LOCALISATION DE L'EXPRESSION *IN VIVO* DE FIMBRIAE F1 ET P LORS DE COLIBACILLOSE EXPERIMENTALE CHEZ LE POULET

Dho-Moulin Maryvonne[1], Brée Annie[1], Pourbakhsh Seyed Ali[2], Desautels Clarisse[2], Fairbrother John[2]

[1]INRA, Centre de Tours-Nouzilly, Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie, 37380 Nouzilly, [2]Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 Canada

Résumé

Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires expriment *in vitro* des fimbriae F1, et certaines d'entre elles synthétisent également des fimbriae P qui pourraient être impliqués dans la colonisation bactérienne et l'infection de l'animal.

Dans une première expérimentation, des lots de poulets axéniques élevés en isolateur ont été inoculés avec des souches d'*E. coli* pathogènes de génotype connu et l'évolution du taux d'anticorps dirigés contre les fimbriae F1 et P a été suivie à l'aide d'un test ELISA. Dans une deuxième expérimentation, des lots de poulets conventionnels ont été inoculés avec ces mêmes souches d'*E. coli* et l'expression des fimbriae F1 et P a été recherchée dans différents organes par immunofluorescence sur coupes de tissus congelés.

L'apparition d'anticorps anti-fimbriae F1 et anti-fimbriae P dans le sérum des poulets, 15 jours après l'inoculation, a permis de confirmer l'expression des fimbriae *in vivo* au cours d'une colibacillose expérimentale. L'examen des coupes de tissus congelés a par ailleurs mis en évidence que les fimbriae F1 étaient exprimés uniquement dans les voies respiratoires, essentiellement au niveau de la trachée, alors que les fimbriae P étaient exprimés dans les voies respiratoires inférieures et certains organes profonds.

Ces résultats devraient permettre d'étudier plus précisément le rôle des fimbriae aux différentes étapes de la colibacillose aviaire.

Introduction

Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles sont responsables d'infections extra-intestinales, systémiques, dues aux propriétés invasives des souches en cause. Le point de départ de ces infections est le plus souvent respiratoire (Gross W.B., 1991). Plusieurs facteurs potentiels de virulence ont été identifiés *in vitro* chez les souches d'*E.coli* pathogènes pour les volailles, sur la base de corrélations avec le pouvoir pathogène expérimental pour le poussin : expression de fimbriae (de type F1 et P) à la surface des bactéries, synthèse d'un sidérophore bactérien (l'aérobactine), présence de certains polysaccharides capsulaires capables d'induire une résistance au pouvoir bactéricide du sérum, activité cytotoxique (Dho-Moulin M., 1993). Les fimbriae sont des filaments protéiques extra-cellulaires, connus pour être impliqués dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Ils peuvent également interférer avec les défenses immunitaires de l'hôte. Il a été montré, par des tests *in vitro*, que les fimbriae de type F1 exprimés par les *E.coli* pathogènes aviaires étaient responsables de l'adhésion aux cellules épithéliales pharyngiennes et trachéales du poulet, et pourraient, de ce fait, être impliqués dans la colonisation de l'appareil respiratoire, première étape de la maladie (Dho M. and J.P. Lafont, 1984; Gyimah J.E. *et al.*, 1988). Par ailleurs, certaines souches d'*E.coli* pathogènes pour la volaille, expriment également *in vitro* des fimbriae de type P (van den Bosch J.M. *et al.*, 1993), sans qu'un rôle *in vivo* n'ait pu encore leur être attribué. Il est connu que l'expression des fimbriae est dépendante de facteurs de l'environnement (température, pH, nutriments disponibles) et des variations de phase ont ainsi été observées *in vitro* pour les fimbriae de type F1 et P (Dozois C.M. *et al.*, 1995).

Le but de cette étude était de rechercher et de localiser l'expression des fimbriae F1 et P *in vivo*, chez des poulets infectés expérimentalement par une souche pathogène d'*E.coli*. Ce travail constituait un préliminaire indispensable à la recherche du rôle des fimbriae dans le développement de la colibacillose.

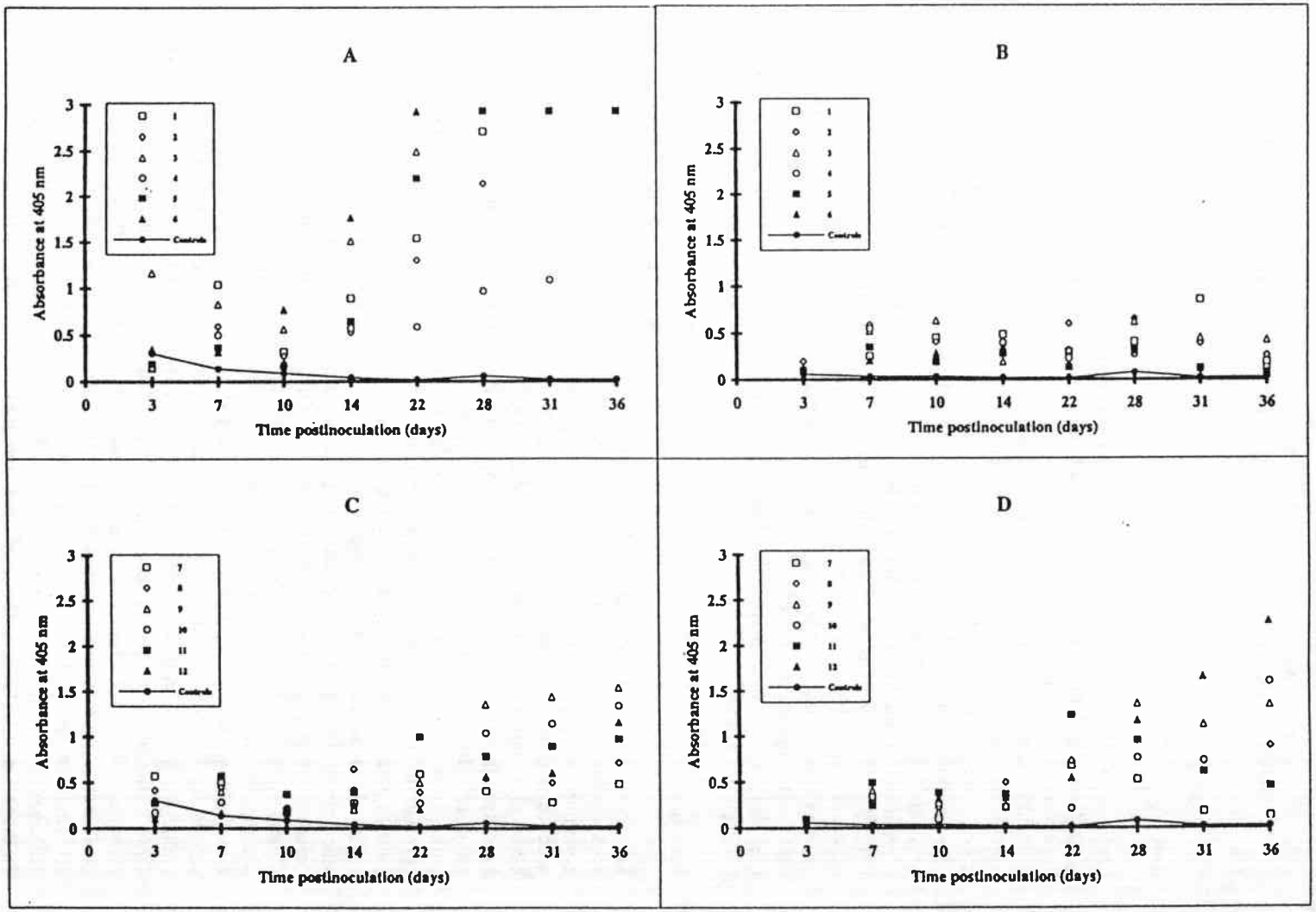
Matériel utilisé

Souches bactériennes : 2 souches pathogènes d'*E.coli* d'origine aviaire : MT78 (O2:K1:H+), qui ne peut produire que des fimbriae F1 (génotype *fim+, pap-*), et TK3 (O1:K1:H7) qui peut produire des fimbriae F1 et P (génotype *fim+, pap+*), (Dozois C.M. *et al.*, 1994).

Anticorps polyclonaux : sérums spécifiques de chaque type de fimbriae (F1 et P) obtenus par immunisation de lapins avec des fimbriae purifiés (Dho-Moulin M. *et al.*, 1990).

Animaux : (1) poulets axéniques, issus de Leghorn Blanches, souche PA12 de la Station de Pathologie aviaire et Parasitologie ; (2) poulets conventionnels, issus d'un élevage de St Hyacinthe, Québec.

FIGURE 1. Détection par ELISA de la présence d'anticorps anti-fimbriae F1 (**A** et **C**) ou anti-fimbriae P (**B** et **D**) dans le sérum de poulets inoculés par voie intra-trachéale avec une souche d'*E.coli*. **A** et **B** : poulets inoculés avec la souche d'*E.coli* MT78 (*fim+*, *pap-*) ; **C** et **D** : poulets inoculés avec la souche TK3 (*fim+*, *pap+*). Les résultats individuels pour chaque poulet inoculé sont représentés. Les résultas obtenus pour les poulets témoins (non inoculés) sont figurés par une courbe correspondant à la moyenne des valeurs observées pour 6 poulets.



Mise en évidence de l'expression des fimbriae F1 et P *in vivo* après infection expérimentale de poulets axéniques

Deux groupes de poulets axéniques élevés en isolateurs ont été inoculés par voie intra-trachéale avec la souche MT78, ou la souche TK3, deux jours après avoir été inoculés par le virus de la bronchite infectieuse (BI, souche Mass41), utilisé comme facteur déclenchant de la colibacillose (Brée A. *et al.*, 1989). Un troisième groupe de poulets, uniquement inoculés par le virus BI, constituait le témoin.
Neuf prélèvements de sang (J0, J3, J7, J10, J14, J22, J28, J31, J36) dont le premier (J0) avant l'inoculation bactérienne, ont permis de déterminer l'évolution du taux d'anticorps anti-fimbriae dans le sérum de ces poulets, par test ELISA, en utilisant des fimbriae purifiés comme antigènes.
Des taux significatifs d'anticorps spécifiques des fimbriae F1 ont été détectés dans le sérum des poulets inoculés avec MT78, ou avec TK3, à partir de 14 jours après inoculation bactérienne (Fig. 1A et 1C). Des taux significatifs d'anticorps spécifiques des fimbriae P ont été détectés uniquement dans le sérum des poulets inoculés avec la souche TK3 (Fig. 1B et 1D). Chez les poulets témoins (non inoculés), il n'a pas été observé d'anticorps dirigés contre les fimbriae P. Cependant, un faible taux d'anticorps anti-F1 a été observé chez ces poulets témoins, jusqu'à 10 jours après inoculation, qui pourrait être dû à la transmission d'anticorps maternels.
Les résultats ELISA ont été confirmés par immunodot et Western-blot.

Localisation de l'expression des fimbriae *in vivo* chez des poulets conventionnels après inoculation dans les sacs aériens

Trois groupes de poulets ont été inoculés dans les sacs aériens avec la souche MT78, ou la souche TK3, ou un volume équivalent de P.B.S. stérile. Deux poulets de chaque groupe ont été autopsiés à 3, 6, 12, 24 et 48 heures suivant l'inoculation. Différents prélèvements de tissus ont été effectués sur chaque poulet (trachée, poumon, sacs aériens, péricarde, foie, rate et rein), ainsi que des prélèvements de sang et de liquide péricardique.
Après congélation, des coupes de tissus ont été effectuées avec un cryostat et montées sur lames. Les bactéries ont été identifiées par immunofluorescence en utilisant des sérums spécifiques anti-O1 et anti-O2, pour détecter les souches TK3 et MT78 respectivement. Par ailleurs, des anticorps anti-fimbriae F1 et anti-fimbriae P ont été utilisés pour détecter les fimbriae à la surface des bactéries. Un anti-sérum anti-Ig de lapin, marqué à la fluorescéine, a ensuite permis la visualisation des anticorps spécifiques fixés, selon le protocole décrit précédemment (Dozois C.M. *et al.*, 1994). Le pourcentage de bactéries exprimant des fimbriae F1 ou P à leur surface a été déterminé à l'aide d'un microscope à fluorescence.
Des bactéries correspondant aux souches d'*E.coli* inoculées ont été mises en évidence dans chacun des tissus examinés ainsi que dans le sang et le liquide péricardique. Les fimbriae F1, produits par la souche MT78 ou par la souche TK3, étaient exprimés par une forte proportion des bactéries présentes dans la trachée, et, moins fréquemment par les bactéries présentes dans les sacs aériens et dans les poumons (Fig. 2A). Aucune des bactéries présentes dans les autres organes n'exprimait de fimbriae F1.
Les fimbriae P, produits par la souche TK3, ont été observés majoritairement dans les sacs aériens, mais aussi dans les poumons, le rein, le liquide péricardique et le sang (Fig. 2B). Aucune des bactéries de la souche TK3, présentes dans la trachée, la rate ou le péricarde n'exprimait de fimbriae P.

Conclusion

Cette étude (Pourbakhsh A.S. *et al.*, 1997) a permis de démontrer indirectement, par la détection d'anticorps spécifiques des fimbriae, l'expression *in vivo* des fimbriae de type F1 et P par des souches d'*E.coli* pathogènes pour la volaille. De plus, la visualisation des fimbriae par immunofluorescence sur coupes de tissus congelés a mis en évidence l'existence d'une variation de phase *in vivo*, résultant en une expression différente de chaque type de fimbriae selon le tissu colonisé.
L'observation de l'expression préférentielle des fimbriae F1 dans la trachée est à mettre en relation avec l'implication des fimbriae F1 dans l'adhésion *in vitro* aux cellules trachéales. Elle conforte l'hypothèse d'un rôle probable des fimbriae F1 dans les premières étapes de la colibacillose aviaire.
L'absence d'expression des fimbriae P dans la trachée est en parfait accord avec les tests *in vitro* ayant montré que les fimbriae P ne sont pas impliqués dans l'adhésion aux cellules trachéales du poulet (van den Bosch J.M. *et al.*, 1993). Cependant, l'expression des fimbriae P observée dans les organes profonds ouvre des perspectives de recherche sur leur rôle possible dans le développement ultérieur de l'infection.
Des infections expérimentales, utilisant des mutants isogéniques *fim-* (Marc D. *et al.*, 1997) ou *pap-*, de souches pathogènes d'*E.coli*, ont pour but de préciser le rôle respectif de ces deux types de fimbriae dans le processus pathogénique.

Références

Brée A. , Dho M. , Lafont J.P., 1989. Avian Dis., 33, 134-139.
Dho M., Lafont J.P., 1984. Avian Dis., 28, 1016-1025.
Dho-Moulin M. van den Bosch J.M., Girardeau J.P., Brée A., Barat T., Lafont J.P. Infect. Immun., 1990, 58, 740-745.

Dho-Moulin M., 1993. Ann. Méd. Vét., 137, 353-357.
Dozois C.M. Chanteloup N., Dho-Moulin M., Brée A., Desautels C., Fairbrother J.M., 1994. Avian Dis., 38, 231-239.
Dozois C.M. Pourbakhsh S.A., Fairbrother J.M., 1995. Vet. Microbiol., 45, 297-309.
Gross W.B., 1991. in Diseases of Poultry (Calnek B.W. *et al.* edit.) Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, U.S.A., pp 496-519.
Gyimah J.E., Panigrahy B. 1988. Avian Dis., 32, 74-78.
Marc D., Arné P., Brée A., Dho-Moulin M. Deuxièmes Journées de la Recherche Avicole, 1997.
Pourbakhsh S.A., Dho-Moulin M., Brée A., Desautels C., Martineau-Doizé B., Fairbrother J.M., 1997. Microb. Pathogen., sous presse.
van den Bosch J.F., Hendricks J.H.I.M., Gladigau I., Willems H.M.C., Storm P.K., de Graff F.K., 1993. Infect. Immun., 61, 800-806.

FIGURE 2. Proportion de bactéries exprimant des fimbriae de type F1 (**A**), ou de type P (**B**) dans les différents organes, après inoculation de la souche d'*E.coli* MT78 (*fim+, pap-*) ou de la souche TK3 (*fim+, pap+*) dans les sacs aériens de poulets conventionnels. Les cellules bactériennes et les fimbriae exprimés ont été visualisés par immunofluorescence à l'aide de sérums spécifiques, sur des coupes de tissus congelés.

