

# ROLE DES FIMBRIAE DANS LA PATHOGENICITE DES *ESCHERICHIA COLI* AVIAIRES : CONSTRUCTION ET ANALYSE DE MUTANTS ISOGENIQUES *FIM*- ET *FIMH*-

Marc Daniel, Arné Pascal, Brée Annie & Dho-Moulin Maryvonne

Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, INRA - Centre de TOURS, 37380 NOUZILLY, France

## Résumé

Parmi les facteurs de virulence des colibacilles pathogènes aviaires, les fimbriae de type 1 sont souvent proposés comme facteur de colonisation, et pourraient également être impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Afin de tester *in vivo* l'implication des fimbriae dans la pathogénie, nous avons construit par échange allélique, à partir de la souche pathogène aviaire MT78 (O2:K1), deux mutants isogéniques au locus *fim* modifié. Le pouvoir pathogène des deux mutants a été testé dans une reproduction expérimentale de la colibacillose sur poussins de 15 jours. Nos résultats indiquent que, si les fimbriae ne sont pas indispensables dans la colonisation de l'appareil respiratoire d'animaux axéniques, ils pourraient favoriser l'établissement d'une population d'*E. coli* en présence d'une flore SPF. En outre, les animaux infectés par les deux mutants montrent régulièrement un gain de poids plus élevé que ceux infectés par la souche parentale, traduisant une pathogénicité moindre.

## Introduction

La colibacillose aviaire est responsable de pertes importantes en élevages avicoles. Associée à des souches d'*Escherichia coli* de sérogroupes O1, O2 et O78, cette affection respiratoire touche les poulets de 3 à 10 semaines, après une infection virale ou mycoplasmaïque. Les lésions d'aérosacculite, de péricardite et de périhépatite occasionnent des pertes importantes, et dans certains cas l'animal meurt de septicémie (Gross, 1991). Parmi les facteurs de virulence des *E. coli* aviaires, l'expression de fimbriae (ou pili) de type 1 est observée chez la majorité des souches et semble associée à la virulence (Dho & Lafont, 1984, Naveh et al., 1984). Les fimbriae de type 1 permettent aux bactéries d'adhérer aux muqueuses (Gyimah & Panigrahy, 1988, Krogfelt, 1991), et favoriseraient la colonisation de l'appareil respiratoire. Il a également été montré que les fimbriae de type 1 interagissent avec la réponse immunitaire non-spécifique de l'hôte.

Le but de notre étude était de déterminer *in vivo*, chez le poulet, l'importance des fimbriae dans la colonisation de l'appareil respiratoire et dans la pathogénicité, par une reproduction expérimentale de la colibacillose aviaire utilisant deux mutants dérivés d'une souche pathogène.

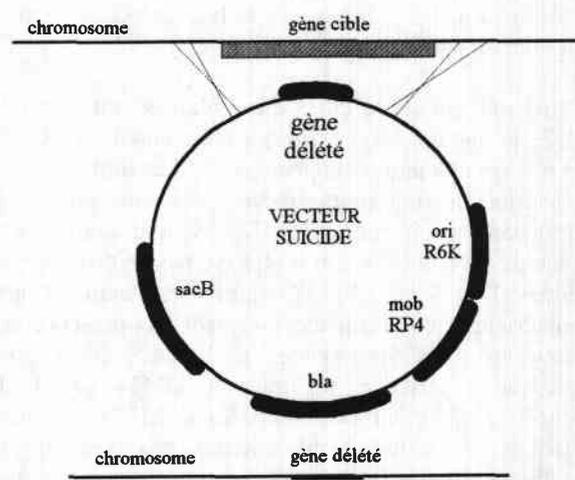
## 1. Résultats et discussion

### 1.1. Construction des mutants DM34 (*fim*-) et PA68 (*fimH*-).

La souche MT78 (O2:K1:H+) a été isolée de la trachée d'un poulet atteint de colibacillose (Dho & Lafont, 1982). Elle ne produit que des fimbriae de type 1. L'opéron *fim* de MT78 a été cloné et séquencé (Marc & Dho-Moulin, 1996), et deux

délétions ont été introduites dans la région clonée contenant l'opéron. Dans une première construction, la totalité de l'opéron *fim* a été enlevée, tandis que seul le gène *fimH*, codant pour l'adhésine, a été enlevé dans la seconde construction. Dans les deux cas, les régions chromosomiques en amont et en aval de la délétion ont été conservées, puis clonées dans un vecteur suicide, pCVD442 (Donnenberg & Kaper, 1991). Ce vecteur permet l'échange allélique:

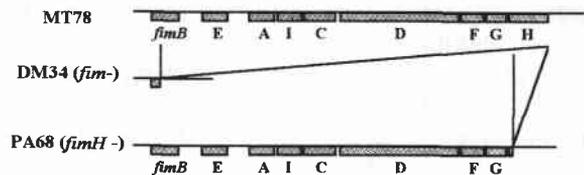
**FIGURE 1 :** Principe de l'échange allélique par une double recombinaison homologue, en amont et en aval du gène cible dans le chromosome bactérien, celui-ci est substitué par sa version modifiée *in vitro*.



introduit dans la souche parentale MT78, il permet de substituer dans le chromosome le gène cible par sa version modifiée, par une double recombinaison homologue (FIGURE 1).

Le génotype des deux mutants a été vérifié par des tests de PCR utilisant des amorces situées de part et d'autre de la délétion, ou à l'intérieur du gène délété. La région chromosomique *fim* des deux mutants est représentée en FIGURE 2. Des tests d'agglutination avec des érythrocytes de poulet ont montré que les deux mutants avaient perdu leur phénotype d'hémagglutination sensible au mannose, caractéristique des fimbriae de type 1.

**FIGURE 2 :** Représentation schématique de la région *fim* de MT78 et des mutants DM34 et PA68



la quasi-totalité de l'opéron *fim* a été enlevée pour DM34. Seul le gène de l'adhésine, *fimH*, a été supprimé dans PA68.

## 1. 2. Caractérisation des mutants

### Colonisation de l'appareil respiratoire

Suivant un schéma expérimental décrit par Brée et al. (1989), les propriétés de colonisation et la pathogénicité des mutants ont été comparées à celle de MT78 par inoculation intra-trachéale à des poulets de 15 jours après inoculation du virus de la Bronchite Infectieuse. Les animaux sont pesés régulièrement, et autopsiés à la fin de l'expérience. Un indice lésionnel est établi; les bactéries sont dénombrées dans un poumon entier broyé, dans la trachée broyée, et leur présence recherchée par culture dans les sacs aériens, le liquide péricardique, le sang du coeur et le foie.

Dans une première expérience réalisée sur poulets SPF, le mutant DM34 (*fim*-) a été comparé à MT78 et à la souche non pathogène EC79. Les numérations bactériennes sont moins élevées dans les poumons des poulets inoculés avec DM34 que chez ceux inoculés avec MT78. On n'observe pas de différences entre DM34 et MT78 dans les numérations bactériennes de la trachée, ou quant à la présence de bactéries dans les organes profonds. Dans une seconde expérience, les mutants DM34 (*fim*-) et PA68 (*fimH*-) ont été comparés à MT78 sur des poulets axéniques. Nous n'avons pas observé de différences entre les trois lots quant à la présence de bactéries dans les poumons, les sacs aériens, ou les organes profonds.

L'observation que le mutant DM34 était moins abondant dans le poumon d'animaux SPF que la souche parentale MT78 est un argument de plus en faveur du rôle des fimbriae dans la colonisation de

l'appareil respiratoire. L'absence de différences entre souches dans la colonisation de l'appareil respiratoire de poulets axéniques pourrait être dû au statut axénique des animaux, chez lesquels les bactéries inoculées trouvent un terrain vierge pour s'établir, sans entrer en compétition avec une microflore déjà installée. Nos résultats laissent suggérer que les fimbriae participent effectivement à la colonisation de l'appareil respiratoire en conditions naturelles, c'est à dire en présence d'une microflore déjà présente.

### Pathogénicité des mutants *fim*

La pathogénicité des mutants a d'abord été évaluée par détermination de la DL50 sur poussins d'un jour. Bien que ce modèle ne puisse se substituer à la colibacillose expérimentale, il permet d'évaluer les propriétés d'invasion systémique des souches, propriétés qui ne sont pas altérées par les modifications de l'opéron *fim*, comme en témoigne la DL50 similaire observée chez les deux mutants et MT78 (~10<sup>3</sup> bactéries)

Les mutants DM34 et PA68 ont ensuite été comparés à MT78 dans le modèle de colibacillose expérimentale décrit plus haut. Dans une première expérimentation, DM34 a été comparé à MT78 et à la souche non pathogène EC79 sur des poulets SPF. Les poulets inoculés avec DM34 ont montré un gain de poids supérieur à ceux inoculés par la souche parentale MT78, restant cependant inférieur aux gains de poids observés avec la souche non pathogène EC79. Les lésions de péricardite et périhépatite étaient plus fréquentes avec MT78 qu'avec le mutant DM34. Dans une seconde expérience comparant les deux mutants à la souche MT78 sur des poulets axéniques, les gains de poids étaient significativement plus élevés chez les animaux inoculés par les mutants DM34 ou PA68 que chez ceux inoculés par MT78. La comparaison des indices lésionnels dans cette expérience n'a pas montré de différences significatives entre les animaux infectés par les trois souches.

Ces observations montrent que DM34 et PA68 sont moins pathogènes que MT78, comme en témoignent les gains de poids régulièrement plus élevés chez les animaux inoculés par les mutants. De plus, bien que l'on n'ait pas observé de différences entre DM34 et MT78 dans la colonisation d'organes profonds chez les animaux SPF, les lésions de péricardite et de périhépatite sont plus fréquentes chez les poulets infectés par la souche sauvage. Cette différence n'a cependant pas été observée chez les animaux axéniques. Il faut remarquer que nous n'avons pas évalué la réponse immunitaire chez les animaux inoculés. L'un des aspects de cette réponse est la phagocytose des bactéries par les macrophages, laquelle serait, selon les auteurs, favorisée (Malaviya

et al. 1994 b) ou au contraire empêchée (Keith et al., 1990) par la présence de fimbriae. Les résultats obtenus jusqu'à présent ne nous permettent pas de favoriser l'une ou l'autre hypothèse pour l'interaction des fimbriae avec la phagocytose *in vivo*.

Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré récemment que les fimbriae de type 1, et particulièrement l'adhésine FimH, suscitent une réponse immunitaire en activant les mastocytes, et en provoquant l'afflux de neutrophiles (Malaviya et al., 1994a 1996). Si ce mécanisme se réalise *in vivo*, les animaux inoculés par les mutants devraient présenter une réponse inflammatoire diminuée, laquelle pourrait se traduire par une atténuation des signes cliniques. C'est d'ailleurs ce que certains auteurs ont observé chez des souris expérimentalement infectées par une souche uropathogène d'*E. coli* ou son mutant *fimH* (Connell et al., 1996). Il est donc vraisemblable que la différence de pathogénicité observée entre MT78 et les deux mutants résulte en partie de différences dans la réponse inflammatoire. D'autres expériences seront nécessaires pour étudier l'importance de la réponse immunitaire dans la détermination de la pathogénicité chez le poulet, et pour préciser le rôle des fimbriae à ce niveau.

### Conclusion

En conclusion, nos résultats montrent que les fimbriae de type 1 ne sont pas strictement indispensables à la colonisation de l'appareil

respiratoire des poulets, mais pourraient favoriser l'établissement d'une population d'*E. coli* dans les conditions naturelles. Les différences de gains de poids chez les animaux expérimentalement infectés montrent une pathogénicité réduite des mutants *fim*. D'autres expériences seront nécessaires pour préciser les étapes du processus pathogénique dans lesquelles les fimbriae sont impliqués.

### Références

- Brée A, Dho M, Lafont JP, 1989, Avian Dis 33, 134-39  
Connell et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93: 9827-32  
Dho, M, Lafont JP, 1982, Avian Dis 26: 787-797  
Dho, M, Lafont JP, 1984, Avian Dis 28 : 1016-25  
Donnenberg, MS, Kaper, JB, Infect Immun 59: 4310-17  
Gross WB. -In Diseases of poultry (Calnek, Barnes, Beard, Reid, Yoder edit.) 9th edn. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 1991:pp 138-144  
Gyimah, JE, Panigrahy B, 1988, Avian Dis 32: 74-78  
Keith et al., 1990, Infect Immun 58: 3448-54  
Krogfelt, KA, 1991, Rev Infect Dis 13: 721-35  
Malaviya et al., 1996, Nature 381: 77-80  
Malaviya et al., 1994a, J Clin Invest 93: 1645-53  
Malaviya et al., 1994b, J Immunol 152: 1907-14  
Marc, D, Dho-Moulin M, 1996, J Med Microbiol 1996; 44: 444-52  
Naveh et al., 1984, Avian Dis 28 : 651-661