

COMPARAISON DE LA RÉACTION DE LA MUQUEUSE NASALE DU PORCELET À L'AGRESSION PAR *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* ET PAR L'ACIDE ACÉTIQUE

Sonia GAGNÉ, Béatrice MARTINEAU-DOIZÉ

Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal,
Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP)
Case postale 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

L'objectif de cette étude était de comparer les lésions de la muqueuse nasale respiratoire induites par *Bordetella bronchiseptica* et par une solution d'acide acétique à 1%. Six porcelets gnotobiotés âgés de trois jours ont reçu une instillation intranasale d'une suspension de *B. bronchiseptica* (souche 110H) et ont été sacrifiés 24, 48 et 96 heures plus tard. Dix autres porcelets gnotobiotés âgés de trois jours ont reçu une ou deux instillations intranasales d'une solution d'acide acétique à 1% et ont été sacrifiés 12, 24 et 72 heures plus tard. Des prélèvements de la muqueuse nasale des cornets nasaux ventraux ont été examinés par microscopies optique et électronique à transmission et à balayage. Les modifications induites par l'acide acétique sont apparues dès 12 heures après l'instillation intranasale et consistaient en de la perte ciliaire, de l'oedème, des exfoliations cellulaires focales et de l'infiltration de cellules inflammatoires. Sur le plan ultracellulaire, du gonflement des mitochondries est la lésion la plus caractéristique. *Bordetella bronchiseptica* n'a induit qu'un oedème et une perte de cils modérés. Une importante colonisation des cils par *B. bronchiseptica* a été observée 96 heures post-infection.

Cette étude a permis de conclure qu'en dépit du fait que les lésions induites par *B. bronchiseptica* et l'acide acétique ne sont pas identiques, leur action sur la muqueuse nasale respiratoire cause de la stagnation du mucus, créant ainsi un environnement nasal favorable à sa colonisation par *Pasteurella multocida*.

comparison of the reaction of the piglet nasal mucosa to the aggression by *Bordetella bronchiseptica* and acetic acid

The aim of the present study was to compare the lesions of the piglet nasal respiratory mucosa induced by *Bordetella bronchiseptica* and 1% acetic acid. Six germ-free piglets were instilled intranasally at the age of three days with a suspension of *B. bronchiseptica* 110H. They were sacrificed 12, 47 and 96 hours later. Ten other piglets received one or two intranasal instillations of 1% acetic acid and were sacrificed 12, 24 and 72 hours later. Samples of the ventral turbinates were examined by light microscopy as well as by transmission and scanning electron microscopy. Modifications induced by acetic acid appeared already 12 hours post-instillation and were loss of cilia, oedema, focal cell exfoliations, mitochondria swelling and inflammatory cell infiltrations. *Bordetella bronchiseptica* induced only a limited oedema and cilia loss. Colonization of the cilia by the bacteria was observed 96 hours post-infection.

We conclude that, although *B. bronchiseptica* and acetic acid do not induce the same modifications of the nasal respiratory epithelium, their action results in mucus stagnation in the nasal cavities. Thus, they induce a nasal environment favorable for colonization by *Pasteurella multocida*.

INTRODUCTION

La rhinite atrophique est une entité clinique d'origine multifactorielle dont la physiopathologie demeure mal comprise. Bien qu'il ait été démontré que *Bordetella bronchiseptica* et *Pasteurella multocida* sont les agents étiologiques majeurs (RUTTER et ROJAS, 1982 ; OYAMADA et al, 1986), l'instillation intranasale de souches toxigéniques de *P. multocida* ne réussit pas à induire la rhinite atrophique. Pour pouvoir reproduire la maladie expérimentalement avec *P. multocida*, il est nécessaire d'effectuer un traitement préalable des cavités nasales des porcelets avec *Bordetella bronchiseptica* ou de l'acide acétique à 1 % (PEDERSEN et ELLING, 1984; MARTINEAU et al, 1985 ; CHANTER et RUTTER, 1989). *Bordetella bronchiseptica* adhère bien aux cellules nasales ciliées (YOKOMIZO et SHIMIZU, 1979 ; JACQUES et al, 1988) et induit une perte de cils, une hyperplasie et une métaplasie des cellules épithéliales, ainsi qu'une augmentation de la production de mucus (ROSS et al, 1963; SHIMIZU et al, 1971; BEMIS, 1986 ; MAGYAR et al, 1988). Le mécanisme par lequel l'acide acétique favorise la colonisation de l'épithélium nasal par *P. multocida* n'est pas connu. PEDERSEN et ELLING (1984) n'ont pas observé de lésions histologiques de la muqueuse nasale suite à l'instillation intranasale d'acide acétique à 1%.

L'objectif de cette étude est de comparer les modifications histologiques et ultrastructurales précoces de la muqueuse nasale du porcelet induites par *B. bronchiseptica* et l'acide acétique. Elle est une première étape dans la compréhension des mécanismes par lesquels *B. bronchiseptica* et certains agents irritants favorisent la colonisation de la muqueuse nasale par *P. multocida*.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux et infections expérimentales

Dix-neuf porcelets gnotobiotiques âgés de 3 jours ont été répartis en quatre groupes (Tableau 1). Les porcelets du groupe A (n=6) ont reçu deux instillations de 0,5 ml d'acide acétique à 1% dans du tampon phosphate (pH 7,0) dans chaque narine, à 24 heures d'intervalle. Ils ont été sacrifiés 12, 24 et 72 heures après la deuxième instillation. Les porcelets du groupe B (n=4)

ont reçu une instillation d'acide acétique à 1% dans chaque narine et ont été sacrifiés 12 et 24 heures plus tard. Les porcelets du groupe C (n=6) ont été inoculés de la même façon avec 0,5 ml d'une solution d'un tampon phosphate contenant 10^8 UFC/ml de *B. bronchiseptica*, souche 110H (lisse et en phase I, fournie par le Dr D.A. Bemis, University of Tennessee, Knoxville, USA). Ils ont été sacrifiés 24, 48 et 96 heures post-inoculation. Les porcelets du groupe D (n=3) ont reçu le tampon phosphate et ont été sacrifiés 24, 48 et 96 heures plus tard.

1.2. Préparation des tissus

Immédiatement après l'euthanasie, les cavités nasales ont été drainées avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5% tamponnée au cacodylate de sodium à 0,1M (pH de 7,3). Le groin a été séparé en deux moitiés et elles ont été immergées dans le fixateur pendant 8 jours, à 4° C. Après décalcification dans de l'EDTA disodique pendant 15 jours, des prélèvements des régions rostrales et caudales des cornets ventraux ont été faits. Ils ont été postfixés pendant 2 heures dans du tétroxyde d'osmium à 2%, déshydratés à l'acétone et enrobés dans de l'épon.

Des coupes semi-fines (1 μ) ont été colorées au bleu de toluidine et observées au microscope optique. Des coupes fines (60-90 nm) ont été colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb et observées au microscope électronique à transmission. Les prélèvements destinés à la microscopie électronique à balayage ont été déshydratés, séchés au point critique et recouverts d'une couche d'or et palladium.

2. RÉSULTATS

2.1. Signes cliniques et examen postmortem

La consommation d'aliment a été la même pour tous les animaux. Les porcelets traités avec l'acide acétique ont présenté de l'éternuement occasionnel.

À l'autopsie, les cavités nasales des porcelets traités à l'acide acétique contenaient une plus grande quantité de mucus. Leur muqueuse avait cependant une apparence normale.

Tableau 1 - Protocole expérimental

Groupe	Traitement	Age au traitement (heures)		Délai entre le dernier traitement et l'euthanasie (heures)		
		72	96	12	24	72
A (n=6) (deux instillations)	acide acétique 1%	72	96	12	24	72
B (n=4) (une instillation)	acide acétique 1%	72		12	24	
C (n=6) 110H	<i>B. bronchiseptica</i>	72			24	48
D (n=3)	contrôles				24	48

2.2. Examen histopathologique

2.2.1. Muqueuse nasale des porcelets contrôlés

La muqueuse respiratoire nasale des porcelets contrôlés (groupe D) était constituée d'un épithélium de surface recouvrant un stroma riche en glandes et en veinules. L'épithélium était pseudostratifié et contenait trois types différents de cellules. La majorité des cellules était de type cylindrique cilié. Ces cellules occupaient toute la hauteur de l'épithélium, c'est-à-dire que leur cytoplasme s'étendait de la lame basale jusqu'à la surface nasale de l'épithélium. Leur surface apicale était couverte d'une bordure en brosse dense et régulière. Les cellules basales étaient également très nombreuses. Elles apparaissaient plus foncées que les cellules ciliées, situées contre la lame basale et leur surface apicale n'atteignait pas la surface nasale. Les cellules calciformes étaient disséminées en nombre variable parmi les autres cellules. Quelques leucocytes mononucléaires et des plasmocytes étaient infiltrés entre les trois types de cellules de l'épithélium.

Au microscope électronique à transmission, les cellules cylindriques ciliées étaient allongées avec leur noyau situé dans la portion basale du cytoplasme. Leur surface apicale était formée de cils et de microvillosités, tandis que des desmosomes et des jonctions serrées étaient présents le long de leur membrane cellulaire latérale. L'appareil de Golgi était situé entre le noyau et la surface cellulaire apicale et les mitochondries étaient accumulées sous la surface cellulaire apicale.

2.2.2. Muqueuse nasale avec l'acide acétique

Au microscope optique, l'épithélium respiratoire des porcelets sacrifiés 12 heures après l'instillation présentait une disorganisation focale, principalement de la perte ciliaire. La surface cellulaire apicale était sphérique et faisait saillie entre les cellules voisines. Les capillaires étaient dilatés et de l'œdème était observé dans la lamina propria et la sous-muqueuse.

L'observation de la surface nasale au microscope électronique à balayage a confirmé la perte de cils et le gonflement cellulaire.

Au microscope électronique à transmission, nous avons observé non seulement de la perte de cils, mais également un raccourcissement des microvillosités.

Les modifications histologiques et ultrastructurales étaient plus étendues et plus sévères chez les porcelets ayant reçu deux instillations plutôt qu'une seule. Par contre, l'augmentation du délai entre l'instillation et l'euthanasie n'augmente pas beaucoup la sévérité des lésions. En effet, lors d'une double instillation, l'épithélium ne contenait plus que quelques cellules ciliées. Au microscope optique, les cellules contenaient de nombreuses vacuoles intracytoplasmiques et les espaces extracellulaires étaient augmentés. A certains endroits, l'épithélium était devenu cuboïdal et à d'autres, stratifié. De plus, des cellules inflammatoires étaient infiltrées entre les cellules épithéliales. L'examen au microscope électronique à transmission a permis de démontrer que les vacuoles correspondaient à des mitochondries gonflées.

2.2.3. Muqueuse nasale avec *B. bronchiseptica*

L'instillation des cavités nasales avec *B. bronchiseptica* n'a pas induit de lésions sévères de la muqueuse nasale. Une perte

modérée de cils, du gonflement cellulaire et de la vasodilatation des capillaires ont été observés 48 heures post-infection. L'observation majeure était la colonisation précoce des cils par *B. bronchiseptica* 96 heures après l'instillation. Elle était très nettement visible aussi bien au microscope optique qu'en microscopie électronique.

3. DISCUSSION

Nous avons mis en évidence que l'instillation intranasale d'acide acétique à 1% induit des lésions inflammatoires de l'épithélium respiratoire nasal dans les quelques heures qui suivent le traitement. Ces lésions sont plus sévères que celles induites par une souche toxigénique de *B. bronchiseptica*. Elles apparaissent déjà 12 heures après l'instillation. La sévérité des lésions est plus marquée suite à une deuxième instillation d'acide acétique et elle n'augmente que légèrement avec le délai entre l'instillation et l'euthanasie.

Une équipe a montré qu'il est possible d'induire une atrophie des cornets nasaux avec *P. multocida* en remplaçant l'infection primaire de *B. bronchiseptica* par de l'acide acétique à 1% (PEDERSEN et ELLING, 1984; ELLING et PEDERSEN, 1985). Toutefois, à la différence de nos observations, ces auteurs ne mettent pas en évidence de lésion cellulaire de la muqueuse nasale. Cette différence peut s'expliquer de trois façons. Premièrement, nous avons examiné la muqueuse nasale en microscopie optique, en microscopie électronique à balayage et à transmission, alors qu'ils se sont limités à la microscopie optique. Deuxièmement, afin d'éviter des interactions entre la flore bactérienne et la muqueuse nasale, nous avons utilisé des porcelets gnotobiotiques et sans colostrum, alors qu'ils ont utilisé des porcelets SPF et conventionnels. Troisièmement, nous avons utilisé des délais très courts entre l'instillation intranasale et le sacrifice des porcelets, c'est-à-dire de 12 à 72 heures, comparés à six jours et plus dans l'expérience de PEDERSEN et ELLING (1984).

L'absence de lésions observées par ces auteurs suggère que l'épithélium respiratoire des cavités nasales s'est régénéré. En effet, la régénération de cette muqueuse peut se faire très rapidement (LOPEZ et al, 1988). Ces derniers ont observé des mitoses cellulaires 20 heures après l'exposition de la muqueuse nasale au sulfure d'hydrogène, tandis que 44 heures après le traitement, l'épithélium respiratoire était totalement régénéré.

L'élimination du mucus contenant des micro-organismes englués vers le pharynx et les narines est réalisé grâce au battement synchrone des cils des cellules épithéliales nasales. La déciliation induite par l'acide acétique à 1% permet d'expliquer à elle seule, l'augmentation de la quantité de mucus dans les cavités nasales. LETELLIER et al (1991) ont montré la présence de récepteurs pour *P. multocida* dans le mucus. Le mucus qui stagne dans les cavités nasales peut donc permettre une intense colonisation de la muqueuse nasale par *P. multocida* suite à un prétraitement à l'acide acétique.

Il a été démontré que l'attachement de *B. bronchiseptica* aux cils est intimement associé à l'arrêt des battements ciliaires (BEMIS et KENNEDY, 1981).

Bien que l'acide acétique et *B. bronchiseptica* ne provoquent pas de modifications identiques de l'épithélium respiratoire nasal, les deux induisent une stagnation du mucus dans les cavités nasales. Donc, les deux induisent un micro-environnement similaire favorable à l'implantation de *P. multocida*.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été subventionné par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada et par le

Conseil de Recherches en Pêche et Agro-alimentaire du Québec.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEMIS D.A., 1986. In «Pathogenesis of bacterial infection in animals.» 137-146. Gyles I., Thoen C.O. éds., Iowa State University Press, Ames, USA.
- BEMIS D.A., KENNEDY S.A., 1981. J. Infect. Dis. 144, 349-354.
- ELLING F., PEDERSEN K.B., 1984. Vet. Pathol. 22, 469-474.
- JACQUES M., PARENT N., FOIRY B., 1988. Can. J. Vet.Res. 52, 283-285.
- LETELLIER A., DUBREUIL D., ROY G., FAIRBROTHER J.M., JACQUES M., 1991. Am. J. Vet. Res. 52, 34-39.
- LOPEZ A., PRIOR M., YONG S., LILLIE L., LEFEBVRE M., 1988. Am. J. Vet.Res. 49, 1107-1111.
- MAGYAR T., CHANTER N., LAX A.J., RUTTER J.M., HALL G.A., 1988. Vet. Microbiol. 18, 135-146.
- MARTINEAU G.P., MARTINEAU-DOIZÉ B., BROES A., 1985. Zbl. Vet. Med. B. 32, 583-592.
- OYAMADA T., YOSHIKAWA T., YOSHIKAWA H.O., SHIMIZU M., NAKAI T., KUME K., 1986. Jap. J. Vet. Sc. 48, 377-387.
- PEDERSEN K.B., ELLING F., 1984. J. Comp. Pathol. 94, 203-214.
- ROSS R.F., DUNCAN J.R., SWITZER W.P. 1963. Vet. Med. 54, 566-570.
- RUTTER J.M., ROJAS X., 1982. Vet.Rec. 110, 531-535.
- SHIMIZU T., NAKAGAWA M., SHIBATA S., SUZUKI K., 1971. Cornell Vet. 61, 696-705.
- YOKOMIZO Y., SHIMIZU T., 1979. Res. Vet. Sc. 27, 15-21.