d'*E. cecorum* à une dose identique, tandis que le groupe témoin recevait de l'eau stérile. La colonisation intestinale a été suivie par PCR sur écouvillons cloacaux (à J7). Les signes cliniques (boiteries, mortalités) ont été relevés aux jours 21 et 34 et des autopsies ciblées ont permis de comparer les souches isolées aux souches inoculées par MALDI-TOF. Après l'inoculation, 2 groupes ont validé les critères de sélection et reproduit la maladie de manière répétable. La dynamique de l'infection différait : une souche a provoqué des signes cliniques plus précoces (≈20 % de boiterie à J21). La reproductibilité de cette souche a été confirmée par un deuxième essai avec le même protocole. Pour les 3 autres groupes, la colonisation intestinale inconstante à J7 et les discordances entre les souches inoculées et réisolées les ont écartés de la sélection. Ce modèle d'infection avec la souche choisie reproduit un épisode clinique similaire à ce qui peut être observé en élevage commercial. Cet outil pourrait permettre de tester des solutions alternatives pour prévenir les signes cliniques liés à la présence d'*E. cecorum* et réduire le recours aux traitements antibiotiques.

ABSTRACT: *Enterococcus cecorum* is a predominant pathogen in fast-growing broiler chickens. This bacterium causes lameness in broiler, with a significant impact on animal welfare, zootechnical performance and lead to economic losses. The objective of this study was to evaluate five strains of *E. cecorum* isolated from clinical lesions and to establish a reproducible and repeatable infection model in broilers. An initial trial was conducted on 1,536 chicks randomly divided into 6 groups; each replicated 4 times in batches of 64 animals in a standardised rearing building. On the first day D0, 5 groups were inoculated intra-cervically with a distinct strain of *E. cecorum* at an identical dose, while the control group received sterile water. Intestinal colonisation was monitored by PCR on cloacal swabs (at D7). Clinical signs (lameness, mortality) were recorded on days 21 and 34, and targeted autopsies were performed to compare the isolated strains with the inoculated strains using MALDI-TOF. After inoculation, two groups validated the selection criteria and reproduced the disease in a repeatable manner. The dynamics of the infection differed: one strain caused earlier clinical signs (≈20% lameness on day 21). The reproducibility of this strain was confirmed by a second trial using the same protocol. For the other three groups, inconsistent intestinal colonization on day 7 and discrepancies between the inoculated and re-isolated strains led to their exclusion from the selection. This infection model with the selected strain reproduces a clinical episode similar to that observed in commercial farming. This tool could be used to test alternative solutions to prevent clinical signs linked to the presence of *E. cecorum* and reduce the use of antibiotic treatments.

Key words: *Enterococcus cecorum*, infection model, farm conditions, broiler, lameness

INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, *Enterococcus cecorum* (EC) est reconnu comme un pathogène émergent majeur chez le poulet de chair à croissance rapide. Il est associé à des lésions septicémiques telle que la péricardite ou locomotrices telles que l'arthrite, la chondronécrose avec ostéomyélite fémorale et la spondylarthrite (Wideman, 2016 ; Jung et al., 2018). Ces lésions entraînent une paralysie partielle ou totale, provoquant une incapacité à se déplacer, à s'hydrater et à s'alimenter correctement, mènent à la mort du poulet. Au-delà de la question du bien-être des animaux et des éleveurs, l'EC est également un problème économique. A l'échelle du lot, une infection engendre une augmentation de l'indice de consommation (IC), de la mortalité, du tri effectué par l'éleveur ainsi que le coût du traitement antibiotique. Aujourd'hui, les mesures de contrôle reposent encore largement sur l'usage d'antibiotiques, ce qui soulève la problématique croissante de l'antibiorésistance. De plus, les EC sont naturellement porteurs de nombreux gènes de résistance aux antimicrobiens et constituent donc des réservoirs potentiels pour leur dissémination (Jung et al., 2018).

Le développement de solutions alternatives exige la mise au point d'un modèle expérimental robuste, capable de reproduire de manière fiable l'infection dans des conditions proches de l'élevage commercial. L'objectif de cette étude était d'évaluer cinq souches d'*E. cecorum* isolées à partir de lésions cliniques et d'établir un modèle d'infection répétable et reproductible chez le poulet de chair à croissance rapide.

1. MATERIELS ET METHODES

Deux essais ont été menés en 2024 et en 2025 au sein d'un bâtiment d'élevage standardisé de la ferme de recherches zootechniques de MG2MIX (Domalain, France). Les procédures expérimentales ont été autorisées par le ministère français de la Recherche sous le numéro d'accord 47126-2024012916592084 et menées conformément à la directive 2010/63/UE de l'Union européenne, après examen par le comité d'éthique local (CREEA, « Comité Rennais d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale »).

1.1. Essai préliminaire : choix de la souche d'EC

Lors du premier essai, 1 536 poussins mâles d'un jour (Ross 308, Aviagen) provenant d'un seul troupeau de parentaux d'un couvoir commercial, ont été répartis au hasard en 6 groupes après pesée. Cinq groupes (A, B, C, D, E) ont été répartis dans la zone infectée en 4 répétitions de 64 oiseaux par case, et 1 groupe témoin (T) dans la zone non infectée, réparti en 4 répétitions de 64 oiseaux par case (Figure 1). Après la mise en place, 5 souches distinctes d'EC ont été inoculées à dose identique de manière individuelle par voie intra-jabot, chacune à un groupe différent, tandis que le

groupe témoin recevait la même quantité d'eau stérile. Le bâtiment était physiquement séparé en deux zones distinctes : une zone infectée (groupes A, B, C, D, E) et une zone non-infectée (groupe T). Dans la zone infectée, chaque groupe de 4 cases était séparé des autres par une allée d'un mètre. Des mesures strictes de biosécurité ont été appliquées, chaque groupe disposait de son propre matériel (combinaison, surbottes, pince de ramassage des morts, gants, désinfectant).

1.2. Essai de confirmation : inoculation d'une souche d'EC

Lors d'un second essai en 2025, 416 poussins de chair d'un jour (Ross 308, Aviagen) provenant d'un autre troupeau parental d'un autre couvoir commercial ont été répartis au hasard dans 8 cases de 52 oiseaux dans le même bâtiment d'élevage. Après la mise en place, la souche d'EC ayant été choisie à l'issue de l'essai préliminaire, a été inoculée à l'ensemble des poussins de l'essai, de manière individuelle par voie intra-jabot.

1.3. Management du lot

Dans les deux essais, les oiseaux ont été élevés sur une litière de copeaux de bois et avaient accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Chaque case était équipée à l'identique : une mangeoire à remplissage manuel et six pointeaux d'abreuvement. Les conditions d'élevage ainsi que le programme d'alimentation étaient conformes aux standards proposés par Aviagen pour le poulet de chair Ross 308. Le jour de leur arrivée, les oiseaux ont bénéficié de 24 heures de lumière. Chaque jour, une heure de nuit a été ajoutée pour atteindre 6 heures en une seule période au sixième jour et jusqu'au jour de l'abattage. Les oiseaux ont été vaccinés *in ovo* contre la bursite infectieuse le 18^e jour avec le Vaxxitek (Boehringer Ingelheim International GmbH, Allemagne) et contre la bronchite infectieuse à l'âge d'un jour par pulvérisation de Nobilis IB 4/91 (MSD Animal Health, États-Unis) et Nobilis MA5 (MSD Animal Health, États-Unis) au couvoir.

1.4. Identification des souches et comparaison MALDI TOF

Au 21^{ème} et au 31^{ème} (pour l'essai préliminaire) ou 34^{ème} (pour l'essai de confirmation) jours d'âge, les oiseaux gravement atteints ont été euthanasiés. Des autopsies ont été réalisées sur ces individus et des souches d'EC ont été isolées de différents organes (fémur, vertèbres, cœur, foie, rate, ...) via des écouvillons stériles. Ces écouvillons ont ensuite permis d'inoculer une gélose Columbia colistine-acide nalidixique (ANC) (Bio-Rad, États-Unis). La gélose ANC a été incubée à 37 °C pendant 24 heures dans des conditions micro-aérophiles. Après incubation, les plaques ont été examinées afin d'identifier les colonies présentant la morphologie caractéristique de l'EC. Pour celles-ci, des sous-

cultures pures ont été produites sur gélose ANC et incubées pendant 24 heures supplémentaires. Les colonies ont ensuite été envoyées à la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour confirmation de l'identification de l'EC. Après conservation à -18 °C, les souches ont été réactivées sur gélose ANC. Elles ont ensuite été soumises à un protocole de préparation des échantillons par extraction à l'éthanol/acide formique avant analyse par spectrométrie de masse. Le typage MALDI a été basé sur la détection différentielle de biomarqueurs protéiques à l'aide du logiciel ClinProTools (Bruker). Cette approche a permis une analyse discriminante des empreintes moléculaires et la différenciation des souches par la détermination des types MALDI, en fonction de la distribution des biomarqueurs protéiques spécifiques. Afin de confirmer l'identité des souches isolées à partir des lésions, une comparaison a été effectuée entre les empreintes moléculaires de la souche isolée et celles inoculées.

1.5. Suivi de l'inoculation

La colonisation intestinale par EC a été suivie par PCR sur écouvillons cloacaux prélevés sur 10 oiseaux à J7. Les échantillons étaient conservés à 4°C et transférés au laboratoire vétérinaire de Bio Chêne Vert pour des analyses PCR. L'ADN a pu être isolé à partir d'écouvillons cloacaux à l'aide d'Adiaprep (Bio-X Diagnostics, Belgique) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN a été élué dans 200 µl d'eau pure et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse. L'amplification et la détection de l'ADN de l'EC ont été réalisées à l'aide d'amorces et de sondes spécifiques, comme décrit par Jung *et al.* (2017).

1.6. Performances zootechniques et boiterie

Au 21^{ème} et au 31^{ème} (pour l'essai préliminaire) ou 34^{ème} (pour l'essai de confirmation) jours d'âge, tous les oiseaux ont été pesés individuellement. Le poids moyen (PM) et le coefficient de variation (CV) ont pu être mesurés. Le pourcentage de poulets présentant un retard de croissance sévère (poids inférieur de 20 % au PM du groupe témoin) a été déterminé par case et par groupe. Une notation de la boiterie a été utilisée pour évaluer la capacité de marche d'un poulet sur trois par case. La sévérité de la boiterie était évaluée en faisant marcher les poulets sur 1m : 0 = aucun signe de boiterie, 1 = boiterie légère et asymétrique et 2 = boiterie sévère (difficulté à se déplacer) ou une paralysie totale. Les pourcentages de notes 1 et 2 ont été déterminés pour chaque case et chaque groupe. Enfin, la mortalité a été enregistrée quotidiennement.

1.7. Analyses statistiques

Pour l'ensemble des données de performance, une analyse de la variance a été réalisée (facteur : souches, unité statistique : case). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 4.3.2). Les poids moyens ont été comparés sous forme de moyenne ± erreur standard et analysés par un test

ANOVA. La méthode HSD de Tukey a été utilisée pour comparer les moyennes lorsque cela était approprié. Les coefficients de variation ont été analysés à l'aide du test de Kruskal-Wallis et les moyennes ont été comparées à l'aide du test de Dunn. La positivité PCR sur les écouvillons cloacaux, les scores de boiterie, la mortalité et le triont ont été comparés entre les groupes à l'aide du test exact de Fisher (valeurs brutes). La méthode de correction de Bonferroni-Holm a été utilisée pour ajuster les valeurs p pour les tests multiples lorsque cela était applicable. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$, et les valeurs p comprises entre 0,05 et 0,10 ont été considérées comme indicatives d'une tendance.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Sélection des souches à inoculer

En amont de l'essai, 5 souches d'EC ont été sélectionnées à partir d'une collection de 34 souches cliniques (isolées à partir de cas avec lésions) et non cliniques (isolées à partir d'animaux sains) établie en 2023 et 2024. Une classification phylogénétique par MALDI-typage a été réalisée à l'aide d'une empreinte moléculaire de 45 biomarqueurs protéiques spécifiques à EC (P.H. Potier, données non publiées). Les 5 souches ont été choisies à partir de quatre groupes MALDI contenant uniquement des souches cliniques.

2.2. Confirmation de la colonisation intestinale

Validation de l'inoculation et répétabilité intra-groupe. Les groupes infectés (A, B, C, D et E) ont présenté des pourcentages plus élevés d'oiseaux positifs à EC par PCR sur écouvillon cloacal, par rapport au groupe non infecté ($P < 0,05$). Cependant, trois niveaux de colonisation ont été observés dans les groupes infectés : les groupes A (67,5 %) et B (70 %) présentaient des taux de positivité plus élevés que les groupes C (47,5 %) et D (42,5 %) ($P < 0,05$). Le groupe E (65 %) ne différait que du groupe D ($P < 0,05$) (Figure 2). La répétabilité de la colonisation intra-groupe par EC n'a pas été validée pour les groupes C et D.

Comparaison des souches inoculées et des souches isolées à partir des lésions. Sur la base du MALDI-typage, les souches isolées à partir des poulets inoculés ont été comparées à l'inoculum d'origine (Figure 3). Dans les groupes B et E, toutes les souches réisolées appartenaient au même MALDI-type que celles de l'inoculum correspondant. Les isolats des groupes C et D étaient tous distincts de leurs souches inoculées d'origine. La souche du groupe B a été retrouvée dans un des isolats du groupe A et dans l'ensemble des isolats des groupes C et D tandis que la souche du groupe E a été retrouvée dans le groupe D mettant en évidence une contamination intergroupes. Les groupes A, C et D n'ont donc pas été retenus pour la suite des résultats. Les souches du groupe B et E ont été les seules à avoir validé les

critères de sélection fixés : le processus d'inoculation a été confirmé par la colonisation intestinale et les souches isolées dans ces groupes correspondaient exclusivement à celles qui avaient été inoculées. Les comparaisons de résultats suivantes ont donc été effectuées exclusivement entre les groupes B, E et le groupe témoin T.

2.3. Effets des souches d'EC sur les performances zootechniques (essai préliminaire)

Poids moyens (PM). A J21, les PM des animaux des groupes B et T étaient supérieurs à celui du groupe E ($P < 0,05$) (B : $1\ 001 \pm 112$ g ; E : 972 ± 138 g ; T : $1\ 023 \pm 114$ g). A J31, aucune différence de PM n'a été observée ($P > 0,05$) entre les poulets des 3 groupes (B : $1\ 798 \pm 259$ g, E : $1\ 819 \pm 272$ g, T : $1\ 830 \pm 222$ g).

Homogénéité (CV). A J21, le CV du groupe E avait tendance à être plus élevé que ceux des groupes B et T ($P < 0,1$) (B : $11 \pm 2\%$, E : $14 \pm 2\%$, T : $11 \pm 1\%$), alors qu'aucune différence n'a été mise en évidence entre les CV des groupes B et T ($P > 0,05$). A J31, aucune différence n'a été observée entre les CV des trois groupes ($P > 0,05$) (B : $14 \pm 3\%$, E : $15 \pm 1\%$, T : $12 \pm 1\%$).

Mortalité cumulée. Aucune différence n'a été observée sur la mortalité après démarrage (entre 7 et 31 jours d'âge) entre les trois groupes (B : 6,15 %, E : 2,87 %, T : 2,05 %) ($P > 0,05$). Après 31 jours, les taux de mortalité cumulée des groupes E et T sont légèrement supérieurs à ceux rencontrés dans les élevages commerciaux français de poulets standards (3,8% en 2023, source ITAVI) (B : 8,6 %, E : 5,7 %, T : 5,6 %). La mortalité finale au sein du groupe B était supérieure à cette référence.

Tri d'animaux chétifs. A J21, le nombre d'animaux triés dans le groupe E avait tendance à être plus élevé que celui du groupe témoin T (E : 11,1% ; T : 5,2% ; $P < 0,1$). Aucune différence n'a été observée entre le nombre de poulets triés dans les groupes B et T (B : 7,0%, T : 5,2 %). A J31, un plus grand nombre d'animaux a été trié dans le groupe E par rapport au groupe T ($P < 0,05$) et une tendance pour le groupe B par rapport au groupe T ($P < 0,09$) (B : 8,6 %, E : 9,6 %, T : 3,5 %).

Evaluation de la boiterie. A J21, les oiseaux présentant des scores de boiterie de 1 et 2 représentaient 24% de la population du groupe E, contre 2,5% et 0% des populations des groupes B et T ($P < 0,01$). A J31, la part d'oiseaux boiteux dans les groupes B et E étaient supérieures à celle du groupe T ($P < 0,01$) (B : 25,6%, E : 21,5%, T : 5,5%). La souche du groupe E a engendré une boiterie visible sur les animaux dès 21 jours, avec un taux qui n'a pas évolué jusqu'à J31 tandis que l'expression de la souche du groupe B a été plus tardive. Après avoir comparé ces deux groupes infectés au groupe témoin, la souche du groupe E a été identifiée comme la plus pertinente pour reproduire la maladie EC au sein de la ferme de recherche. Différents éléments ont justifié ce choix : le taux de mortalité plus faible, l'apparition

précoce des symptômes et la reproduction d'un épisode clinique similaire à ce qui peut être observée en élevage commercial

2.4. Reproductibilité de la souche du groupe E (essai de confirmation)

A J7, le pourcentage moyen d'oiseaux présentant une colonisation par EC, déterminé par PCR positive sur écouvillon cloacal, était de 98,75 % ($P > 0,05$). Toutes les souches résolues ($n = 8$) appartenaient aux mêmes MALDI-types que celui de l'inoculum. A J21, le poids moyen (PM) était de 1 080 g avec un CV de 12,0 %. A J34, le PM était de 2 149 g avec un CV de 16,6 %. La mortalité entre le 7e et le 34e jour était de 8,5%. A J21, 2,4% des poulets ont été triés (poulets chétifs et boiteux), puis 11,0% à J34. L'évaluation de la boiterie a montré que 9,1% des oiseaux notés présentaient des signes de boiterie à J21 (scores 1 et 2) et 22,9 % à J34. Après avoir été exposée à un contexte environnemental différent (conditions météorologiques, origine poussin, aliment), la souche du groupe E a donc reproduit les signes cliniques de l'EC chez les poulets inoculés.

CONCLUSION

Les infections à EC représentent toujours aujourd'hui d'importantes pertes économiques et un recours fréquent aux antibiotiques chez le poulet de chair à croissance rapide. L'objectif de ce travail était d'établir un modèle d'infection dans des conditions d'élevage commercial afin de pouvoir tester à l'avenir des solutions alternatives de prévention et de traitement. Lors d'un premier essai, 5 souches d'EC isolées à partir de lésions en 2023 ont pu être testées afin de déterminer leur capacité à générer des signes cliniques dans des conditions d'élevage, de manière contrôlée et répétable. Pour deux d'entre elles, la colonisation intestinale, l'âge d'apparition des signes cliniques et la morbidité (estimée à près de 30 %) ont été observés et leurs valeurs étaient équivalentes à celles décrites dans la littérature (Martin et al., 2011 ; Borst et al., 2017 ; Jung et al., 2018 ; Schreier et al., 2021). Le deuxième essai a permis de tester la reproductibilité du modèle d'infection de la ferme de recherche, avec la souche sélectionnée et dans des conditions analogues mais non identiques (origine poussin, aliment, conditions météorologique). Les résultats ont ainsi confirmé la reproductibilité et la robustesse du modèle, indépendamment des conditions d'élevage. Un modèle expérimental robuste d'infection par *E. cecorum* a ainsi été établi chez le poulet de chair. Ce dispositif constitue un outil pertinent pour tester des stratégies innovantes de prévention, limiter le recours aux antibiotiques et contribuer à la lutte contre l'antibiorésistance en aviculture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borst, L. B., M. M. Suyemoto, A. H. Sarsour, M. C. Harris, M. P. Martin, J. D. Strickland, E. O. Oviedo, and H. J. Barnes. 2017. *Vet. Pathol.* 54:61–73.
- Jung, A., L. R. Chen, M. M. Suyemoto, H. J. Barnes, and L. B. Borst. 2018. *Avian Dis.* 62:261–271.
- Jung, A., H. Petersen, L. Teske, and S. Rautenschlein. 2017. *BMC Microbiol.* 17:106.
- Martin, L. T., M. P. Martin, and H. J. Barnes. 2011. *Avian Dis.* 55:273–278.
- Schreier, J., S. Rautenschlein, and A. Jung. 2021. *PLOS ONE* 16:e0259904.
- Wideman, R. 2016. *Poult. Sci.* 95:325–344.

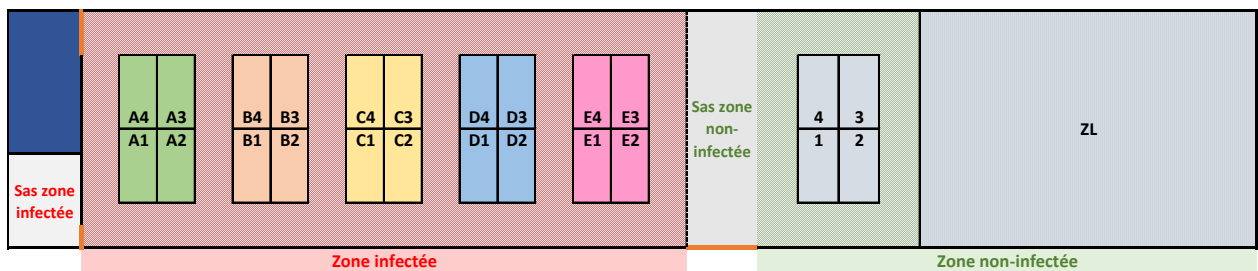


Figure 1. Organisation du bâtiment lors de l'essai 2024.

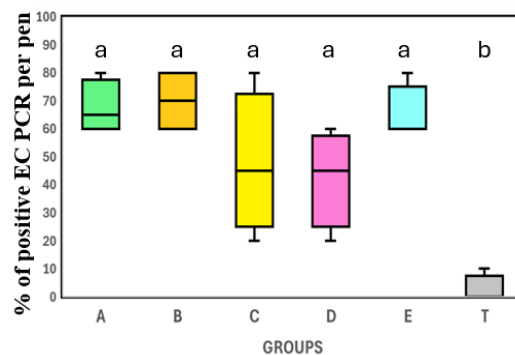


Figure 2. Variation du taux de positivité en PCR en fonction de la souche à J7, déterminée à partir d'un écouvillon cloacal ($p < 0,05$). $n = 40$ écouvillons cloacaux par groupe.

		Inoculated strains				
		23ECa	23ECb	23ECc	23ECd	23ECe
		A	B	C	D	E
Collected strains	23ECa	2				
	23ECb	1	5	1	2	
	23ECc			0		
	23ECd				0	
	23ECe				1	5

Figure 3. Répartition des EC isolées et comparaison avec les souches inoculées. Cellules rouges : nombre de prélèvements de souches isolées non correspondantes à la souche inoculée. Cellules vertes : nombre de prélèvements de souches isolées correspondantes à la souche inoculée.