

## LA RHINITE ATROPHIQUE DU PORC

### Rôle de la capsule de *Pasteurella multocida* dans l'induction des lésions nasales

M. KOBISCH (1), M. JACQUES (2), A. LABBÉ (1), P. MORVAN (1), M. BÉLANGER (2), F. DUGAL (2)

(1) C.N.E.V.A., L.C.R.A.P., U.R. Station de Pathologie Porcine - B.P. 53, 22440 Ploufragan.

(2) Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pathologie et Microbiologie  
CP 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 Canada

La virulence d'une souche de *Pasteurella multocida*, de groupe capsulaire D, possédant l'exotoxine dermonécrosante et celle de son variant acapsulé, ont été étudiées. L'absence de capsule a été vérifiée chez l'une des souches par un examen en microscopie électronique à transmission après un marquage à la ferritine polycationique. Cette propriété est associée à une très nette réduction de la virulence de la bactérie chez la souris. Des porcs indemnes d'organismes pathogènes spécifiés, infectés expérimentalement par la souche capsulée de *Pasteurella multocida*, ont développé des lésions des cornets nasaux caractérisées par une atrophie de l'os et une inflammation de la muqueuse associée à une hyperplasie et à une métaplasie de l'épithélium. L'examen anatomopathologique révèle des lésions nasales de même nature mais d'intensité plus faible chez les porcs infectés par la souche acapsulée.

#### **Atrophic rhinitis in swine : virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida***

The virulence of one toxigenic, capsular type D *Pasteurella multocida* isolate and its noncapsulated variant was evaluated in the present study. Loss of capsule by *Pasteurella multocida*, verified by transmission electron microscopy after polycationic ferritin labeling, was associated with a massive reduction in virulence of the organisms in mice. SPF piglets inoculated intranasally with the capsulated isolate or its noncapsulated variant developed turbinate lesions characterized by bone resorption, and by an inflammation of the mucosa associated with hyperplasia and squamous metaplasia of the epithelium. Infection with the capsulated isolate led to more severe lesions and turbinates atrophy.

## INTRODUCTION

La rhinite atrophique du porc est une maladie à étiologie multifactorielle dans laquelle les agents infectieux reconnus sont *Bordetella bronchiseptica* et *Pasteurella multocida*. Les travaux de RUTTER et al (1982) et ceux de RUTTER (1985) ont montré que *Pasteurella multocida* est impliquée dans l'induction de lésions graves entraînant l'atrophie de l'os nasal alors que *Bordetella bronchiseptica* ne provoque que des lésions modérées. Cependant, l'action conjuguée des deux microorganismes aggrave les lésions qui deviennent alors irréversibles (RUTTER et al., 1982 ; KOBISCH, 1986).

DE JONG et al., (1980) ont montré que seules les souches de *Pasteurella multocida* possédant l'exotoxine dermonécrosante ont un rôle déterminant dans la rhinite atrophique du porc. En effet, la toxine de *Pasteurella multocida*, injectée par voie intrapéritonéale, est capable de produire seule, une atrophie des cornets nasaux (RUTTER et al., 1984). Ces résultats ont été confirmés par les travaux de CHANTER et al., (1989), de RIMLER et al., (1989) et ceux de CHANTER (1990).

Les souches de *Pasteurella multocida* d'origine porcine possèdent généralement une capsule de nature polysaccharidique dont l'épaisseur peut varier (JACQUES et al., 1987). La composition de la capsule peut être également variable selon que la souche de *Pasteurella multocida* appartienne au groupe capsulaire A ou au groupe capsulaire D (CHANTER et al., 1989 ; RIMLER et al., 1989).

Le but de la présente étude est d'évaluer le rôle de la capsule de *Pasteurella multocida* dans la virulence, en utilisant une souche de groupe capsulaire D possédant l'exotoxine dermonécrosante et une souche mutante dépourvue de capsule.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Deux souches de *Pasteurella multocida* nous ont été transmises par R.B. RIMLER, National Animal Disease Center, USDA, Ames (RIMLER et al., 1986). La souche 4275A appartient au groupe capsulaire D, la souche 4275 B est son variant acapsulé, elles possèdent une exotoxine protéique. Le mutant dérive d'une série de passages successifs sur gélose dextrose starch et par sélection des colonies apparaissant bleues en lumière oblique. Les bactéries sont multipliées en milieu "tryptic soy agar" (TSA) sans adjonction de sang ou de sérum pendant 18 heures à 37°C.

### 1.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les bactéries sont marquées à la ferritine polycationique, ce qui permet une bonne conservation du matériel capsulaire (JACQUES et al., 1987).

### 1.3. Production de l'exotoxine protéique dermonécrosante.

La production de l'exotoxine protéique dermonécrosante est mise en évidence par ELISA en utilisant des anticorps monoclonaux M815 et E816 (DAKOPATTS, GLOSTRUP, DENMARK) selon la méthode décrite par FOGED et al., 1988.

### 1.4. Essais de virulence chez la souris.

Les tests de virulence sont effectués en injectant les bactéries, par voie intrapéritonéale, à des souris mâles de 19 à 21 g (BELANGER et al., 1990). Les bactéries sont multipliées pendant une nuit, récoltées et mises en suspension dans du PBS, à une concentration de  $10^8$  UFC/ml. La virulence est estimée en déterminant la dose létale 50 à l'aide de groupes de 5 souris (REED et al., 1938).

### 1.5. Infection expérimentale de porcelets

24 porcelets Large White âgés de 3 semaines et indemnes d'organismes pathogènes spécifiés sont sevrés, répartis en 3 lots de 8 porcelets dans 3 animaleries protégées et maintenus à l'abri des contaminations externes.

Deux groupes de 8 porcelets reçoivent respectivement *Pasteurella multocida* 4275A ou 4275 B. L'infection se déroule durant 4 jours consécutifs, par instillations nasales, à raison de 0,5 ml/narine d'une suspension bactérienne contenant  $10^6$  UFC/ml (1er jour) et  $10^9$  UFC/ml (3 jours suivants).

Le troisième lot de porcs reçoit le milieu de culture dans des conditions identiques et constitue le lot témoin.

Les porcelets sont examinés quotidiennement, les symptômes cliniques sont relevés et plus spécifiquement la température corporelle et les éternuements. La consommation alimentaire et la prise pondérale sont évaluées chaque semaine. Les animaux sont sacrifiés deux semaines après la première infection. Les organes et voies respiratoires observés, des examens anatomopathologiques sont effectués. *Pasteurella multocida* est recherchée, chez tous les porcs, au niveau des poumons, amygdales et cavités nasales.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Observation des bactéries en microscopie électronique à transmission.

Les examens en MET permettent de vérifier l'absence ou la présence du matériel capsulaire par un marquage à la ferritine polycationique. La souche capsulée 4275 A présente une couche dense de grains de ferritine de 40-60 nm alors que le variant 4275B est totalement dépourvu de matériel capsulaire.

Le variant acapsulé est resté stable, aucune réversion vers le phénotype d'origine n'a été observée.

### 2.2. Mise en évidence de l'exotoxine.

Les deux souches de *Pasteurella multocida* possèdent une exotoxine protéique dermonécrosante. L'ELISA (lecture de la DO à 414 nm) détecte une quantité analogue de toxine chez les deux souches (tableau 1).

### 2.3. Tests de létalité chez la souris.

Le tableau 1 montre que la virulence chez la souris de la souche 4275A est de l'ordre de  $10^7$  fois plus marquée que celle de son variant acapsulé.

**Tableau 1 - Résultats : examen des bactéries en microscopie électronique, recherche de la toxine et tests de létalité chez la souris.**

souches de <i>P. multocida</i>	capsule	toxine (a)	DL 50 (b)
4275 A	+	0,32	$7,1 \times 10^1$
4275 B	-	0,40	$7,6 \times 10^8$

(a) production de l'exotoxine protéique dermonécrosante, détectée par ELISA et exprimée en densité optique à 414 nm. Le contrôle négatif a une valeur  $<0,05$ .

(b) Virulence chez la souris (DL50) exprimée en UFC.

#### 2.4. Infection expérimentale de porcelets.

Les symptômes cliniques observés diffèrent assez peu d'un groupe à l'autre. La température corporelle, qui chez des animaux de cet âge est normalement de  $39,5^\circ\text{C}$ , oscille entre  $40,5^\circ\text{C}$  et  $41^\circ\text{C}$  entre 72 et 96 heures après la première instillation, dans les deux lots. Des étternuements sont observés dans les deux groupes, une semaine après la dernière instillation (leur nombre est sensiblement plus élevé dans le lot 4275A). L'évolution pondérale des animaux est analogue dans les trois lots. En effet, le gain moyen quotidien est de 502 g (lot 4275A), 487 g (lot 4275B), et de 558 g (lot témoin). L'analyse de la variance ne révèle pas de différence significative.

L'observation macroscopique des cornets nasaux des animaux du lot 4275B ainsi que ceux des porcs du lot témoin ne montre aucune lésion (tableau 2). Cinq porcs du lot 4275 A présentent une atrophie des cornets nasaux et deux d'entre eux montrent

une déviation de la cloison médiane. Les examens anatomopathologiques révèlent, chez tous les animaux de ce lot, mais à des degrés variables, une légère congestion de la muqueuse pituitaire associée à une hyperplasie et une métaplasie de l'épithélium, une inflammation du chorion et un amincissement de la lame osseuse. Les lésions les plus sévères s'accompagnent d'une disparition de la lame osseuse. Des lésions de même nature mais d'intensité plus faible sont observées chez les porcs du lot 4275B : la lame osseuse est réduite mais ne disparaît pas totalement. Les autres organes sont indemnes de lésions.

*Pasteurella multocida* n'est retrouvée que chez l'un des porcs du lot 4275A, au moment du sacrifice. Des biopsies effectuées au niveau des amygdales de 3 porcs de chacun des lots, une semaine après l'infection ont révélé des cultures positives dans le lot 4275A alors qu'un prélèvement de mucus nasal sur ces mêmes animaux s'est montré négatif.

**Tableau 2- Examens post-mortem et résultats bactériologiques**

lots d'animaux	absence de lésions des cornets nasaux (n)	atrophie des cornets nasaux (n)	gravité de l'atrophie des cornets nasaux (n)		déviation de la cloison médiane (n)	lésions autres organes (n)	réisollements de <i>P. multocida</i> (b) (c)		
			2 à 4 (a)	5 à 8			A	CN	P
4275A	3	5	3	2	2	0	1 (2)	1 (3)	0
4275B	8	0	0	0	0	0	0	0	0
témoin	8	0	0	0	0	0	0	0	0

(n) nombre de porcs concernés

(a) les lésions des cornets nasaux sont évaluées de 0 à 4 par volute nasale (soit 16 au total)

(b) A = amygdales - CN = cavités nasales - P = poumons

(c) le chiffre ( ) indique le nombre de colonies réisolées par boîte de gélose à partir de 50 $\mu\text{l}$  d'inoculum

(1) de 1 à 10 colonies, (2) de 11 à 50 colonies, (3) plus de 50 colonies.

### 3. DISCUSSION

Une souche de *Pasteurella multocida* de groupe capsulaire D et son mutant acapsulé ont été étudiées afin d'évaluer le rôle de la capsule de nature polysaccharidique dans la virulence. L'observation des bactéries en microscopie électronique à transmission montre que la souche capsulée est entourée

d'un matériel capsulaire dont l'épaisseur est caractéristique du type D (JACQUES et al., 1987). Le variant ne possède pas de capsule mais a les mêmes propriétés phénotypiques que la souche capsulée et produit une exotoxine dermonécrosante.

La souche de *Pasteurella multocida* acapsulée s'est révélée peu pathogène pour la souris. Dans ce modèle d'infection par

voie intrapéritonéale, les structures de surface, telles que la capsule, permettent à la bactérie de résister à la phagocytose. En effet, il a été montré que la capsule de *Pasteurella multocida* était responsable, au moins partiellement, de la résistance à la phagocytose : du type A aux macrophages de dinde (HARMON et al., 1991) et du type D aux polynucléaires neutrophiles de lapin (RUSH, 1989). L'infection expérimentale de porcelets par la voie nasale, proche du mode d'infection naturelle, nous a permis de mieux évaluer le rôle du matériel capsulaire dans la virulence. Les lésions microscopiques sont de même nature dans les deux lots, quoique nettement moins sévères dans le lot infecté par le variant acapsulé 4275B. De plus, l'atrophie des cornets nasaux n'est macroscopiquement observée que dans le lot capsulé 4275A. La production de toxine protéique dermonécrosante par les deux souches de *Pasteurella multocida* est vraisemblablement responsable des lésions histologiques alors que la présence de la capsule explique la sévérité des lésions et l'atrophie des cornets nasaux observées dans le lot 4275A. Il ne nous a pas été possible de vérifier si la bactérie 4275B était toujours acapsulée après un passage chez le porcelet puisque nous ne l'avons réisolée ni sur l'animal vivant, une semaine après l'infection, ni sur l'animal mort, à la fin de l'expérience. La multiplication de la souche capsulée a également été réduite chez le porcelet.

Les travaux de JACQUES et al., (1993) montrent que des souches acapsulées de *Pasteurella multocida* adhèrent significativement plus que des souches capsulées, aux cellu-

les d'anneaux de trachée de porc maintenues 6 heures en survie. (JACQUES et al., 1991) ont précédemment montré que la présence de la capsule chez une autre *Pasteurellaceae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, diminue l'adhérence *in vitro* de la bactérie, aux cellules épithéliales de trachée de porcs. Ces résultats suggèrent que dans les conditions décrites par ces auteurs, la capsule masque les composants externes de la bactérie impliqués dans l'adhérence qui constitue l'une des étapes de la colonisation donc de la virulence. Cependant, l'expérience réalisée chez les porcelets dans la présente étude, montre que la capsule est également un facteur de virulence dans l'induction de la rhinite atrophique puisque la souche capsulée a induit les lésions nasales les plus graves. Les cellules trachéales de porc maintenues en survie et infectées par *Pasteurella multocida* constituent un excellent modèle d'étude *in vitro* mais les relations entre la bactérie et les cellules hôtes *in vivo* font vraisemblablement intervenir d'autres phénomènes fort complexes. Ces relations mériteraient d'être approfondies afin de mieux connaître la pathogénie de l'infection qui continue à préoccuper les producteurs de porcs malgré la mise en place de la vaccination chez les animaux reproducteurs.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Commission permanente de Coopération Franco Québécoise, le Ministère des Affaires Etrangères (France) et le Ministère des Affaires Internationales (Québec) qui ont participé au financement de cette étude.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELANGER M., DUBREUIL D., HAREL J., GIRARD C., JACQUES M., 1990. Infect. Immun., 58, 3523-3530.
- CHANTER N., RUTTER J.M., 1989. In *Pasteurella and Pasteurellosis*, 161-195. ADLAM and RUTTER ed., Academic Press., London
- CHANTER N., 1990. Can. J. Vet. Res., 54, 45-47.
- DE JONG M.F., OEI H.L., TETENBURG G.J., 1980. Proc. IPVS Congress, Copenhagen, p. 211.
- FOGED N.T., NIELSEN J.P., PEDERSEN K.B., 1988. J. Clin. Microbiol., 26, 1419-1420.
- HARMON B.G., GLISSON J.R., LATIMER K.S., STEFFENS W.L., NUNNALLY J.C., 1991. Am. J. Vet. Res., 52, 1507-1511.
- JACQUES M., FOIRY B., 1987. J. Bacteriol., 169, 3470-3472.
- JACQUES M., BELANGER M., ROY G., FOIRY B., 1991. Vet. Microbiol., 27, 133-143.
- JACQUES M., KOBISCH M., BELANGER M., DUGAL F., 1993. accepté Infect. Immun.
- KOBISCH M., 1986. Journées Rech. Porcine en France, 18, 331-340.
- RIMLER R.B., BROGDEN K.R., 1986. Am. J. Vet. Res., 47, 730-737.
- RIMLER R.B., RHOADES K.R., 1989. In *Pasteurella and Pasteurellosis*, 37-73, ADLAM and RUTTER ed., Academic Press., London
- REED L.J., MUENCH H., 1938. Am. J. Hyg., 27, 493-497.
- RUSH H.G., 1989. Vet. Microbiol. 20, 79-87.
- RUTTER J.M., ROJAS W., 1982. Vet. Rec., 110, 531-535.
- RUTTER J.M., MACKENZIE A., 1984. Vet. Rec., 114, 89-90.
- RUTTER J.M., 1985. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 29, 239-279.