

REPONSE DE LA DINDE A L'INFECTION ET LA REINFECTION PAR DIFFERENTS SEROVARS DE *CHLAMYDIA PSITTACI*

Van Nerom Anne, Ducatelle R. et Haesebrouck F.

Département de médecine avicole, de pathologie et de bactériologie et mycologie.
Faculté de médecine vétérinaire. Université de Gand. B-9820 Merelbeke, Belgique

Résumé

Récemment nous avons démontré que la bactérie *Chlamydia psittaci* joue un rôle dans l'étiologie du syndrome de rhinite-airsacculite chez la dinde en Belgique. Nous présenterons les premiers résultats d'une série d'essais qui permettront d'analyser la réponse humorale et cellulaire de la dinde, après infection et réinfection expérimentale avec deux sérovars de *Chlamydia psittaci*. Dans une première phase, les différents isotypes des immunoglobulines (Ig) de la dinde ont été séparés et purifiés à partir de sérum et de bile. Une série d'anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques pour les différents isotypes des Ig du poulet, a été testée en immunoélectrophorèse et ELISA avec les Ig purifiés de la dinde. La réactivité croisée interspécifique de la majorité de ces anticorps, permet la mise en évidence des différents isotypes des Ig de la dinde. La réponse humorale, après infection expérimentale et réinfection 4 semaines plus tard de dindes indemnes d'agents pathogènes spécifiques, sera mise en rapport avec le développement éventuel d'une immunité protectrice.

Introduction

Récemment nous avons démontré que la bactérie *Chlamydia psittaci* joue un rôle dans l'étiologie du syndrome de rhinite-airsacculite chez la dinde en Belgique. La chlamydiose chez la dinde représente un risque considérable, aussi bien pour la santé publique, que pour les pertes économiques dues à la réduction de la production, aux pertes d'animaux et aux frais de traitement suite aux infections au niveau de l'élevage industriel. L'introduction d'un vaccin menant à une protection, pourrait se justifier dans ces conditions. De nombreuses questions sur la réponse immuno-logique de l'hôte, et de la dinde en particulier, envers une infection de *Chlamydia psittaci*, ne sont néanmoins pas encore résolues. Notre recherche a comme but de contribuer à la connaissance de la réponse immunologique de la dinde, afin de pouvoir générer une éventuelle protection.

I. Matériel et méthodes

Purification des isotypes d'immunoglobulines de dinde. Les isotypes IgG et IgM ont été purifiés à partir de sérum de dindes, dont les immunoglobulines furent précipitées en ajoutant un même volume de solution de sulfate d'ammoniaque saturée (761g/l ; pH7,4). Après incubation (4°C ; 16h) et centrifugation à 3000g pendant 30 minutes, le précipité fut dissout dans 30% du volume initial de solution salée tamponnée au phosphate (PBS ; pH7,4), dialysé intensivement, centrifugé et filtré (220nm ; Corning, New York). Cinq cents microlitres de cette solution furent soumis à une séparation par Sephacryl S-200 (76x1,6cm ; Pharmacia, Suède) à un débit de 0,5ml/min de 0,02M Tris-HCl (tris-hydroxyméthyl)-aminométhane, 2% NaCl (pH8,0) et collecté en fractions de 2,5ml. Deux pics furent notés (absorption à 280nm), correspondants respectivement à l'IgM et l'IgG (Goudswaard et al., 1977). Les fractions, concordantes à chacune de ces pics furent collectées et concentrées par centrifugation (Centricon-30, Amicon Inc., USA). Pour la purification d'IgA de dindes, la procédure, décrite par Davis (1985) fut employée, avec quelques modifications. De la bile de dinde fut mélangée à un même volume de solution de sulfate d'ammoniaque saturée à 50%, suivi d'une centrifugation (1500g ; 4°C ; 1h) pour précipiter la plupart des mucines et du matériel pigmenté, ce qui fut écarté. La concentration de sulfate d'ammoniaque de la solution fut ensuite ajustée à une saturation de 50%. Après centrifugation (1500g ; 4°C ; 1h), le précipité fut lavé trois fois, finalement dissout dans du 0,02M Tris-HCl, 2% NaCl (pH8,0) et désalé par filtration par Sephadex G-25 (PD-10 ; Pharmacia, Suède). De cette solution, 500µl furent séparés par Sephacryl S-200. Un seul pic fut noté, correspondant à l'IgA. Ces fractions furent concentrées.

Réactivité croisée interspécifique d'anticorps pour la détection des isotypes d'Ig de dinde. Trois anticorps polyclonaux: anti-chicken/IgA (α-chain specific, affinity purified), anti-chicken/IgG (Fc-fragment specific) et anti-chicken/IgM (µ-chain specific) de l'Universal Biologicals Ltd. furent employés dans l'agar gel immunoélectrophorèse (Gelman, Michigan, USA). Les fractions concentrées des isotypes d'Ig de dinde furent appliquées. Du sérum de dinde et de poulet servaient de contrôle. Les lignes de précipitation furent détectées par coloration au bleu de Coomassie (0,5%).

Différents anticorps monoclonaux (AM), envers les isotypes des Ig du poulet, ont courtoisement été mis à notre disposition par Dr. D. Davison (Institute for Animal Health, Compton, Angleterre) (AV-G3 et AV-M10) et par Dr. B. Kaspers (Département de physiologie, Université de Munich, Allemagne) (M-50). Ces AM furent analysés par ELISA indirect: chaque fraction recueillie après chromatographie, fut diluée 1/100 par 45mM de tampon bicarbonate (pH9,6), dont 150µl par puits fut placée dans une plaque ELISA, suivi d'une série de dilutions triples dans le même tampon. Après incubation (16h ; 4°C), 250µl de glycine 5% dans le tampon bicarbonate fut incubé 1h à température ambiante. La plaque fut lavée trois fois au PBST (0,05% Tween20 dans du PBS) et 100µl de chaque AM fut ensuite incubé 1h à 37°C. Les dilutions appliquées étant pour AV-G3 et AV-M10 1/500 et pour M-50 1/700 dans du PBST/BSA (1% d'albumine de sérum bovin). La plaque fut lavée, incubée 1h à 37°C avec 100µl de GAM/IgG(H+L)-PO (goat-anti-mouse, Nordic, Hollande) par puits et relavée. Dix minutes après addition de 100µl de substrat OPD (10mg dans du tampon de citrate pH5,0 ; 0,2% H₂O₂) la réaction fut terminée en ajoutant 50µl 2,5N HCl par coupe. L'extinction fut mesurée à 492nm (Titertek Multiscan Plus, TechGen, Bruxelles, Belgique).

Préparation des chlamydia. Deux souches de *Chlamydia psittaci*, appartenant à différents sérovars: 92/1293 (sérovar D), et 84/55 (sérovar A), furent cultivées en cellules Buffalo Green Monkey (BGM) (Vanrompay et al., 1994). Chaque souche fut soumise à trois passages en culture, dont le dernier fut appliqué pour l'infection expérimentale. Le TCID₅₀ fut calculé selon la méthode de Spearman et Kaerber (Mayr et al, 1974), en cellules BGM.

Infections expérimentales: infection et réinfection par la souche 92/1293. Trente deux poussins de dindes exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (OEPS ; Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Ploufragan, France), couvés en isolation furent élevés en quatre isolateurs (Montair-Andersen, Sevenum, Hollande). Un groupe (groupe 1) de 7 poussins fut préservé de chlamydia. Les poussins de groupe 2 (7 poussins) furent uniquement infectés à l'âge de 35 jours, ceux de groupe 4 (9 poussins), uniquement à l'âge de 7 jours. Les 9 poussins de groupe 3 furent infectés à l'âge de 7 jours, suivi d'une seconde infection 4 semaines plus tard. A l'âge de 7 jours, 10ml de 10⁶TCID₅₀/ml et à l'âge de 35 jours, 10ml de 10^{6,5}TCID₅₀/ml furent dispersés par aérosol (Cirrus nebulizer, Lameris, Anvers, Belgique). Des frottis des conjonctives, de la trachée et du cloaque furent pris 3, 6, 8 et 10 jours et ensuite deux fois par semaine après chaque infection. Chaque semaine, du sang fut prélevé, un lavage de la trachée (1ml/kg de 1%PBS/BSA) eut lieu et des larmes furent collectées. Pour ce dernier, les dindes furent fixées sur le dos et injectées, avec 10min d'intervalle par de la néostigmine (0,3mg/kg i.m.) et de l'atropine (0,3mg/kg) (Aitken et Parry, 1972). A l'âge de 49 jours, les dindes furent sacrifiées pour examen macroscopique et microscopique. Les frottis collectés à l'âge de 49 jours, furent analysés en immunofluorescence indirecte (IMAGEN, Dako Diagnostics Ltd., Cambridgeshire, Angleterre).

Infection par la souche 84/55 et réinfection par la souche 92/1293. Trois groupes de 10 poussins de dindes EOPS furent élevés en isolateurs. Les poussins du groupe 2, furent infectés à l'âge de 7 jours par la souche 84/55 (10ml à 10⁶TCID₅₀/ml) et réinfectés à 35 jours par la souche 92/1293 (10ml à 10^{6,5}TCID₅₀/ml). Les poussins de groupe 3 furent uniquement infectés à l'âge de 7 jours (84/55), ceux de groupe 1 à l'âge de 35 jours (92/1293). Les mêmes paramètres, que pour la première infection expérimentale, furent appliqués.

II. Résultats

Réactivité croisée interspécifique d'anticorps pour la détection des isotypes d'Ig de dinde. Les trois anticorps polyclonaux présentaient une réaction croisée spécifique pour chacun des isotypes d'immunoglobulines de dindes. Une seule ligne de précipitation fut formée entre l'IgA de dinde et l'Anti-IgA (α-chain specific, affinity purified), et entre le sérum de dinde ou de poulet et l'Anti-IgA. Ces précipitations furent formées à la même hauteur de migration. Une ligne de précipitation également, fut formée entre l'IgG de dinde et l'Anti-IgG (Fc-fragment specific), autant qu'entre le sérum de dinde ou de poulet et l'Anti-IgG, se trouvant à même hauteur de migration. Egalement une ligne identique de précipitation fut démontrée entre l'IgM de dinde et l'Anti-IgM (μ-chain specific), et entre le sérum de dindes ou de poulet et l'Anti-IgM. Une faible précipitation fut formée entre l'IgG et l'IgM vis-à-vis de l'Anti-IgA, à hauteur de l'IgA, démontrant une contamination de l'IgG et de l'IgM par de l'IgA. Une faible impureté de l'IgG par l'IgM et de l'IgM par l'IgG fut également démontrée. En immunoelectrophorèse l'IgA ne démontrait nulle contamination d'IgG ni d'IgM. Cette impureté implique qu'en ELISA la réaction croisée d'anticorps monoclonaux peut uniquement être vérifiée envers l'IgG et l'IgM de dinde. En ELISA indirecte, l'anticorps M-50 réagissait spécifiquement avec l'IgM de dinde, tandis que les AM AV-G3 et AV-M10 réagissaient tout deux spécifiquement avec l'IgG de dinde.

Infections expérimentales. Des symptômes représentatifs pour la chlamydiose, furent uniquement observés chez les dindes infectées par la souche 84/55. Ces symptômes variaient d'une vitalité réduite, une accélération du rythme respiratoire, une légère dyspnée et de la diarrhée. Les dindes, infectées par la souche 92/1293 ne démontrèrent qu'une discrète accélération du rythme respiratoire et vitalité réduite. A l'autopsie des animaux de la première infection

expérimentale (92/1293-92/1293), à l'âge de 49 jours, toutes les dindes du groupe 2 présentaient une opacité des sacs respiratoires. Les sacs d'une dinde portaient des plaques de fibrine ; cette dinde démontrait également une hyperaémie des poumons et une splénomégalie. Une splénomégalie fut également observée chez une seconde dinde, et une légère injection des vaisseaux de l'intestin grêle chez quatre dindes de ce groupe. Chez les dindes du groupe 4, les lésions des sacs respiratoires variaient d'opacité légère à exprimée ; une dinde ne démontrait nul lésion des sacs. Une légère injection des vaisseaux de l'intestin grêle fut observée chez toutes les dindes de ce groupe. Une dinde présentait une splénomégalie. Les dindes du groupe 3, démontraient une légère opacité des sacs respiratoires. Chez deux dindes une légère injection des vaisseaux de l'intestin grêle fut observée. Les dindes de groupe 1 ne présentaient nulle lésion.

A l'autopsie des animaux de la seconde infection expérimentale (84/55-92/1293), à l'âge de 49 jours, les dindes de groupe 2, présentaient toutes une opacité des sacs respiratoires et des plaques de fibrine, situées principalement au niveau des sacs respiratoires abdominaux. Une hyperaémie du poumon, du foie, de la rate et des reins fut observée chez toutes les dindes, de même qu'une hépatomégalie et splénomégalie. Une péricardite séreuse et adhésive était présente chez toutes les dindes, tel qu'une injection des vaisseaux de l'intestin grêle. Les dindes de groupe 3 démontraient les mêmes lésions que ceux de groupe 2. Les dindes de groupe 1 démontraient une légère opacité des sacs respiratoires. Les sacs d'une dinde portaient des plaques de fibrine. Une splénomégalie fut observée chez trois dindes, une légère injection des vaisseaux de l'intestin grêle chez quatre dindes. Les frottis collectés à l'âge de 49 jours, furent analysés en immunofluorescence indirecte. Chez toutes les dindes des groupes 2, 3 et 4 de la première infection expérimentale (92/1293-92/1293) des chlamydia furent observés dans les frottis. Le nombre de chlamydia était néanmoins très bas (de 1 à 5 chlamydia par frottis). Toutes les dindes de la seconde infection expérimentale (84/55-92/1293) démontrèrent également des chlamydia dans les frottis (1 à 5 chlamydia par frottis).

Discussion

Pour la détection des différents isotypes d'immunoglobulines de dindes, aucun anticorps n'est commercialisé. La réactivité croisée interspécifique des anticorps testés, permet d'analyser ces différents isotypes. Les anticorps monoclonaux offrent l'avantage d'une réaction monospécifique et uniforme. Les anticorps polyclonaux par contre, peuvent varier de lot à lot. Bien que l'anti-IgA soit également polyclonal, la purification par affinité réduit le spectre des anticorps réagissant avec l'IgA de dindes, offrant une réaction plus uniforme entre les différents lots. Ce dernier, et les AM seront appliqués pour l'évaluation de l'immunité humorale dans les infections expérimentales.

Les symptômes et les lésions, après infection par la souche 92/1293 ne furent pas uniformément observés chez toutes les dindes d'un même isolateur, impliquant que l'apparition de symptômes et de lésions est un critère variable pour évaluer une infection et une éventuelle protection envers une seconde infection. L'évaluation d'un effet protecteur d'une infection primaire envers une seconde infection pose donc un problème. En travaillant dans des isolateurs, le nombre de dindes par groupe est trop limité pour une analyse de l'augmentation pondérale. Malgré l'inconstance de ces critères, il semble néanmoins qu'un premier contact antérieur par le même ou un autre sérotype de chlamydia n'a pas d'effet sur le développement de symptômes ou de lésions après réinfection.

Les premiers résultats des frottis, peuvent d'une part indiquer qu'une infection primaire ne protège pas la dinde envers une seconde infection, car une excrétion de chlamydia fut observée chez toutes les dindes à l'âge de 49 jours. D'autre part cette excrétion pourrait également être attribuée à l'infection primaire. Une troisième possibilité, est que les chlamydia survivent sous forme latente chez l'hôte. Sous l'influence de facteurs stressants, les chlamydia latentes pourraient refaire surface.

Remerciement

Nous remercions l'Institut flamand d'encouragement de la recherche scientifique-technologique dans l'industrie (IWT, Bruxelles, Belgique) pour avoir alloué une bourse à Anne Van Nerom. Mr. J. Vermeulen et Mlle C. De Cupere sont remerciés pour leur assistance.

Références

- Aitken I.D. et Parry S.H., 1972, Res. Vet. Sci., 13, 482-488.
- Davis C. Y., 1985. Ph.D. dissertation, Iowa State University, Ames, Iowa, pp 134.
- Goudswaard J., Noordzij A., van Dam R.H., vander Donk J.A. et Vaerman J.-P., 1977, Poult. Sci., 56, 1847-1851.
- Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B. et Wittmann G. (edit.), 1974, Virol. Arbeitsmethoden Bd. I, Jena, pp 35.
- Vanrompay D., Ducatelle R. et Haesebrouck F., 1994, Av. Pathol., 23, 247-262.