

2 m 11. 2855.3

Université de Montréal

Évaluation de la capacité adhésive des isolats
d'*Escherichia coli* associés à la cellulite aviaire

par

Benoît Leclerc

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Novembre 2000

©Benoît Leclerc, 2000



SF

607

N54

2001

N. 002

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Évaluation de la capacité adhésive des isolats
d'*Escherichia coli* associés à la cellulite aviaire

présenté par

Benoît Leclerc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dre Martine Boulianne, présidente du jury

Dr Serge Messier, directeur de recherche

Dr John M. Fairbrother, codirecteur de recherche

Dr Sylvain Quessy, membre du jury

Mémoire accepté le:.....

SOMMAIRE

À partir d'une collection de 1112 isolats de *E. coli* retrouvés dans l'environnement des oiseaux et isolés de lésions de cellulite chez le poulet de chair au Québec, 100 isolats ont d'abord été testés par hémagglutination. Quarante de ces 100 isolats ont été évalués par une épreuve de liaison à la fibronectine soluble par cytofluorométrie et pour leur adhérence sur coupes congelées de peau de poulet par immunofluorescence. Trente isolats provenaient de lésions de cellulite. Ils étaient tous de sérotype O78:K80 alors que les dix autres isolats provenaient de l'environnement et de lésions de cellulite et étaient de sérotypes variés. Quatre isolats de sérotype O78:K80, sélectionnés d'après une faible, une moyenne, une bonne et une forte adhérence sur les milieux de culture, ont été évalués pour leur adhérence sur coupes de peau de poulet fixées à la formoline par immunofluorescence. L'isolat ayant démontré la meilleure adhérence était ensuite révélé par la coloration au Fast-Red. Pour évaluer la capacité adhésive de 40 isolats, nous les avons cultivés sur milieux de culture pour qu'ils puissent exprimer les fimbriae F1, P, curli ou Tsh. Les résultats ont montré que tous les isolats adhéraient sur coupes de peau de poulet congelée. Nous avons observé que l'adhérence est de plus en plus importante à mesure que l'on se dirige vers les couches profondes du tissu. L'adhérence sur coupes de peau congelée montre que les isolats provenant de lésions de cellulite de lots à forte prévalence de cellulite adhèrent mieux aux couches du tissu que les autres isolats après avoir été cultivés sur CFA à 26°C. Suite à la croissance sur TSAB à 37°C, une différence significative entre des isolats de lots à forte prévalence et ceux de lots à faible prévalence

fut notée. Suite à la croissance dans le TSB à 37°C, les isolats d'un des lots à forte prévalence adhéraient mieux que les autres isolats. Bien que le test de liaison à la fibronectine soluble montre que quelques uns de ces 40 isolats lient faiblement la fibronectine, nous croyons que la fibronectine n'est pas une protéine de liaison pour les isolats de cellulite. Les résultats du test d'hémagglutination montrent que les isolats appartenant à un des lots à forte prévalence étaient sensibles au mannose alors que les isolats appartenant à l'autre lot à forte prévalence n'avaient démontré aucune activité hémagglutinante. Ainsi, les résultats montrent que des isolats provenant de lots à forte prévalence adhèrent mieux aux différentes couches du tissu tégumentaire que d'autres, et que cette adhérence varie selon l'expression d'adhésines spécifiques aux conditions et aux milieux de culture utilisés. L'immunohistochimie a permis de mettre en évidence la localisation des isolats aviaires à travers le tissu cutané.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ANNEXES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
DÉDICACE.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
1. INTRODUCTION.....	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1. La cellulite chez le poulet de chair.....	5
2.1.1. Historique.....	5
2.1.2. Définition.....	6
2.1.3. Description anatomique.....	6
2.1.3.1. Apparence externe.....	7
2.1.3.2. Apparence interne.....	7
2.1.3.3. Apparence sur coupes histologiques.....	8
2.1.4. Évolution des lésions et système immunitaire.....	8
2.1.5. Étiologie de la cellulite.....	9

2.1.5.1. Implication bactérienne.....	9
2.1.5.2. Implication des facteurs de risque.....	10
2.1.5.2.1. Facteurs physiologiques.....	11
2.1.5.2.2. Facteurs d'élevage.....	12
2.1.6. Reproduction expérimentale.....	14
2.1.7. Faits socio-économiques.....	14
2.1.8. Élément de médecine réglementée.....	16
2.2. Caractéristiques des souches d' <i>Escherichia coli</i> associées à la cellulite.....	17
2.2.1. Implication dans diverses maladies infectieuses et types d'habitats.....	17
2.2.2. Facteurs de virulence.....	18
2.2.2.1. Sérotypes.....	18
2.2.2.2. Résistance à l'effet bactéricide du sérum.....	20
2.2.2.3. Production de l'aérobactine.....	20
2.2.2.4. Colicines.....	21
2.2.2.5. Adhésines.....	22
2.2.2.5.1. Fimbriae de type 1/type 1 apparenté.....	23
2.2.2.5.2. Fimbriae P/P apparenté.....	24
2.2.2.5.3. Curli et Tsh.....	25
2.3. Structures du tégument aviaire.....	27
2.3.1. Tissu superficiel.....	27
2.3.2. Tissu profond.....	28

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	30
Leclerc, B., J. M. Fairbrother, M. Boulianne, and S. Messier. Evaluation of the adhesive capacity of <i>Escherichia coli</i> isolates associated with avian cellulitis. Avian Dis. (En préparation).....	31
4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	59
5. CONCLUSIONS.....	68
6. BIBLIOGRAPHIE.....	71
7. ANNEXES.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Article 1

- I. Agglutination patterns in the presence or absence of D-mannose of 100 avian *Escherichia coli* isolates from flocks with high or low prevalence of cellulitis.....47

- II. Positive fluorescence ratio ($FR \geq 2.0$) for isolates from flocks with high or low prevalence of cellulitis grown under different culture conditions.....48

- II. Adherence to skin sections of *E. coli* isolates from flocks with high or low prevalence of cellulitis, grown under different culture conditions.....49

- IV. Adherence to skin tissue sections of *E. coli* isolates in relation to serogroup, following bacterial growth in different culture conditions.....50

LISTE DES FIGURES

Revue de littérature

- Figure 1. Section transversale de peau d'un poulet mâle de type Leghorn de
150 jours d'âge (d'après Lucas et Stettenheim, 1972).....29

Article 1

- Figure 1. *E. coli* isolate 45A9 adhering at a 2+ score to the cutaneous layer of
chicken skin frozen sections, after growth in TSB at 37°C.
Bacteria were demonstrated by indirect immunofluorescence.....51

- Figure 2. Adherence of *E. coli* isolate 45A7 in aggregate mass formations around
muscle fibers of formalin fixed chicken skin sections, after growth in CFA
at 26°C. Bacteria were demonstrated by Fast-Red staining.....51

LISTE DES ANNEXES

- I. Sélection du nombre d' isolats de *E. coli* provenant de l'environnement
et des lésions de cellulite.....xiv

- II. Coupe histologique de peau de poulet sain colorée au HPS montrant
les différentes couches du tissu cutané.....xvi

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATCC :	"American Type Culture Collection".
BSA :	Albumine sérique bovine.
CFA :	"Colonization Factor Antigen".
CMH-I :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.
CMH-II :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.
FITC :	"Fluorescein Isothiocyanate"
FR :	"Fluorescence ratio".
HA ~:	"Negative hemagglutination".
LPS :	"Lipopolysaccharide".
MAC :	"Membrane Attack Complement".
MSHA :	"Mannose-sensitive hemagglutination".
MRHA :	"Mannose-resistant hemagglutination".
OMPs :	"Outer Membrane Proteins".
PBS :	Solution saline de tampon phosphate.
sFN :	Fibronectine soluble.
THB :	Bouillon Todd-Hewitt.
TSAB :	Gélose trypticase de soya au sang.
TSB :	Bouillon trypticase de soya.
UTIs :	"Urinary tract infections".

DÉDICACE

Je veux ce que je veux,
Parce que je veux être heureux.

Souvent, je pense à mes aïeux,
Qui ont toujours vu en moi, un être précieux
Au caractère vertueux et valeureux.

Moi qui suis ardent et joyeux,
Ressemble d'une certaine façon au feu,
Qui ne cesse de faire le fougueux,
Parmi les moins soucieux,
Et les moins consciencieux.

Je peux faire ce que je veux,
Mais, pour penser en mieux,
Il faut que je sache ce que je veux.

Comme j'aime mes très chers voeux,
Même s'ils sont peu nombreux,
Ils sont tellement sérieux,
À l'égard de mes yeux,
Qu'ils me décrivent ambitieux.

La formule de l'âme est-elle le secret de Dieu ?
Sommes-nous fait pour bien vivre à deux ?
Pour connaître la vie, faut-il vivre vieux ?

La vie se résume-t-elle à un jeu ?
Qui comporte plein de noeuds,
Avec ses détours et ses retours laborieux,
Qui pourraient nous conduire à des endroits douteux,
Bien qu'on préfère vivre dans l'harmonie des lieux.

La vie se résume-t-elle à un enjeu ?
Qui comporte plein de creux,
Avec ses instants éphémères malheureux,
Et ses quelques rares moments bienheureux,
Qui sont vécus par les humains paresseux.

Je suis comme le soleil chaleureux,
Qui, à certains jours, est silencieux,
Ce qui fait de lui un être si mystérieux.

Je veux ce que je veux,
Parce que ce que je veux, c'est réaliser mes voeux...

Between Black and White

Benoît Leduc

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont collaboré de près comme de loin à l'étude de mon projet de recherche.

Je voudrais d'abord remercier le Dr Serge Messier pour sa généreuse contribution tout au long de mon projet de maîtrise. Également, je remercie le Dr John M. Fairbrother pour avoir collaborer au projet et pour ses bons conseils judicieux.

Aussi, je tiens à souligner la participation du Dre Martine Boulianne ainsi que du Dr Robert Higgins au comité conseil et à leur support d'ordre général.

Je souhaite mentionner la généreuse et précieuse aide technique fournie par Clarisse Desautels et par Serge Sénéchal respectivement.

Je tiens à mentionner la contribution du Dr Guy Beauchamp, du Dre Anne Vibien, de Michèle Tessier, de Manon Caron, de Francine Bernard et de Annette Filion-Deschênes au projet et aussi l'aide de Jacinthe Cardin et le personnel de diagnostic.

Finalement, merci au CORPAQ et à la FPVQ qui ont permis la réalisation du projet grâce à leur aide financière, et au Ministère de l'Éducation de l'aide financière aux études de m'avoir, durant ces années, soutenu financièrement.

1. INTRODUCTION

Au Canada, depuis 1996, la cellulite chez le poulet de chair a été identifiée comme la cause la plus importante de rejets de carcasses parmi les syndromes cliniques listés dans la colibacillose aviaire. Les pertes économiques réelles notées au niveau national ne sont pas connues. Récemment aux États-Unis, il a été mentionné que la cellulite était responsable de pertes directes de carcasses d'oiseaux condamnées, estimées entre 70 et 80 millions de dollars U.S. annuellement. La prévalence de la cellulite et les pertes encourues d'année en année continuent d'augmenter en Amérique du Nord malgré les recherches qui y sont effectuées pour contrer cette maladie.

Depuis que la cellulite est reconnue comme une cause importante de condamnation à l'abattoir, plusieurs facteurs associés à la maladie ont été identifiés et évalués afin de connaître leur impact. Il y a des facteurs physiologiques, tel que le status immunologique, et des mécanismes génétiques qui sous-tendent essentiellement le métabolisme de l'oiseau ainsi que le degré d'emplumement. Il y a aussi les facteurs d'élevage tels que la présence de microorganismes, l'acquisition et la nature des égratignures cutanées, la santé générale du troupeau, la densité, la diète et la nutrition.

Plusieurs publications ont montré que *Escherichia coli* est l'agent étiologique le plus souvent isolée des lésions de cellulite chez les oiseaux (75 à 98% des isollements). Parmi les souches de *E. coli* prélevées, le sérotype O78:K80 est de loin le plus fréquemment identifié de tous les sérotypes connus, suivi du O2:K1. La plupart des sérotypes sont spécifiques d'espèces. Cependant, le sérotype O78:K80 a été associé aux souches extraintestinales et aux souches ETEC chez l'humain. Il a été démontré qu'un seul sérotype peut causer des lésions multiples chez un même oiseau. À l'heure

actuelle, la pathogénie de l'infection n'est pas connue, et il n'est pas possible de savoir si les lésions des maladies associées à la cellulite (e.g. polysérosite) apparaissent avant, après ou simultanément, rendant ainsi le diagnostic à l'abattoir difficile.

L'objectif du présent projet est d'étudier la capacité adhésive des isolats provenant de lots à forte et à faible prévalence de cellulite au moyen de techniques *in vitro*. Les buts étaient de mesurer la liaison des isolats à la fibronectine soluble d'origine humaine par cytofluorométrie afin d'évaluer la capacité adhésive des isolats à cette protéine. Nous voulions aussi évaluer l'adhérence des isolats aux sections de peau de poulet congelées et aux sections de peau de poulet fixées à la formaline par immunofluorescence et par la coloration au Fast-Red afin d'évaluer la capacité adhésive des isolats associées aux protéines de la matrice extracellulaire du tissu cutané.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1. La cellulite chez le poulet de chair

2.1.1. Historique

La cellulite est une condition qui a été rapportée dans la littérature deux fois pour la première fois par Bergmann et Scheer (1979) en Allemagne sous le terme de dermatite profonde. Également rapportée par Randall et coll. (1984), cette condition a été décrite au départ comme une dermatite. La dermatite à laquelle ces auteurs font référence se caractérise par un épithélium intact et se distingue de l'appellation générale «dermatite» par une inflammation restreinte aux tissus localisés dans la région sous-cutanée. Bien que cette condition ait été initialement considérée comme une maladie de peu d'importance économique, dans un élevage, un taux de condamnation à l'abattoir de plus de 20% a été observé en 1976 (Randall et coll., 1984). Depuis, la cellulite est devenue une condition régulièrement rencontrée dans plusieurs pays (Vaillancourt et coll., 1992). Bien qu'il n'y ait eu aucune publication officielle en France, à partir de 1986 le nombre de cas a augmenté (Etteradossi, 1989). En 1988, aux États-Unis, le USDA a identifié le "IP (Inflammatory process)" comme une condition de condamnation et, trois ans plus tard, une première publication en fait état (Morris, 1991). En 1981, la direction de l'hygiène des viandes d'Agriculture Canada reconnaît une nouvelle condition de la peau chez les poulets (Kumor et coll., 1998). À partir de 1986, la cellulite a été officiellement distinguée cliniquement de la dermatite (Goodhope et coll., 1992). L'étude de Bisailon et coll. (1988) a montré que dans un abattoir sous inspection fédérale au Canada, les diagnostics posés sur des carcasses de poulets confisquées atteintes de cellulite ou de d'autres conditions ne sont pas unanimes, ce qui est partiellement due à l'imprécision des critères utilisés pour identifier les carcasses propres à la consommation humaine.

2.1.2. Définition

La cellulite se définit comme un processus inflammatoire qui peut conduire à la présence d'exsudat allant de purulent jusqu'à fibrino-caséux dans les tissus sous-cutané profonds (Messier et coll., 1993; Norton, 1997). Cette condition est de plus en plus rencontrée chez le poulet de chair (Vaillancourt et coll., 1992; Olkowski et coll., 1999). La cellulite, terme général qui se rapporte à une inflammation des tissus mous, atteint particulièrement les tissus sous-cutanés lâches (Hoerr, 1988) et peut parfois s'étendre dans les muscles (Norton, 1997).

2.1.3. Description anatomique

Chez le poulet, l'étendue des lésions varie considérablement allant de 0.55 cm² jusqu'à 218.9 cm² (Onderka et coll., 1997). Une étude mentionne que 75% des lésions de cellulite ont une zone cutanée de 3 à 6 cm de diamètre (Messier et coll., 1993). Les lésions se localisent le plus souvent près du cloaque et peuvent s'étendre à l'intérieur de la cuisse (Vaillancourt et coll., 1992; Quessy et Messier, 1992) et même jusqu'à la poitrine et le dessous des ailes dans les cas les plus marqués (Quessy et Messier, 1992). Les lésions de cellulite sont principalement unilatérales et localisées dans la région abdominale (Elfadil et coll., 1996c), ce qui fait qu'elles sont observées souvent du côté antéro-latéral de la patte sous l'articulation fémoro-tibiale (Randall et coll., 1984; Vaillancourt et coll., 1992). Dans les cas les plus sévères, le dos et les flancs peuvent être affectés (Vaillancourt et coll., 1992).

2.1.3.1. Apparence externe

Il est difficile de détecter dans un élevage les oiseaux atteints de cellulite car les lésions ne sont pas apparentes lorsque la peau est recouverte de plumes et, en plus, les oiseaux ne montrent aucun signe clinique de la maladie (Glünder, 1990). C'est ce qui explique pourquoi les lésions sont habituellement observées seulement dans les abattoirs (Hoerr, 1988), plus précisément après le passage dans la déplumeuse. Les lésions sont caractérisées par une augmentation modérée à marquée de l'épaisseur la peau (Messier et coll., 1993) révélant ainsi un aspect d'œdème ou d'enflure cutané. La surface de la peau épaissie prend une couleur jaune à brun rougeâtre à l'endroit où les égratignures se retrouvent (Goodhope et coll., 1992) due à la formation de plaques internes (Glünder, 1990) qui parfois s'étendent au niveau de la peau externe en des croûtes d'apparence jaune-brunâtres (Messier et coll., 1993).

2.1.3.2. Apparence interne

En incisant la peau, on observe des plaques minces et larges d'exsudats fibrineux purulents caséux jaunâtres dans le tissu sous-cutané sous-jacent aux lésions de la peau (Messier et coll., 1993). Ces plaques sont le résultat d'une inflammation développée au niveau du gras sous-cutané (Glünder, 1990). Lorsque les lésions sont très extensives, des pétéchies dans les muscles sous-jacents sont remarquées et parfois l'exsudat peut être séro-sanguinolant (Quessy et Messier, 1992). Selon l'âge de la lésion, des degrés variables d'œdème sous-cutané, d'hémorragie musculaire et d'exsudat sous-cutané sont observés, lesquels peuvent être localisés ou étendus sous la peau lésée (Goodhope et coll., 1992).

2.1.3.3. Apparence sur coupes histologiques

L'étude de Messier et coll. (1993) rapporte que l'observation microscopique des tissus de la peau révèle au pourtour des lésions une hyperkératose modérée et une hyperplasie de l'épiderme, marquées par un épaissement fibreux du derme avec présence de néovascularisation et infiltration par des cellules mononucléaires et des hétérophiles de façon diffuse. Plus tard dans la pathologie, on peut observer un grand nombre de granulomes coalescents dans les tissus sous-cutanés. Ces granulomes sont causés par l'accumulation d'exsudats fibrineux caséux lesquels sont entourés par une mince couche de cellules géantes épithéliales et multinucléées et par quelques couches de cellules mononucléaires mêlées aux fibroblastes et aux fibres de collagène. Cette accumulation d'exsudat est composée de débris cellulaires, de tissu fibreux, de cellules inflammatoires et d'un grand nombre d'amas de courts bacilles à Gram négatif.

2.1.4. Évolution des lésions et système immunitaire

Dans ses essais de reproduction expérimentale, Eterradosi (1989) a observé que suite à l'infection cutanée par des souches pathogènes, quelques points d'épaississement interfolliculaires au premier jour deviennent confluents en plaque au deuxième jour puis les lésions cutanées externes évoluent par un assèchement progressif jusqu'à la desquamation au cinquième jour. L'épaississement des couches profondes survient au sixième et septième jour lorsqu'il n'y a pas de mort par septicémie. Simultanément à la régression des lésions, un épaissement des couches profondes du derme devient perceptible par palpation ainsi que par la présence d'amas sous-cutanés associés à des dépôts de fibrine et de leucocytes qui surviennent plus tard. Par la suite, la desquamation

de croûtes brunâtres fait disparaître les lésions externes asséchées et se produit en sept à quatorze jours. Au neuvième jour, l'évolution ultérieure des lésions consiste en une réparation progressive des tissus superficiels, terminée au onzième jour où une organisation conjonctive du derme et une disparition des phénomènes inflammatoires a lieu. Ce processus de guérison laisse parfois persister, en région profonde, des abcès enkystés par du tissu conjonctif et des lésions cicatricielles périmusculaires, encore observées au quatorzième jour (Etteradossi, 1989). Donc, selon le moment où survient l'infection, les lésions visibles à l'abattoir seront plus ou moins extensives et de chronicité variable.

Actuellement, personne ne sait pourquoi certaines souches pathogènes de *E. coli* ont la capacité de causer de tels dommages tissulaires ni quelle est la cause de la réaction immunitaire locale subséquente (Shane, 1996).

2.1.5. Étiologie de la cellulite

Actuellement, les causes de la cellulite ne sont pas toutes connues. On sait cependant que les égratignures cutanées et la présence de micro-organismes augmentent les chances que se développe chez les poulets de chair les lésions caractéristiques de la cellulite (Peighambari et coll., 1995a; Elfadil et coll., 1996b, c et d; Gomis et coll., 1997a; Summers, 1997; Norton, 1999).

2.1.5.1. Implication bactérienne

L'agent étiologique le plus souvent isolé au niveau des lésions et impliqué dans la maladie est *Escherichia coli* (Randall, 1984; Valentin et Willsch, 1987). Au Québec,

Messier et coll. (1993) rapportent dans leur étude que, sur 109 oiseaux avec des lésions, 96 (88,1%) étaient positifs pour l'isolement de *E. coli* au site de la lésion. Chez 60 de ces oiseaux, on retrouvait uniquement *E. coli*. En Saskatchewan, Goodhope et coll. (1992) confirment dans leur rapport qu'à partir de l'exsudat sous-cutané de 39 des 40 carcasses (97,5%) de chaque troupeau sélectionné, *E. coli* était isolé en culture pure. En France, Etteradossi (1989) a montré dans son étude bactériologique que parmi les 95 sujets affectés de cellulite, 78 (82,1%) étaient infectés par *E. coli*. En Allemagne, Valentin et Willsch (1987) ont rapporté que sur 213 prélèvements à partir de lésions, 164 (77,0%) se sont avérés positifs pour l'isolement de *E. coli*. D'autres études ont obtenu des pourcentages élevés pour l'isolement de *E. coli* aux sites lésionnels (Gomis et coll., 1997a; Onderka et coll., 1997).

Bien que *E. coli* soit rapporté comme la bactérie prédominante au niveau des lésions de cellulite, d'autres agents ont été identifiés en Amérique du Nord, tels que *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus dysgalactiae* (Messier et coll., 1993; Peighambari et coll., 1995a; Gomis et al., 1997b), *Citrobacter freundii* (Norton, 1997) et plus récemment, *Aeromonas* spp. (Norton, 1997; 1999). Cependant, leur rôle exact dans la pathogénie de la cellulite est inconnu.

2.1.5.2. Implication des facteurs de risque

Au départ, deux théories étaient proposées pour expliquer l'origine des lésions de cellulite. Une des hypothèses, qui a été confirmée indirectement par les travaux de Johnson et coll. (1996) et McMurtrey et coll. (1997), énonçait que les égratignures,

causées par les traumatismes ou les mauvaises pratiques de régie, sont une voie d'entrée pour les bactéries (Hoerr, 1988; Herenda et Franco, 1996).

La cellulite est une condition qui est produite dans un contexte multifactoriel (Etteradossi, 1989). La présence d'égratignures à l'abdomen chez le poulet de chair est influencée par des facteurs de risque tels que la haute densité, la race d'oiseau et le faible degré d'emplumement (Elfadil et coll., 1996a). Cependant, le traumatisme cutané à lui seul n'est pas suffisant pour expliquer l'induction de la cellulite chez le même oiseau (Peighambari et coll., 1995b). Par conséquent, des facteurs de risques concomittants associés à la cellulite doivent intervenir.

2.1.5.2.1. Facteurs physiologiques

La génétique des poulets influence leur rendement métabolique et leur degré d'emplumement lesquels sont des facteurs physiologiques impliqués dans le développement de la maladie (Norton, 1999). Le taux de croissance des plumes, régulé par un gène responsable de déterminer le sexe de l'animal (Schleifer, 1988), est plus lent chez les mâles que chez les femelles. Ceci rend les poulets mâles plus vulnérables aux blessures cutanées à cause d'un plus long temps d'exposition aux attaques physiques durant la période de croissance (Elfadil et coll., 1996d). Ceci est particulièrement problématique lors des dernières semaines d'élevage quand la densité augmente et aussi les risques d'égratignures (Norton, 1999). Des différences génétiques entre les races des poulets peuvent influencer la tension de la peau, l'agressivité et la nervosité de l'animal (Elfadil et coll., 1996b).

La capacité immune d'une lignée de poulet doit aussi être considérée comme un

facteur physiologique. Norton (1999) a fait remarquer que certaines lignées d'oiseaux sont plus susceptibles à la cellulite que d'autres. Cependant, la susceptibilité de certaines lignées est difficile à étudier puisqu'elle est liée à d'autres facteurs comme la nutrition et les agents viraux immunosuppresseurs. Des poussins élevés dans de bonnes conditions sanitaires deviendront des adultes plus aptes à répondre aux défis et aux stress rencontrés durant leur élevage (Norton, 1999).

2.1.5.2.2. Facteurs d'élevage

La densité est le facteur de régie le plus important pour les risques d'égratignures (Norton, 1999). Elfadil et coll. (1996b, c et d) ont identifiés les facteurs de risque potentiels en Ontario pour expliquer les causes de condamnation de la cellulite. Les résultats obtenus par ceux-ci démontrent clairement que l'apparition simultanées de d'autres maladies influencent le taux de condamnation de la cellulite. En plus, ces études montrent une association entre les pratiques de régie (programme d'éclairage, etc.), l'environnement des élevages (niveau d'ammoniac dans l'air, etc.) et les installations employées (types d'abreuvoirs) et la cellulite. Toutefois, ces facteurs de risque ont un faible impact sur la condition.

Bien que les effets de la nutrition sur le processus pathogénique de la cellulite restent à élucider, une nourriture déficiente en lysine (Dietzel, 1988), cystéine, méthionine, en acides aminés soufrés et un niveau anormalement bas de sodium peut causer de la nervosité et un emplumement plus faible (Schleifer, 1988; Elfadil et coll., 1996d). Une étude a montré que les poulets nourris par une alimentation 100% végétale ont un plus haut taux de condamnations totales de cellulite par rapport à ceux nourris par

une alimentation conventionnelle (Herenda et Jakel, 1994). Ces aliments prédisposeraient les oiseaux à cause d'une plus grande déposition de gras sous la peau laquelle devient alors plus fragile (Schleifer, 1988).

Morris (1991) a rapporté pour la première fois que, dans les troupeaux, l'incidence de condamnation de cellulite serait associée, entre autres, avec celle de l'aérosacculite. De plus, c'est par reproduction expérimentale que Gomis et coll. (1997b) montrent qu'un seul sérotype de *E. coli* peut causer chez un même oiseau des lésions de cellulite et d'aérosacculite, suggérant la capacité de certains isolats à causer des lésions multiples. Parmi les groupes de clones identifiés jusqu'à présent, un était présent dans trois des quatre troupeaux comptant des carcasses affectées de cellulite avec présence de lésions d'aérosacculite (Goodhope et coll., 1992). Il a été montré que la cellulite est associée à la polysérosite, à l'ascite, à la déformation valgus varus et à la cyanose, lesquelles pourraient être des facteurs biologiques prédisposants. Il est aussi possible que ces conditions partagent des facteurs de risque avec la cellulite (Goodhope et coll., 1992; Elfadil et coll., 1996b et c). Cependant, le processus pathologique reste un mystère, en ce sens que ces conditions sont détectées en un temps donné à l'abattoir, mais il n'est pas possible de savoir si les lésions associées à ces conditions apparaissent avant, après ou simultanément avec celles de la cellulite (Goodhope et coll., 1992; Elfadil et coll., 1996b). En somme, la condamnation pour cause de cellulite tend à être plus élevée dans un troupeau lorsque celui-ci subit une plus haute incidence de problèmes de santé tels que l'aérosacculite, l'ascite, la péritonite et la péricardite (Kumor et coll., 1998).

2.1.6. Reproductions expérimentales

Une variété de procédures utilisées pour reproduire expérimentalement la cellulite démontrent que les dommages causés à la surface de la peau sont une condition obligatoire pour initier l'infection (Peighambari et coll., 1995b) et permettre aux souches de *E. coli* pathogènes de coloniser les tissus sous-cutanés, et ce, indépendamment de leur mode d'entrée (Gomis et coll., 1997b).

Une première méthode consiste à reproduire des altérations pathologiques par inoculation de *E. coli* O2:K1 et O78:K80 en région sous-cutanée suivi par un frottement de l'épiderme lésé (Glünder, 1990). Une deuxième méthode consiste à reproduire la condition en infectant d'abord les follicules des plumes arrachées. Ensuite, la palpation stimulerait l'inflammation conduisant à la formation de lésion (Glünder, 1990). Récemment, Gomis et coll. (1997a) et Norton et coll. (1997) ont inoculé par injection une suspension de *E. coli* en région sous-cutanée pour induire des lésions de cellulite. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de déterminer le nombre de bactéries nécessaire pour reproduire expérimentalement la condition tout en offrant une meilleure répétabilité (Gomis et coll., 1997a).

2.1.7. Faits socio-économiques

En 1981, la direction de l'hygiène des viandes d'Agriculture Canada reconnaissait une nouvelle condition chez les poulets de chair qui fut classifiée comme cause de condamnation (Kumor et coll., 1998). Des compte rendus en provenance d'Europe et d'Amérique du Nord s'accordent à dire que les pertes liée à l'infection ont augmenté rapidement depuis 1986 (Goodhope et coll., 1992).

Une étude faite aux États-Unis, en 1990, rapporte un taux de condamnation de 0,16% dû à cette maladie, et un coût pour l'industrie avicole estimé à 20 millions de dollars US par année (Morris, 1991). En 1997, les coûts étaient estimés entre 40 et 50 millions de dollars US et, deux ans plus tard, ces mêmes coûts totalisaient approximativement 70 à 80 millions de dollars (Norton, 1997, 1999). Les pertes financières sont les conséquences du ralentissement de la ligne de préparation industrielle, du déclassement des carcasses, de la condamnation de carcasses entières, du temps et des pertes liés au parage et à la récupération (Dietzel, 1988; Norton, 1997, 1999; Kumor et coll., 1998).

En France, en 1986 et 1987, le nombre de cas recensés pour la dermatite nécrotique (nom donné à la cellulite) est allé en augmentant à tel point que celle-ci était en troisième place d'importance (Etteradossi, 1989). Des mesures de prévention et zootechniques avaient été préconisées. Dix ans plus tard, Etteradossi et coll. (1997) avancent que la maladie n'est plus signalée en France.

Les données obtenues par Agriculture Canada montrent que le nombre de poulets condamnés pour cause de cellulite durant l'examen post-mortem dans les abattoirs est en augmentation (Messier et coll., 1993). En effet, en 1986, au Canada, seulement 0,048% du total des poulets de chair abattus étaient condamnés pour cellulite (Kumor et coll., 1998). De 1988 à 1990, ce taux est passé de 0,12% à 0,18% (Messier et coll., 1993). Puis, de 1993 à 1996, il est passé de 0,314% à 0,568% (Herenda et Franco, 1996; Kumor et coll., 1998). Depuis 1996, la cellulite est devenue la cause de condamnation la plus importante chez le poulet de chair avec 29,8% des condamnations totales (Kumor et coll., 1998). Au Canada, les pertes financières en rapport avec la cellulite ne sont pas connues.

Cependant, on rapporte que les principales pertes sont associées aux condamnations totales de carcasses et au nombre d'oiseaux qui doivent être parés (Kumor et coll., 1998).

2.1.8. Éléments de médecine réglementée

Au Canada, dans les abattoirs sous inspection fédérale, deux types de condamnations sont effectuées sur des carcasses atteintes de cellulite (Herenda et Franco, 1996). La condamnation totale de la carcasse est requise si les lésions de cellulite sont accompagnées d'effets systémiques ou lorsque les lésions primaires sont aiguës ou généralisées rendant le parage peu pratique (Vaillancourt et coll., 1992; Herenda et Franco, 1996; Kumor et coll., 1998). Si les lésions sont localisées et chroniques, et les effets systémiques absents, la carcasse est partiellement condamnée et la portion affectée de la carcasse est rejetée alors que la partie saine de la carcasse est approuvée pour la consommation humaine (Vaillancourt et coll., 1992; Herenda et Franco, 1996).

Présentement, les isolats de *E. coli* provenant de lésions de cellulite n'ont pas été associés à des maladies chez les humains. Bien que pour l'individu en santé, le risque demeure très minime, des précautions sont à considérer vis-à-vis la santé humaine et publique (Vaillancourt et coll., 1992). Les résultats obtenus par Caya et coll. (1999) suggèrent que les isolats provenant de cellulite possèdent très peu d'attributs nécessaires pour causer des maladies chez les humains. Cependant, l'analyse génétique a montré que certains *E. coli* isolés de lésions de cellulite sont étroitement associés à ceux causant la septicémie et la méningite chez l'humain (Kumor et coll., 1998). Le sérotype O78:K80 n'est pas seulement pathogène chez les poulets, mais aussi chez d'autres espèces animales incluant l'humain (Glünder, 1990). En effet, ce sérotype est reconnu comme un des

sérogroupe associés aux souches de *E. coli* entérotoxigéniques qui affectent les humains (Levine, 1987).

2.2. Caractéristiques des souches d'*Escherichia coli* associées à la cellulite

2.2.1. Implication dans diverses maladies infectieuses et types d'habitats

La colibacillose aviaire réfère à n'importe quelle maladie infectieuse systémique ou localisée causée par une infection primaire ou secondaire à *E. coli*, incluant colisepticémie, coligranulomatose, maladies respiratoires (aérosacculite), cellulite, syndrome de la tête enflée, péritonite, périhépatite, péricardite, salpingite, ostéomyélite/synovite et arthrite, panophtalmite, et omphalite (Barnes et Gross, 1997). Cette maladie infectieuse se produit à tout âge chez les oiseaux bien que les jeunes soient plus susceptibles. Plusieurs manifestations sont associées à des facteurs extrinsèques tels que les faibles conditions environnementales et d'hygiène, l'exposition à d'autres agents infectieux, leur virulence ainsi que la dose et la durée d'exposition à ceux-ci (Rosenberger et coll., 1985; Whiteman, 1996). La colibacillose est également associée à des facteurs intrinsèques tels que l'âge, l'état immunitaire actif et passif et la race de poulet (Rosenberger et coll., 1985).

E. coli est un habitant normal du tractus intestinal chez les oiseaux sains, lesquels peuvent excréter une concentration supérieure à 10^6 /g de matière fécale contaminant ainsi l'environnement. Les fèces des oiseaux adultes peuvent contenir 10 à 15% de sérogroupe pathogènes (Harry et Hemsley, 1965; Barnes et Gross, 1997). Cette bactérie se retrouve également dans l'eau, la poussière, le sol, les sédiments et les oeufs du couvoir (Whiteman, 1996). Les endroits secs tendent à préserver la bactérie, et la poussière est

une source importante de *E. coli* pathogènes (Gross, 1994). L'habitat primaire (côlon des animaux) serait occupé par une sous-population de *E. coli* génétiquement distincte de celle associée à l'habitat secondaire (environnement). Les grands changements observés dans la composition génétique des populations de *E. coli* sont les conséquences des conditions physiques (température, présence de CO₂, etc.) et de la disponibilité de la nourriture et de sa composition qui sont spécifiques au type d'habitat (Savageau, 1983).

2.2.2. Facteurs de virulence

2.2.2.1. Sérotypes

L'antigène somatique ("O") ou lipopolysaccharide (LPS) est un glycolipide, situé dans le feuillet externe de la membrane externe des bactéries, composé de trois fractions: le lipide A, le noyau oligosaccharidique et la chaîne polysaccharidique O-spécifique, neutre ou acide (Valvano, 1992). Cette chaîne latérale O-spécifique, qui se prolonge dans le milieu extracellulaire, est un facteur important de pathogénicité surtout durant les premiers stades de l'infection à cause de sa capacité d'interagir avec le complément (Valvano, 1992). L'antigène capsulaire ("K") ou polysaccharide est un polysaccharide acide, fortement anionique formé d'unités répétitives d'oligosaccharides (Garcia Gonzalez, 1992; Jann et Jann, 1992). Les antigènes K sont des facteurs de virulence importants permettant aux bactéries pathogènes d'échapper ou de s'opposer aux défenses non spécifiques de l'hôte durant les premières phases de l'infection en nuisant à l'action du complément et des cellules phagocytaires (Jann et Jann, 1992). L'antigène flagellaire ("H") est responsable de la motilité de plusieurs *E. coli*. Bien que les antigènes H ne soient pas souvent utilisés dans l'identification antigénique des isolats de *E. coli* et n'aient

pas été associés aux maladies, il est possible de faire une association à faire entre la combinaison de sérotypes O:K:H et l'apparition de certaines pathologies (Garcia Gonzalez, 1992; Barnes et Gross, 1997). L'antigène fimbriaire ("F"), impliqué dans l'attachement aux cellules (Barnes et Gross, 1997), peut être identifié par hémagglutination. Ces antigènes sont classifiés comme étant mannose sensible (MS) lorsqu'une inhibition de l'hémagglutination est observée en présence de D-mannose, ou comme mannose résistant (MR) lorsqu'aucune inhibition n'est notée en présence de D-mannose (Barnes et Gross, 1997). Certains antigènes F ne induisent aucune hémagglutination (HA~).

La plupart des sérogroupes aviaires de *E. coli* sont pathogènes seulement chez les oiseaux et sont rarement impliqués dans les infections chez l'homme, excepté le sérotype O78:K80(B) (Sojka, 1965; Cheville et Arp, 1978). Les trois sérogroupes O1:K1(L), O2:K1(L) et O78:K80(B) sont les plus fréquemment associés à la colibacillose chez les poulets bien que les sérogroupes O35, O36, entre autres, sont aussi reconnus comme pathogènes (Cheville et Arp, 1978; Cloud et coll., 1985; Arp, 1989). Dans la cellulite, les sérotypes O78 et O2 sont les plus fréquemment rencontrés (Etteradossi, 1989; Messier et coll., 1993; Peighambari et coll., 1995a). Les isolats non typables peuvent également totaliser jusqu'au tiers des isolats impliqués dans cette condition (Messier et coll., 1993; Peighambari et coll., 1995a). La diversité des sérotypes rencontrés dans les cas de cellulite rendent la situation problématique dans l'élaboration de vaccins (Norton, 1997).

La majorité des *E. coli* associés à la cellulite appartiennent à un nombre relativement limité de clones distincts identifiés A1, B1, B3 et D (White et coll., 1993;

Ngeleka et coll., 1996). Le séro groupe O78 est caractéristique des souches appartenant au complexe clonal B3 exprimant le fimbriae type 1A, l'aérobactine et adhérant au tissu respiratoire (White et coll., 1993). La prévalence des souches de sérogroupe O1 et O2 a été associée au complexe clonal D dans lequel la plupart des souches expriment la capsule K1, l'aérobactine et le fimbriae type 1 (White et coll., 1993). La présence de ces traits indiquent que ces souches de *E. coli* peuvent être impliquées dans des infections systémiques chez l'oiseau (White et coll., 1993).

2.2.2.2. Résistance à l'effet bactéricide du sérum

Le système du complément joue un rôle important à plusieurs niveaux du processus d'infection, en favorisant une réponse inflammatoire, à travers la génération de facteurs chimiotactiques et anaphylactiques, par opsonisation et phagocytose, et par lyse directe des bactéries à Gram négatif susceptibles (Taylor, 1985).

La résistance au sérum est une caractéristique multifactorielle, médiée par des structures de surface telles que la capsule K1 et l'antigène O, le LPS lisse, les OMPs et la production d'aérobactine protégeant la bactérie contre la formation du MAC, laquelle est associée aux souches septicémiques aviaires de *E. coli* (Dozois et coll., 1992; Gross, 1994; Ngeleka et coll., 1996). Ngeleka et coll. (1996) notent que tous les isolats de cellulite qu'ils ont étudié sont résistants au sérum.

2.2.2.3. Production de l'aérobactine

Un des systèmes de captation du fer ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) est composé d'un sidérophore de type hydroxamate, l'aérobactine, et de protéines de membrane externe régulées par le

fer (IROMPS). Ce système permet aux *E. coli* qui le possèdent d'arracher le fer (Fe^{3+}) couplé aux transferrines présents dans le sérum afin de le rendre disponible aux bactéries pour qu'elles puissent proliférer dans les tissus de l'hôte (Carbonetti et Williams, 1985) où la quantité d'ions ferriques est limitée.

Peighambari et coll. (1995a) montrent que 90% des isolats de cellulite produisent l'aérobactine versus 16% chez les isolats fécaux. Ils ont émis l'hypothèse que le gras sous-cutané dans lequel *E. coli* produit des lésions de cellulite est une région où la disponibilité du fer est grandement limitée, ce qui favorise le développement de lésions sévères. Ngeleka et coll. (1996) rapportent des résultats similaires avec une production d'aérobactine détectée chez 82% des 39 isolats de cellulite testés.

2.2.2.4. Colicines

Barnes et Gross (1997) rapportent que les colicines sont des bactériocines sécrétées par des souches de *E. coli* colicinogéniques et sont létales pour les souches bactériennes qui leur sont étroitement apparentées. S'attachant à des récepteurs spécifiques sur la membrane cellulaire, les colicines altèrent le transport d'électron, perturbant les fonctions membranaires associées à la synthèse moléculaire ou la production d'énergie, limitant par conséquent la croissance ou tuant les bactéries apparentées.

Bien que le rôle de la colicine V dans la pathogénicité des *E. coli* soit controversé, la bactérie qui possède une série de gènes associés au plasmide ColV, tels que les gènes codant pour la résistance au sérum et pour l'aérobactine, peut aussi produire cette bactériocine (Waters et Crosa, 1991), une caractéristique retrouvée chez les souches de *E.*

coli causant la cellulite.

Les travaux de Ngeleka et coll. (1996) montrent que 92% des isolats de cellulite produisent la colicine V, alors que ceux de Peighambari et coll. (1995a) montrent que parmi les 100 isolats, 85 produisent des colicines dont 21 la colicine V et que parmi les 25 isolats fécaux, 6 produisent la colicine V. Ceci démontre probablement que d'autres colicines jouent un rôle dans la virulence des souches de cellulite, et que les différences obtenues dans les travaux peuvent être dues à la nature hétérogène des plasmides ColV (Waters et Crosa, 1991).

2.2.2.5. Adhésines

L'attachement des bactéries pathogènes aux surfaces épithéliales est souvent la première étape dans la pathogénie et est un prérequis pour la colonisation du tissu et la mise en place d'une infection (Ofek et Beachey, 1980; Garcia Gonzalez, 1992). Cet attachement est médié par des adhésines qui peuvent être des structures fibrillaires protéiniques longues et minces retrouvées à la surface des bactéries et appelées fimbriae (Duguid et coll., 1955) et/ou par d'autres structures non fimbriales. Le processus d'adhérence fournit aux bactéries plusieurs avantages pour proliférer chez l'hôte, soit en résistant à l'action nettoyante des liquides corporels, à l'évasion des défenses de l'hôte, en améliorant l'acquisition des nutriments à partir de leur environnement et en permettant un tropisme d'organe (Jann et Hoschützky, 1990). Les adhésines ont une affinité particulière pour la partie carbohydrate des glycoprotéines ou des glycolipides situées sur les cellules de l'hôte (Jann et Hoschützky, 1990). Comme ces récepteurs sont aussi exprimés sur les érythrocytes de diverses espèces animales, l'hémagglutination est, entre autres, utilisée

pour caractériser qualitativement les propriétés adhésives des bactéries aux récepteurs cellulaires (Jann et Hoschützky, 1990).

2.2.2.5.1. Fimbriae de type 1/type 1 apparenté

Le fimbriae de type 1 ou F1, encodé par l'opéron *pil* ou *fim*, est un polymère composé notamment de sous-unités polypeptides simples FimA, une protéine structurale majeure de 17 kDa arrangée en forme d'hélice droite (Hull et coll., 1981; Clegg et Gerlach, 1987) formant le corps principal du filament fimbriaire.

Dans leur étude, Gyimah et Panigrahy (1988) ont bloqué l'adhérence spécifique des souches pathogènes de *E. coli* aux sections épithéliales de trachées chez le poulet avec le D-mannose, ce qui suggère que les récepteurs cellulaires contenant le mannose sont spécifiquement reconnus par le fimbriae F1. Cette spécificité, médiée par l'adhésine FimH, est antigéniquement conservée parmi les membres de la famille *Enterobacteriaceae* (Chanteloup et coll., 1991). L'expression de leur fimbriae F1 peut médier aussi l'attachement aux protéines de la matrice extracellulaire du tissu (ECM) tels que la fibronectine insoluble (Sokurenko et coll., 1992; 1994), la laminine (Kukkonen et coll., 1993) et le plasminogène (Parkkinen et Korhonen, 1989; Korhonen et coll., 1992).

L'expression *in vitro* du fimbriae F1 est produite aussi bien à 20°C qu'à 37°C, ce qui n'est pas le cas pour les autres fimbriae (Klemm, 1985). Cette expression est induite dans les milieux de croissance liquide, ainsi qu'en présence de leucine et d'alanine dans ces milieux par variations de phase (Harel et Martin, 1999). Cependant, le fimbriae F1 est peu produit sur milieux de culture solide. *In vivo*, le fimbriae F1 est exprimé principalement dans la trachée, les poumons et les sacs alvéolaires, mais son expression

n'a jamais été observée ni dans les autres organes, ni dans le sang, ce qui suggère que la muqueuse trachéale possède les récepteurs pour le fimbriae F1 (Pourbakhsh et coll., 1997).

2.2.2.5.2. Fimbriae P/P apparenté

Le fimbriae P, codé par l'opéron *pap* (pyelonephritis associated pili) (Hull et coll., 1981), est un hétéropolymère composé de sous-unités majeures PapA polymérisées en forme d'hélice α (Kuehn et coll., 1992). L'extrémité du fimbriae consiste en une structure linéaire composée de sous-unités mineures PapE, PapF et PapG laquelle représente l'adhésine qui confère la spécificité au fimbriae P (Lindberg et coll., 1987; Kuehn et coll., 1992).

Le fimbriae P a été associé initialement aux souches de *E. coli* causant des infections du tractus urinaire chez les humains (Kallenius et coll., 1981). Il est aussi exprimé par certaines souches de *E. coli* impliquées dans la colisepticémie et l'aérosacculite chez la volaille (Dozois et coll., 1992; van den Bosch et coll., 1993; Pourbakhsh et Fairbrother, 1994; Vidotto et coll., 1997). Le rôle des adhésines fimbriales P dans la pathogénicité des souches aviaires n'est pas encore bien élucidé (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Les récepteurs épithéliaux associés aux fimbriae P sont l' α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside, présents sur les domaines globulaires des glycolipides des antigènes P des groupes sanguins (Kallenius et coll., 1981; Dozois et coll., 1995). Trois variants de l'adhésine G ont été identifiés comme étant les classes I, II et III (Marklund et coll., 1992). Ces variants reconnaissent différents isorécepteurs des domaines globulaires

des glycolipides contenant le disaccharides gal-gal et sont aussi différenciés par leur hémagglutination résistante au mannose de différents érythrocytes d'espèces animales (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Il a été rapporté que seule la fibronectine, parmi les protéines de la matrice extracellulaire, sert de ligand pour le récepteur du fimbriae P (Westerlund et coll., 1989, 1991, 1993).

Comme pour le fimbriae F1, l'expression du fimbriae P est sujette à l'influence de la température, aux conditions de croissance et à la variation de phase (Krogfelt, 1991). Le fimbriae P est produit à 37°C, mais son expression est normalement arrêtée à 25°C ou moins (Göransson et Uhlin, 1984). Il est généralement bien exprimée sur milieu de culture riche gélosé (Duguid et coll., 1979). Dozois et coll. (1995) ont montré que les conditions environnementales dans lesquelles le fimbriae P et F1 sont produits *in vitro* varient parmi les isolats aviaires de *E. coli*. Ngeleka et coll., (1996) ont montré que des isolats de cellulite sont capables de produire les fimbriae F1 et P en milieu de culture.

2.2.2.5.3. Curli et Tsh

Il a été rapporté pour la première fois l'existence d'une nouvelle structure filamenteuse retrouvé chez les isolats de *E. coli* isolés de cas de mammite bovine (Olsén et coll., 1989) et chez les espèces *Salmonella* (Doran et coll., 1993; Collinson et coll., 1996). Cette adhésine nommée curli a été définie comme étant une structure de surface fibrillaire repliée et mince.

Bien que le rôle du curli dans la pathogénie ne soit pas encore élucidé, une étude a montré que les souches de *E. coli* qui exprimaient à la surface le curli avaient une affinité pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, mais pas pour

les molécules complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Olsén et coll., 1998). Il est connu que les molécules de CMH-I sont présentes chez toutes les cellules des vertébrés supérieurs, ce qui fournit aux souches de *E. coli* avec curli de nombreuses opportunités pour interagir avec une grande variété d'hôtes et de cellules chez l'hôte. Les souches avec curli qui infectent un hôte pourraient interagir avec les molécules du CMH-I, ce qui pourrait contribuer à l'adhérence puis à la colonisation durant les premiers stades d'infections.

Le curli est exprimée préférentiellement entre 26°C et 32°C lorsque les bactéries sont cultivées sur gélose CFA (colonization factor antigen), dans un milieu de culture à faible osmolarité et en phase stationnaire de croissance (Arnqvist et coll., 1992; Provence et Curtiss III, 1992; Olsén et coll., 1993).

L'adhésine curli se lie à de nombreuses protéines du sérum et de la matrice extracellulaire (formes solubles) telles que la fibronectine soluble, la laminine, le collagène type 1, le plasminogène, l'activateur plasminogène de tissu-type et le H-kininogène (Olsén et coll., 1989; Provence et Curtiss III, 1992; Olsén et coll., 1993; Sjöbring et coll., 1994; Ben Nasr et coll., 1996). Cette remarquable habileté du curli à interagir avec une variété de protéines de l'hôte permettent aux souches possédant le curli d'adhérer aux cellules et à la matrice extracellulaire, et de favoriser la dispersion des bactéries à travers le tissu endommagé (Olsén et coll., 1998).

Le phénotype d'hémagglutination dépendant de la température, nommé Tsh, mais comprenant plusieurs types de fimbriae est sous le contrôle du gène *tsh* pour "temperature-sensitive hemagglutinin" et l'activité d'hémagglutination est plus grande lorsque les bactéries sont cultivées à 26°C qu'à 37°C (Provence et Curtiss III, 1994).

Maurer et coll. (1998) rapportent que le gène *tsh* hémagglutinine aviaire était présent chez environ 46% des isolats cliniques de *E. coli* aviaire. Toutefois, ce gène n'a pas été détecté parmi les isolats commensaux de *E. coli* de poulets sains. La fonction du Tsh dans l'adhérence et son implication dans la colibacillose et l'aérosacculite ne sont pas connus (Maurer et coll., 1998). Les résultats présentés par Dozois et coll. (2000) suggèrent un rôle possible du Tsh dans la pathogénicité des souches de *E. coli* dans les premiers stades de l'infection.

Le curli et le Tsh sont deux adhésines nouvellement décrites à ce jour qui sont exprimées à des températures ambiantes ou dans des conditions environnementales dans lesquelles se trouve l'oiseau (Maurer et coll., 1998).

2.3. Structures du tégument aviaire

2.3.1. Tissu superficiel

L'épiderme est un épithélium squameux stratifié de 13 à 23 μm d'épaisseur (Lucas et Stettenheim, 1972) composé de deux couches principales de kératinocytes: une couche cornée (*stratus corneum*) et une couche germinative (*stratum germinativum*) (Stettenheim, 1972). La couche basale de la couche germinative est attachée à la membrane basale par des hémidesmosomes (Spearman et Hardy 1985).

La membrane basale est composée de la *lamina lucida*, la *lamina densa* et sous cette dernière se trouve la *lamina* (ou *pars*) *fibroreticularis* (Weiss, 1988; Cheville, 1994). D'épaisseur variable, elle mesure au plus 0,5 μm (Lucas et Stettenheim, 1972). Bien que sa composition varie d'un tissu à un autre, elle possède néanmoins un nombre de constituants principaux : le collagène type IV (*lamina densa*), la laminine (*lamina*

lucida), le protéoglycane héparane sulfate (*lamina densa*) et la fibronectine (Weiss, 1988; Stevens et Lowe, 1993; Fawcett, 1994). Dans la *pars fibroreticularis*, on retrouve des fibrilles d'ancrage, des microfilaments de fibrilline et des fibres de collagènes (Weiss, 1988; Stevens et Lowe, 1993).

2.3.2. Tissu profond

Le derme est composé principalement de tissus conjonctifs (Stettenheim, 1972). Mesurant entre 84 μm et 214 μm d'épaisseur (Lucas et Stettenheim, 1972) le tissu dermique est composé de collagènes, de fibres élastiques, de substances fondamentales, de fibronectine insoluble, de thrombospondine, de cellules, etc. (Weiss, 1988; Mosher, 1989; Fawcett, 1994). La couche superficielle du derme est faite de tissu fibreux fin à consistance lâche (Weiss, 1988). La couche profonde du derme est divisée en couche compacte et lâche (Stettenheim, 1972) (Figure 1). Les plumes sont des dérivés cellulaires kératinisées de l'épiderme qui sont formées à l'intérieur des follicules pénétrant jusqu'au derme profond (Spearman et Hardy, 1985).

Le tissu sous-cutané varie en épaisseur selon l'âge du poulet; à un jour d'âge, il mesure entre 136 μm et 254 μm et diminue à 150 jours d'âge à environ 20 μm (Lucas et Stettenheim, 1972). Ce tissu est composé essentiellement de fibres de collagènes lâches arrangées au hasard (Pass, 1989). À partir de ce qui est connu du fascia profond, cette couche mince et dense, souvent observée au microscope, est décrite comme étant composée de bandes de collagène et de fibres élastiques arrangées en feuillets (Stettenheim, 1972). Les muscles striés, sous le fascia profond sont séparés soit par du collagène dense ou lâche, mais chaque fibre musculaire est entourée par des fibres

collagéniques (Lucas et Stettenheim, 1972). Aussi, la fibronectine est un constituant de la lamina externe des fibres musculaires striées (Cheville, 1994; Fawcett, 1994).

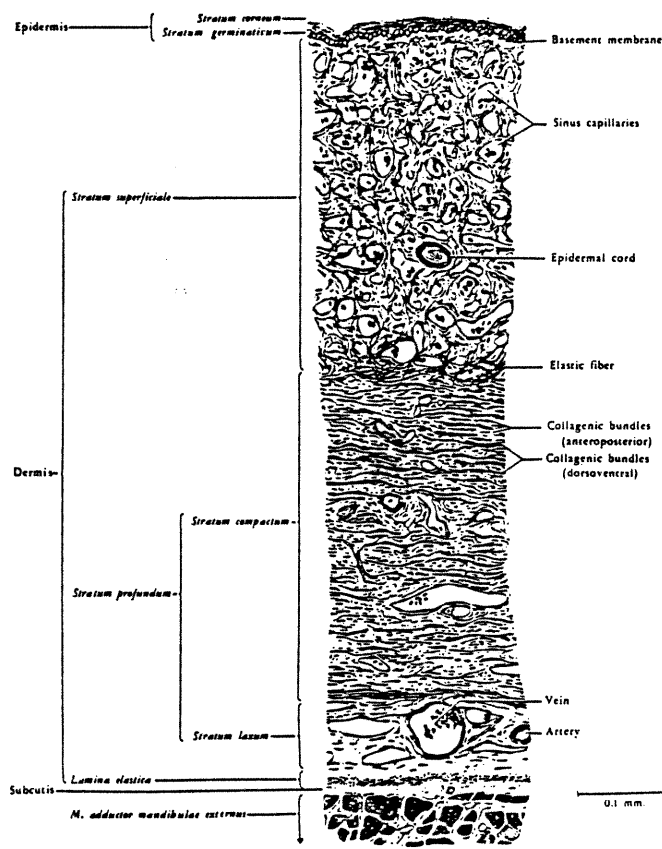


Figure 1. Section transversale de peau d'un poulet mâle de type Leghorn de 150 jours d'âge (d'après Lucas et Stettenheim, 1972).

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article 1

Evaluation of the adhesive capacity of *Escherichia coli* isolates associated with avian cellulitis

Benoît Leclerc, John M. Fairbrother, Martine Boulianne, and Serge Messier

Département de pathologie et de microbiologie,
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

Avian Diseases In Preparation

SUMMARY. It has been shown that *E. coli* isolates from lesions of cellulitis belong to a limited number of clonal groups distinct from those of isolates found in the environment of these birds. In this study, different *in vitro* methods were used to evaluate the adherence properties of *E. coli* isolates from birds and their environment. A total of 100 isolates were tested by hemagglutination. Adherence to frozen sections of chicken skin and binding to soluble fibronectin were examined for 40 of these 100 isolates by immunofluorescence and by immunocytofluorometry respectively. Localization of bacterial adherence to skin tissues was confirmed by immunohistochemistry. It was demonstrated that O78:K80 isolates from lesions of cellulitis adhered to skin sections to a much greater extent in deeper than in superficial tissue layers. A greater bacterial adherence following growth in TSB at 37°C was demonstrated for isolates from flocks with high prevalence of cellulitis than for isolates from flocks with low prevalence of cellulitis. MANOVA analysis results showed a significant difference between superficial and deep tissue layers only for one set of isolates from flock with high prevalence of cellulitis. Hemagglutinating activity was variable among the O78:K80 isolates obtained from flocks with high prevalence of cellulitis. The results obtained for some O78:K80 isolates following growth in TSB suggest a role for type 1 fimbriae or F1 in adherence to skin sections. This was reinforced by the finding that adherence was inhibited by D- mannose. Avian *E. coli* isolates which express F1 had no affinity for soluble fibronectin, although localization of the adherence in skin sections suggested a role for extracellular matrix components such as collagen and insoluble fibronectin.

Key words: avian, *Escherichia coli*, skin tissue, adherence, F1 fimbriae, soluble fibronectin

Abbreviations: BSA = bovine serum albumin; CFA = colonization factor antigen;

FITC = Fluorescein Isothiocyanate; FR = fluorescence ratio; MRHA = mannose-resistant hemagglutination; MSHA = mannose-sensitive hemagglutination; HA~ = negative hemagglutination; PBS = phosphate-buffered saline; sFN = soluble fibronectin; TSAB = tryptic soy agar blood; TSB = Tryptic soy broth

The proportion of chicken carcasses condemned due to cellulitis during post-mortem examination in slaughterhouses in Canada is increasing (20). Since 1996, cellulitis has been the largest contributor to overall condemnation figures (18). Direct bird losses from carcass condemnation are approximately \$70 to 80 million U.S. annually (24). Although the main loss is associated with total carcass condemnation, others losses such as those associated with lesion trimming should be considered (18).

Cellulitis can be defined as a diffuse, spreading, oedematous to suppurative inflammation of the deep subcutaneous tissues, which sometimes extends into the muscle, and is frequently associated with abscess formation (23). Cellulitis lesions are mostly unilateral and generally located in the cloacal and the abdominal area (8). *Escherichia coli* is the most common agent isolated from lesions of cellulitis, having been isolated in more than 80% of cellulitis lesions (9, 14, 20).

Among typable *E. coli* isolates from cellulitis lesions, serogroups O78 and O2 appear to predominate, although one third of the total number of isolates are untypable (14, 20, 28). Virulence factors associated with avian pathogenic *E. coli* (APEC) isolates include O serotype, resistance to the bactericidal effect of serum, aerobactin production, colicin V production, and presence of adhesins such as F1 fimbriae, curli and temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) (3, 22, 28, 32).

Adherence of APEC to epithelial surfaces, mediated by adhesins, is an important early event in their interaction with the host, leading to colonization and infection (3). *In vivo*, F1 fimbriae are mainly expressed in trachea, air sacs and lungs, but not in other organs nor in the blood of experimentally infected chickens, suggesting that the chicken tracheal mucosa possesses F1 fimbriae receptors (30). Sokurenko *et al.* (34) reported that F1 fimbriae can bind to fibronectin. P fimbriae does not appear to be important for initial bacteria colonization of the upper respiratory tract but would play an important role in later stages of the infection (30). The curli adhesin, a new class of *E. coli* surface organelle (26), is present on most avian *E. coli* isolates. Although the role of curli in the pathogenesis of colibacillosis is not yet elucidated, curli expressed on the surface of *E. coli* bind to MHC-I molecules, which are present on all cells in higher vertebrates, and could consequently contribute to adherence and colonization (27). Curli also bind to several extracellular matrix proteins, including fibronectin, thus facilitating the adaptation of curliated *E. coli* to different ecological niches (27). The adhesin Tsh is best expressed when bacteria are grown at 26°C. The function of Tsh, with regard to adherence and, more specifically, pathogenesis, still requires further investigation (19). Dozois *et al.* (6) have demonstrated a role of Tsh in the pathogenicity of *E. coli* for chickens in the early stages of respiratory infection. However, the role of bacterial adherence in the development of cellulitis is not yet known.

In order to compare the adherence properties of avian *E. coli* isolates obtained from flocks with high or low prevalence of cellulitis, we measured the binding of soluble fibronectin (sFN) to the isolates by immunocytochemistry and evaluated the adherence of our isolates to frozen chicken skin sections and to chicken skin sections fixed in formalin using immunofluorescence and immunocytochemistry.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *E. coli* isolates used in the various assays were originally isolated from flocks with high (#43 and 45) or low prevalence of cellulitis (#9 and 11) (15). In the fibronectin binding assay, a wild type strain of *Streptococcus pyogenes* was used as a positive control (Kindly supplied by Dr. Anne Vibien, Pavillon Honoré-Mercier Hospital, St-Hyacinthe, Qc, Canada). In the chicken skin adherence assay, *E. coli* strains MT78 (O2:K1:H+) (*fim*⁺,*pap*⁻, *csgA*⁺), TK3 (O1:K1:H7) (*pap*⁺, *fim*⁺, *csgA*⁺) and χ 7122 (O78:K80:H9) (*pap*⁻, *fim*⁺, *csgA*⁺, *tsh*⁻) were positive controls (4, 19, 30, 31), and *E. coli* TK55 (nontypable) (*pap*⁻, *fim*⁻, *csgA*⁻) was a negative control. Isolates were stored at ~ 70°C and thawed, inoculated onto tryptic soy agar with 5% (vol/vol) bovine blood (TSAB) (BBL), and incubated for 24 h at 37°C, then kept at 4°C for use in the various experiments. In the fibronectin binding assay and in the chicken skin adherence assay, isolates were passaged once for 24 h on TSAB, followed by two passages on either tryptic soy broth (TSB) (Difco), TSAB or colonization factor antigen agar (CFA) (Difco) at 26°C, 37°C or 40°C for 18 hours to enhance expression of F1 fimbriae, curli, or other fimbrial adhesins such as P fimbriae, respectively (7, 26, 29, 32).

Hemagglutination. The hemagglutination assay was done as described by Ngeleka et al. (22). Briefly, mannose-sensitive and mannose-resistant hemagglutination (MSHA and MRHA) were assayed on glass plates. Erythrocytes were prepared from chicken or guinea pig heparinized blood, washed three times, and diluted in cold phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.3) to a final concentration of 3% (vol/vol). Bacteria were grown for three consecutive passages of 48 h each in TSB at 37°C under static conditions to enhance expression of F1

fimbriae (3). They were washed in PBS and tested with chicken and guinea pig erythrocytes in the presence or absence of 3% D- mannose (wt/vol).

Fibronectin binding assay. Aliquots of 1-mL of a suspension of *E. coli* or *S. pyogenes* adjusted to approximately 2×10^7 bacterial cells/mL were placed in 1.5 mL Eppendorf tubes precoated with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) for overnight incubation at 37°C. Following centrifugation at 15 000 x g, the pellet was washed and resuspended in 1 mL of PBS with 5 µg/mL of human plasma fibronectin (Sigma) and incubated for 1 h at 37°C. After two washes with PBS, 1 mL of rabbit anti-human fibronectin (Sigma ImmunoChemicals) was added to each tube and incubated for 1 h at 37°C. After two washes with PBS, 1 mL of FITC conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) was added and incubated for 1 h at 37°C. Tubes were washed once in PBS and 1 mL of 2% paraformaldehyde (Laboratoires Mat) in PBS was added and incubated for 1 h at 37°C. Tubes were vortexed and the liquid was transferred into 12 x 75 mm tubes (VWRCanlab).

Flow cytometry analysis was done using a FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Samples were illuminated with an air cooled argon ion laser excitation light source (488 nm). Light emission was simultaneously analyzed on 10 000 bacteria per sample and data were acquired and processed using CellQuest software (Becton Dickinson). Negative controls were obtained by replacing the soluble FN by PBS.

Adherence of isolates to chicken skin frozen sections. Bacteria were grown in TSAB or TSB at 37°C or CFA at 26°C. Skin tissue samples were taken from the sides of 3-week-old broiler chickens, put in 2 mL cryogenic cups containing Tissue-Tek O. C. T. Compound (Miles Inc., Elkhart, Indiana), rapidly frozen on dry ice, and stored at ~-70°C. Five µm sections were cut using a Tissue Tek II cryostat (Leica, Listed Laboratory Equipment),

mounted on glass slides and fixed with 100% cold methanol (5). Sections were then incubated in blocking buffer (PBS pH 7.3; 0.5% BSA; 0.05% Tween- 80) for 1 h (10). For the adherence assay, 100 μ L of a suspension of about 5×10^7 cfu/mL bacteria in PBS-1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) with or without 5% D- mannose was added to each section and slides were incubated in a moist chamber at 37°C for 1 h. Each isolate was tested twice. The indirect immunofluorescence assay was used for detection of bacteria using appropriate antisera. The first antiserum was serogroup-specific (O2, O78, O101, or O147 rabbit polyclonal antibodies), and the second antiserum was a fluorescein labeled goat anti-rabbit IgG conjugate (Sigma). Tissue sections were counter stained with Evans Blue (Fisher) (30). Preparations were examined with a Diaplan fluorescence microscope (Leitz, Wetzlar, Germany). The number of bacteria found per magnified field (400X) on tissue sections (superficial, dermis, cutaneous and muscular layers) was evaluated on a semiquantitative scale as follows: 0: 0 to 5 bacteria (negative adherence); 0.5: 6 to 20 bacteria (very weak adherence); 1: 21 to 50 bacteria (weak adherence); 2: 51 to 100 bacteria (good adherence); 3: 101 to 200 bacteria (strong adherence); 4: more than 200 bacteria (very strong adherence). Photographs were taken with the CoolSNAP software (Version 1.1) connected to a CoolSnap camera model (Canberra Packard Canada Ltd) in fluorescence mode.

Adherence of isolates to chicken skin sections fixed in formalin. Tissue samples were taken as described for the skin frozen sections but were placed in 10% formalin buffer solution for 48 h then transferred in plastic cassettes (10). Once tissues were paraffin embedded, cut in five- μ m sections and affixed to microscope glass slides, they were deparaffinized in 100% toluol, rehydrated in isopropanol several times and then incubated in blocking buffer (PBS pH 7.3; 1.0% BSA; 0.05% Tween-20) (10). The adherence assay was

performed as described for frozen sections and bacteria detected by an indirect immunocytochemistry assay using the Zymed Fast-Red kit according to manufacturer's instructions (Histotain-Plus (Kit), Alkaline phosphatase, Zymed Laboratories Inc.). The first antibody was an anti-O78 rabbit polyclonal antiserum. Tissues were counter stained with Harris hematoxylin. Tissues were immersed with Clearmount mounting solution Zymed, dried at 37°C and washed with toluol. Photographs were taken with the CoolSNAP software connected to a CoolSnap camera model in brightfield mode.

Statistical analyses. Differences between flocks or tissue layers for any one culture medium were evaluated for statistical significance using the two-way Anova. Differences between the same tissue layers of bacteria grown in the three media were evaluated using Manova analysis. In both analyses, the Tukey's studentized range (HSD) test was applied (33).

RESULTS

Hemagglutination. Ninety of 100 isolates tested gave the same hemagglutination reaction when tested with either guinea pig or chicken red blood cells. Among the 100 isolates, approximately 60% demonstrated a MSHA reaction and about 30% demonstrated no hemagglutinating reaction when tested with both types of red blood cells (Table 1). The remaining isolates demonstrated variable results depending upon the type of red blood cells used. In both groups, MSHA was expressed by a similar proportion of isolates. Few isolates in either group demonstrated MRHA. Most isolates from flocks with high prevalence of cellulitis belonged to the O78:K80 serogroup and almost all demonstrated a constant pattern of MSHA or HA~. Forty of the 100 isolates demonstrating a similar HA pattern were chosen for further studies. Among 40 isolates, 30 belonged to the O78:K80 serogroup from flocks with high prevalence of cellulitis whereas 10 other isolates belonged to others serogroups from flocks with high and low prevalence of cellulitis. This selection was used to evaluate the adhesive capacity among those 40 isolates onto tissue sections.

Soluble fibronectin binding assay. Flow cytometry was used to evaluate the binding affinity to human soluble fibronectin of 30 isolates from cellulitis lesions of flocks with high prevalence and of 10 isolates from flocks with low prevalence of cellulitis. We calculated a fluorescence ratio (FR) based on the level of fluorescence of the isolates in the presence of fibronectin in relation to that in the absence of fibronectin. A $FR \geq 2.0$ was considered positive even though the FN binding was generally weak. A small proportion of isolates demonstrated a positive FR, this being observed only in isolates from flocks with high prevalence of cellulitis (Table 2). A positive FR was observed more frequently for isolates

grown on CFA or TSAB, and rarely with isolates grown in TSB. Binding to sFN was observed after growth at 37°C and at 26°C, but never with isolates grown at 40°C. The highest FRs were observed with isolates grown in CFA at 37°C. The highest for an *E. coli* isolate FR was 3.0. The FR for the positive control *S. pyogenes* strain was about 4.0.

Adherence to frozen skin sections. Indirect immunofluorescence was used to evaluate the binding of the 40 isolates to tissue sections, each isolate being tested duplicate. For each isolate, a mean of the score values, based on a semiquantitative scale, was made for each tissue layer. Comparisons of the mean score values were made to evaluate the influence on adherence of one or more of the following: tissue layer and origin of the bacterial isolates (Two ways ANOVA analysis), and culture conditions (MANOVA analysis).

In general, isolates adhered more greatly to the deeper tissues than to the superficial tissues and differences were observed between some layers of the former irrespective of the growth conditions. When the isolates were grown in CFA at 26°C on on TSAB at 37°C, a significantly greater adherence score ($P < 0.05$) was observed for the isolates originating from flocks with high prevalence of cellulitis and than for those originating from flocks with low prevalence of cellulitis according to the Turkey's Studentized Range (HSD) Test, except in the case of the isolates from flock 45 grown in TSAB (Table 3). When the isolates were grown in TSB at 37°C, a greater adherence was observed for those from flock 45 than for those from flock 43. Isolates from flock 45 that gave a MSHA reaction were significantly more adherent than those from flock 43 that gave a HA~ ($P < 0,05$), particularly when the isolates were grown in TSB, (results not shown). On the other hand, adherence of isolates from flock 43 was not significantly different from that observed with isolates from flocks with low prevalence of cellulitis. For each growth condition, isolates from flock 45 showed a

significant difference in adherence between superficial and deep tissue layers according to the Turkey's Test supported by Wilks' Lambda statistic ($P < 0.05$) (Table 3). However, no significant difference was observed in adherence to the different tissue layers for isolates from flock 43 or from flocks with low prevalence of cellulitis.

Adherence was also evaluated with regard to the serogroup of the isolates. When grown in CFA, isolates belonging to serogroup O78 or O101 adhered significantly more greatly than those belonging to serogroup O147, according to the Turkey's Studentized Range (HSD) Test ($P < 0.05$). When cultured on TSAB, significant differences were noted between serogroups O78, O101 and O147. Isolates of serogroup O101 were the most adherent followed by those of serogroup O78. Growth in TSB, however, resulted in a significant difference in the adherence only for isolates of serogroup O78 compared to those of serogroup O147. Bacteria adhered in greater numbers in the deeper layers of the skin tissue, regardless of the culture conditions. Isolates of serogroup O78 adhered to the deeper layers significantly more greatly following growth in TSB and CFA than in TSAB (Table 4). However, no significant differences were observed for serogroup O147 isolates, according to the Turkey's Test supported by Wilks' Lambda statistic ($P < 0.05$). The one tested serogroup O2 isolate adhered well to tissue sections, especially when grown in TSB, whereas one nontypable isolate did not adhere in any culture media tested ($P > 0.05$).

In 8 examined isolates, adherence to skin tissue sections was significantly less in the presence of 5% D-mannose than in its absence. The inhibition, observed in all the layers of the skin tissue was complete for the superficial layer but only partial for deeper layers.

The relation between the ability to bind soluble fibronectin and adherence to skin sections of isolates grown in TSAB at 37°C was evaluated. No significant difference in ability

to bind to skin tissues was found between isolates that did or did not bind fibronectin, although the group of isolates to which fibronectin bound weakly adhered slightly more to the different skin layers ($P > 0.05$).

Localization of bacterial adherence on formalized skin sections. Localization of bacterial adherence to the various layers of the skin was further studied following incubation of bacteria of serogroup O78 on formalin fixed skin tissues and revelation by Fast-Red staining.

As we had observed with the frozen skin sections, the isolates adhered more to the deeper layers of the skin tissue than to the superficial layer, although adherence was present to the same extent in the cutaneous and muscular layers.

In the superficial layer, bacteria adhered mostly to the cellular layers of the epidermis, but also appeared to adhere to the basement membrane. In the dermis layer, bacteria adhered mostly to loose connective tissue. In the cutaneous layer, isolates adhered extensively in the reticular tissue where fibroblasts are found. Indeed, bacteria demonstrated an adherence score of 2+, uniformly distributed among the reticularis fibers of the cutaneous tissue (Figure 1). In muscle layer, isolates adhered more extensively around muscle fibers than on the fibres (Figure 2). The adherence of isolates grown in TSB mostly demonstrated a uniform distribution throughout the tissue sections whereas that for the isolates grown in CFA was more focal.

DISCUSSION

Adherence assays were performed on sections of skin tissue that were collected at or

near the site where cellulitis is encountered most frequently in broiler chickens (16). The initial assays were done on frozen skin sections that were cut and fixed with cold methanol which precipitates globular proteins by denaturation, although it preserves relatively intact reactive groups of proteins (13, 21).

Our results clearly demonstrated that isolates from cellulitis adhere to tissue sections suggesting that adherence could be an important step in the pathogenesis of cellulitis. We have shown that, in general, bacteria adhere poorly to the superficial skin layer, and more extensively to the deeper layers of the skin. These findings are in accordance with the finding that it was necessary to abrade the skin of chickens, in order to reproduce cellulitis experimentally (23, 25, 29).

Adherence could be due to the presence of bacterial adhesins, e.g. F1, curli, Tsh or P fimbriae, after produced by cellulitis isolates. Hence, we grew pathogenic control strains, positive for each of these adhesins, in the culture conditions appropriate for their expression and found a significantly greater adherence relative to the non pathogenic F1⁻, curli⁻, and P-fimbriae negative strain, hence strengthening the argument for a role of these adhesins in pathogenesis of cellulitis.

A greater adherence of isolates following growth in TSB, as observed for isolates from flock 45, suggests a role for F1. This was further supported by the finding that the adherence was inhibited by D-mannose, a phenomenon associated with the presence of F1 fimbriae (34). These isolates also gave a positive MSHA reaction, reinforcing the possibility that these isolates possess F1 fimbriae that would mediate attachment to skin tissue. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that other adhesins may be involved. Bacteria may adhere to various receptors in the extracellular matrix, e.g. laminin, fibronectin, and collagen (17, 27,

34, 35, 37).

We noted a greater binding of sFN to isolates from high prevalence flocks than to those of low prevalence flocks. However, this did not appear to be due to F1 since no sFN binding was observed following growth in TSB. Hence, this FN binding probably does not explain the greater adherence of isolates from flocks 45 and 43 to tissue sections when grown in TSB. It should be remembered that in skin tissue, FN would be present mostly in the immobile form. It has been speculated that mechanical trauma would cause micro-lesions in the skin epithelium, exposing FN and thereby allowing staphylococci, streptococci, *E. coli* and perhaps other pathogens to colonize such lesions prior to invasion of the tissues and subsequent development of infection (11). Our results show that, in general, our *E. coli* isolates have little or no affinity for sFN. This is supported by the results of Westerlund *et al.* (37) and of Sokurenko *et al.* (34) who have shown that *E. coli* strains do not bind soluble FN but adhere well to immobilized plasma FN. In fact, FN molecules in solution (globular conformation) might exhibit a monovalent, low-affinity interaction with individual fimbriae, but when FN becomes absorbed to a substrate (linear conformation), the interaction between the bacteria and the substrate would be multivalent, increasing the effective strength of the interaction (34).

It appears that mannoside receptors are present in the skin tissues and follow a gradient towards the deep tissue layers as indicated by bacterial adherence. In regard to the expression of P fimbriae and curli by our isolates, it seems that their respective gal(α 1-4)gal and fibronectin receptors follow a distribution in tissue sections similar to that of the mannoside receptors.

The most commonly observed serogroup of *E. coli* isolates from lesions of cellulitis is

O78 (14, 20, 29). We noted that isolates of the O78 serogroup adhered more greatly than those of the other serogroups. Similarly, it has been observed that isolates of some serogroups have a greater ability to express attachment factors and to cause disease (1, 22, 29).

The suspected expression of F1 fimbriae in some isolates from flock 45 is confirmed by the inhibition of bacterial adherence to skin tissues, by D-mannose. This incomplete inhibition of adherence to the deeper layers would suggest that adherence by these isolates to the skin tissue could also be mediated by other factors but shows nevertheless that F1 is expressed by our isolates obtained from cellulitis lesions. However, the role of F1 in infection has not yet been elucidated (2). Visai et al. (35) showed that F1 and other attachment factors of *E. coli* isolates recognized a structure common to all collagen molecules and that collagen possesses multiple binding sites for bacteria.

Different host proteins, such as various types of collagen, fibronectin, elastin and thrombospondin, are present in the connective tissue surrounding the muscle fibers and may be involved in bacterial adherence as a first step in the development of cellulitis (12, 36).

In conclusion, our results show that isolates originating from flocks with a high prevalence of cellulitis were more adherent on skin tissue sections than those from the flocks with a low prevalence of cellulitis, indicating that they may have a better ability to produce attachment factors under specific culture conditions. Isolates adhered to a greater extent to the deeper layers than to the more superficial layers of the skin tissue. Bacterial adherence depended on the expression of adhesins under various culture conditions. The composition of the extracellular matrix, such as collagen, elastic fibers and insoluble fibronectin which is found in superficial, dermis, cutaneous and muscular layers, could explain these differences. To better understand the adherence mechanisms by cellulitis isolates in deep skin tissue

layers, investigation of the host molecules involved may prove to be crucial in the comprehension of the pathogenesis of cellulitis.

Table 1. Agglutination patterns in the presence or absence of D-mannose of 100 avian *Escherichia coli* isolates from flocks with high or low prevalence of cellulitis

Prevalence of cellulitis in flock	Total no. of isolates	No. of isolates						HA ^{~a}
		MSHA			MRHA			
		g ⁺ ch ^{+b}	g ⁺ ch ^{-c}	g ⁻ ch ^{+d}	g ⁺ ch ^{+b}	g ⁺ ch ⁻	g ⁻ ch ^{+f}	
Low	34	21	5	1 ^d	0	0	1	6
High	66	40	0	3 ^e	2	0	0	21
Total	100	61	5	4	2	0	1	27

^a No agglutination of either guinea pig or chicken erythrocytes.

^b MSHA or MRHA of guinea pig and chicken erythrocytes.

^c MSHA for only guinea pig erythrocytes and also MRHA of chicken erythrocytes.

^d MSHA of chicken erythrocytes and no HA of guinea pig erythrocytes.

^e MSHA of chicken erythrocytes and MRHA of guinea pig erythrocytes.

^f MRHA of chicken erythrocytes and no HA of guinea pig erythrocytes.

Table 2. Positive fluorescence ratio (FR \geq 2.0) for isolates from flocks with high or low prevalence of cellulitis grown under different culture conditions

Total no. of isolates	No. of isolates with a FR \geq 2.0 after growth in									
	CFA		TSAB				TSB			
	26°C	37°C	40°C	26°C	37°C	40°C	26°C	37°C	40°C	40°C
30 ^a	3	7	0	3	11	0	2	0	0	0
10 ^b	0	0	N.D. ^c	0	0	N.D.	0	0	0	N.D.

^a Isolates originating from lesions of birds from flocks with high prevalence of cellulitis.

^b Isolates originating from the environment and from lesions of birds from flocks with high and low prevalence of cellulitis respectively.

^c Not done.

Table 3. Adherence to skin sections of *E. coli* isolates from flocks with high or low prevalence of cellulitis, grown under different culture conditions

Mean score ^a of adherence of bacteria to different tissue layers following growth in different conditions															
Origin of isolates	No. of isolates examined	Superficial				Dermis				Cutaneous				Muscular	
		CFA ^b	TSAB	TSB	CFA	TSAB	TSB	CFA	TSAB	TSB	CFA	TSAB	TSB	CFA	TSAB
Flock 43	17	0.15 ^{Ac}	0.17 ^A	0.07 ^A	0.75 ^A	0.74 ^A	0.72 ^A	1.16 ^A	0.97 ^A	1.10 ^A	1.41 ^A	1.16 ^A	1.41 ^A	1.16 ^A	1.26 ^A
Flock 45	13	0.21 ^{AB}	0.10 ^B	0.63 ^A	0.88 ^A	0.73 ^A	1.27 ^A	1.44 ^A	0.92 ^B	1.81 ^A	1.31 ^B	1.12 ^B	1.31 ^B	1.12 ^B	2.10 ^A
Flocks 9 & 11	10	0.03 ^A	0.08 ^A	0.13 ^A	0.48 ^A	0.45 ^A	0.53 ^A	0.73 ^A	0.75 ^A	0.85 ^A	1.03 ^A	0.88 ^A	1.03 ^A	0.88 ^A	1.08 ^A
<u>Isolate^d</u>															
TK3	1	N.D. ^e	0.13	N.D.	N.D.	1.17	N.D.	N.D.	1.33	N.D.	N.D.	1.50	N.D.	1.50	N.D.
7122	1	0.25	N.D.	N.D.	1.33	N.D.	N.D.	2.00	N.D.	N.D.	2.33	N.D.	2.33	N.D.	N.D.
MT78	1	N.D.	N.D.	0.67	N.D.	N.D.	2.67	N.D.	N.D.	3.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.67
TK55	1	0.13	0.00	0.20	0.67	0.33	0.67	0.67	0.67	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.67

^a Mean number of adherent bacteria in each tissue layer per microscopic field (400X). See materials and methods.

^b Isolates grown in CFA at 26°C or in TSB or TSAB at 37°C.

^c Means with the same capital letter (A or B) on the same row are not significantly different as determined by MANOVA analysis.

^d TK3 : positive control grown on TSAB; 7122 : positive control grown on CFA; MT78 : positive control grown on TSB; TK55 : negative control grown in each culture condition.

^e Not done.

Table 4. Adherence to skin tissue sections of *E. coli* isolates in relation to serogroup, following bacterial growth in different culture conditions

Mean score ^a of adherence of bacteria to different tissue layers													
Serogroup	No. of isolates examined	Superficial						following growth in different conditions					
		Dermis			Cutaneous			Muscular					
		CFA ^b	TSAB	TSB	CFA	TSAB	TSB	CFA	TSAB	TSB	CFA	TSAB	TSB
O2	1	0.00	0.25	0.50	0.75	1.25	1.00	1.50	1.75	2.00	1.00	1.00	1.75
O78	30	0.19 ^{Ac}	0.14 ^A	0.32 ^A	0.81 ^A	0.96 ^A	1.28 ^A	0.95 ^B	1.41 ^A	1.37 ^{AB}	1.14 ^B	1.14 ^B	1.63 ^A
O101	2	0.00	0.25	0.38	0.63	0.88	1.13	1.50	1.38	1.75	1.75	1.75	1.50
O147	6	0.04 ^A	0.00 ^A	0.00 ^A	0.38 ^A	0.29 ^A	0.54 ^A	0.33 ^A	0.67 ^A	0.63 ^A	0.63 ^A	0.63 ^A	0.88 ^A
Untypable	1	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.75	0.50	0.25	1.00	0.50	0.50	0.50

^a Mean number of adherent bacteria in each tissue layer per microscopic field (400X). See materials and methods.

^b Isolates grown in CFA at 26°C or in TSB or TSAB at 37°C.

^c Means with the same capital letter (A or B) on the same row are not significantly different as determined by MANOVA analysis.

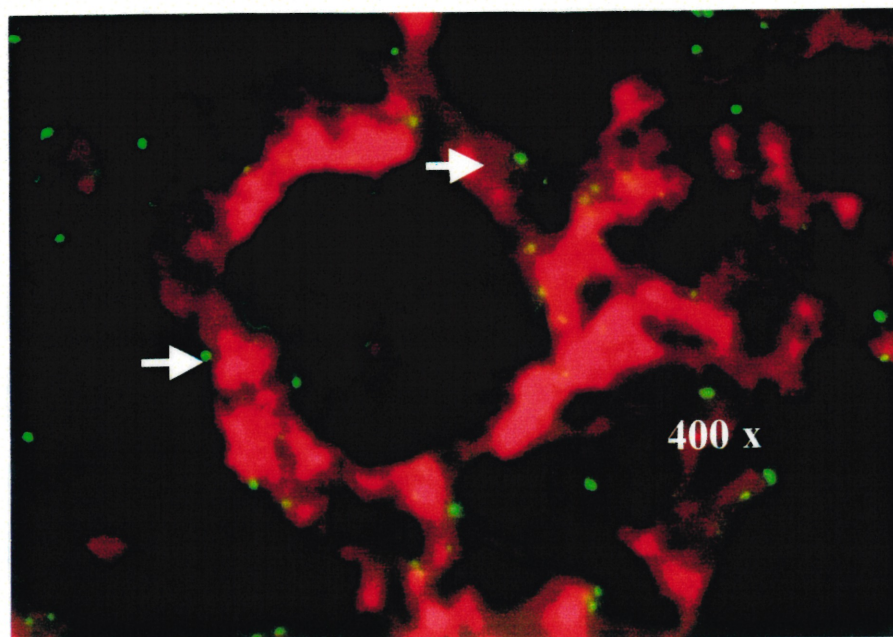


Figure 1. *E. coli* isolate 45A9 adhering at a 2+ score to the cutaneous layer of chicken skin frozen sections, after growth in TSB at 37°C. Bacteria were demonstrated by indirect immunofluorescence.

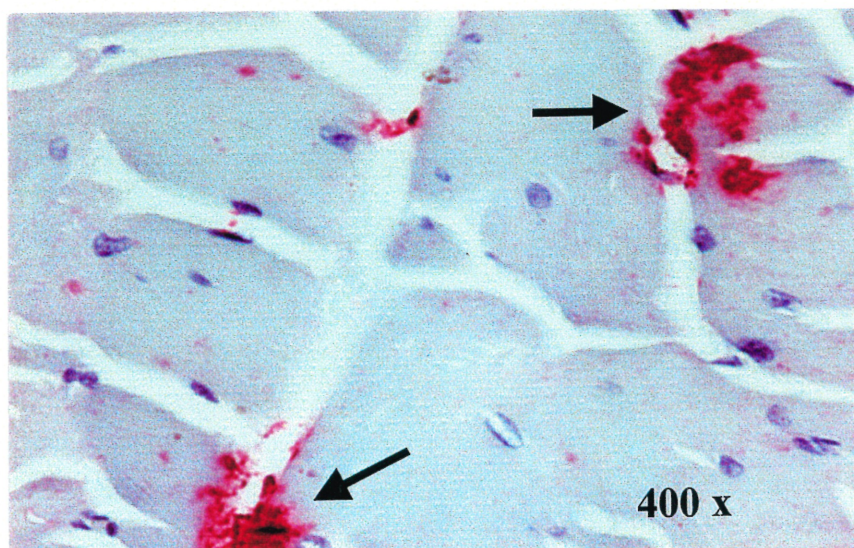


Figure 2. Adherence of *E. coli* isolate 45A7 in aggregate mass formations around muscle fibers of formalin fixed chicken skin sections, after growth in CFA at 26°C. Bacteria were demonstrated by Fast-Red staining.

REFERENCES

1. Chérifi, A., M. Contrepois, B. Picard, P. Goulet, I. Orskov, and F. Orskov. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* 32:1197-1202. 1994.
2. Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316. 1999.
3. Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bossé. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* 60:2648-2656. 1992.
4. Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, and J. M. Fairbrother. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 38:231-239. 1994.
5. Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, and J. M. Fairbrother. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Micro.* 45:297-309. 1995.
6. Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss III. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian

Escherichia coli, and localization and analysis of the *tsh* genetic region. 2000.

7. Duguid, J. P., S. Clegg, and M. I., Wilson. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 12:213-227. 1979.

8. Elfadil, A. A., J.-P. Vaillancourt, A. H. Meek, R. J. Julian, and C. L. Gyles Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Dis.* 40:690-698. 1996.

9. Eterradosi, N. La dermite nécrotique du poulet de chair. Aspects anatomocliniques, étiologie et étude expérimentale de la maladie. Thèse de fin d'études. École nationale vétérinaire, Nantes. 154 p. 1989.

10. Falk, P., T. Borén, D. Haslam, and M. Caparon. Bacterial adhesion and colonization assays. In: *Microbes as tools for cell biology*, vol. 45, D. G. Russell, ed. *Methods in Cell Biology*. Academic Press Inc., San Diego, CA. 1994.

11. Faris, A., K. Krovacek, G. Fröman, and T. Wadström. Binding of fibronectin to *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis from different geographical regions. *Vet. Microbiol.* 15:129-136. 1987.

12. Fawcett, D. W. Epithelium. In: *A Textbook of Histology*, 12th ed. Chapman & Hall, New York. 1994.

13. Ganter, P., and G. Jollès. *Histochimie normale et pathologique*, vol I. Paris. 1969.
14. Gomis, S. M., R. Goodhope, L. Kumor, N. Caddy, C. Riddell, A. A. Potter, and B. J. Allan. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broilers at slaughter. *Can. Vet. J.* 38:159-162. 1997.
15. Haméon, G. La cellulite du poulet de chair au Québec, description des lésions et évaluation de la diversité génétique des isolats d'*Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal. 123 p. 1995.
16. Herenda, D. C., and D. A. Franco. Integumentary system and pigments. In: *Poultry disease and meat hygiene*. Iowa State University Press, Ames. 1996.
17. Kukkonen, M., T. Raunio, R. Virkola, K. Lähteenmäki, P. H. Mäkelä, P. Klemm, S. Clegg, and T. K. Korhonen. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol. Microbiol.* 7:229-237. 1993.
18. Kumor, L. W., A. A. Olkowski, S. M. Gomis, and B. J. Allan. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Dis.* 42:285-291. 1998.

19. Maurer, J. J., T. P. Brown, W. L. Steffens, and S. G. Thayer. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 42:106-118. 1998.
20. Messier, S., S. Quessy, Y. Robinson, L. A. Devriese, and J. Hommez. Focal dermatitis and cellulitis in broiler chickens: bacteriological and pathological findings. *Avian Dis.* 37:839- 844. 1993.
21. Nairn, R. C. Fluorescent protein tracing, 3rd ed. London, Livingstone. 1969.
22. Ngeleka, M., J. K. P. Kwaga, D. G. White, T. S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A. A. Potter, and B. Allan. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.* 64:3118-3126. 1996.
23. Norton, R. A. Avian cellulitis. *World's Poultry Sci. J.* 53:337-349. 1997.
24. Norton, R. A. Cellulitis: a continuing problem for the modern poultry industry. Atlantic Poultry Conference, Auburn, AL. pp. 105-107. 1999.
25. Norton, R. A., K. S. Macklin, and B. L. McMurtrey. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.* 43:320- 325. 1999.

26. Olsén, A., A. Jonsson, and S. Normark. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature (London)* 338:652-655. 1989.
27. Olsén, A., M. J. Wick, M. Mörgelin, and L. Björck. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* 66:944-949. 1998.
28. Peighambari, S. M., J.-P. Vaillancourt, R. A. Wilson, and C. L. Gyles. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. *Avian Dis.* 39:125-134. 1995.
29. Pourbakhsh, S. A., and J. M. Fairbrother. Purification and characterization of P fimbriae from an *Escherichia coli* strain isolated from a septicemic turkey. *FEMS Microbiol. Lett.* 122:313-318. 1994.
30. Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathogen.* 22:331-341. 1997.
31. Provence, D. L., and R. Curtiss III. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. *Infect. Immun.* 60:4460-4467. 1992.

32. Provence, D. L., and R. Curtiss III. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 62:1369-1380. 1994.
33. Scherrer, B. *Biostatistique*, Gaëtan Morin éd. 1984.
34. Sokurenko, E. V., H. S. Courtney, S. N. Abraham, P. Klemm, and D. L. Hasty. Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:4709-4719. 1992.
35. Visai, L., P. Speziale, and S. Bozzini. Binding of collagens to an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 58:449-455. 1990.
36. Weiss, L. Cell and tissue biology. In: *A textbook of histology*, 6th ed. Urban & Schwarzenberg Inc., Germany. 1988.
37. Westerlund, B., P. Kuusela, T. Vartio, I. van Die, and T. K. Korhonen. A novel lectin-independent interaction of P fimbriae of *Escherichia coli* with immobilized fibronectin. *FEBS Lett.* 243:199-204. 1989.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Conseil de Recherches en Pêche et en Agro-alimentaire du Québec and the Fédération des Producteurs de Volailles du Québec. We thank Clarisse Desautels and Serge Sénéchal for their technical assistance on this project.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer les propriétés hémagglutinantes de certains isolats afin de sélectionner un certain nombre d'isolats d'après les caractéristiques suivantes : type de troupeau, provenance de l'échantillon de *E. coli*, séro groupe et réaction d'hémagglutination. Aussi, nous avons évalué leur capacité à lier la fibronectine soluble d'origine humaine à l'aide d'un test *in vitro*. Par la suite, nous avons évalué la capacité adhésive des isolats, d'abord sur coupes de tissus congelés fixées au méthanol, puis sur des coupes de tissus traités à la formaline.

Le but d'un test d'hémagglutination est de mettre en évidence une agglutination des érythrocytes et de vérifier si cette réaction est inhibée par la présence de mannose (Old, 1985). Nous avons donc vérifié cette propriété chez nos isolats de *E. coli* aviaires à l'aide de globules rouges de poulet et de cobaye en présence ou non de D-mannose. Le cobaye serait l'espèce animale de choix pour vérifier cette propriété (Duguid et coll., 1979; Old, 1985). Une étude a identifié le récepteur associé au fimbriae F1 comme étant une glycoprotéine de 65 kDa contenant une portion carbohydrate spécifique (α -D-mannose) retrouvée entre autre chez les globules rouges du cobaye (Giampapa et coll., 1988). Afin d'évaluer si les isolats possèdent un ou plusieurs types d'hémagglutinines, il faut utiliser des globules rouges d'au moins deux espèces animales pour en faire la démonstration (Duguid et coll., 1979). Nos résultats indiquent que le même nombre d'isolats donnaient une réaction MSHA à la fois avec les globules rouges de poulet et de cobaye. Les travaux de Dozois et coll. (1992) et Ngeleka et coll. (1996) ont montré qu'en moyenne 38% et 56%, et 38% et 69% de leurs isolats donnaient une réaction MSHA avec les érythrocytes de poulet et de cobaye, respectivement. Certaines différences dans les

milieux de culture utilisés pourraient expliquer ces variations. Il est en effet reconnu que l'expression phénotypique des structures impliquées dans l'héماغglutination dépend, entre autres, des conditions de croissance et du nombre de passage en bouillon dans lesquels ceux-ci sont cultivés (Ofek et coll., 1982; Ofek, 1994). Les 40 isolats n'ont pas tous donné le même patron d'héماغglutination, donc on ne peut pas dire que tous ces 40 isolats expriment le récepteur pour le fimbriae F1. Le fimbriae F1 peut être exprimé par les isolats provenant de cas de cellulite (Ngeleka et coll., 1996), mais son rôle dans la pathogénie de l'infection reste à préciser (Dho et Fairbrother, 1999). Treize des 16 isolats provenant de lésions de cellulite d'un lot à forte prévalence (lot 45) exprimeraient le fimbriae F1, alors que les 17 isolats provenant également de lésions de cellulite d'un lot à forte prévalence (lot 43) ne semblent pas exprimer cette adhésine étant donné l'absence de réaction d'héماغglutination. La possibilité qu'un fimbriae F1 puisse être exprimé en absence de réaction d'héماغglutination a été évoquée et expliquée par le fait que les sites d'attachement sont inaccessibles ou que la présence de structures à la surface des bactéries interfèrent avec la réaction (Ofek et coll., 1982). Les isolats O78:K80 du lot 43 appartiendraient à un groupe et les isolats O78:K80 du lot 45 à un autre groupe sur la base de la réaction d'héماغglutination. Trente des 33 isolats provenant des lots à forte prévalence de cellulite appartenaient au séroгroupe O78:K80 (Haméon, 1995), et les résultats de l'épreuve d'héماغglutination obtenus avec ces isolats, de même qu'avec six isolats appartenant au séroгroupe O147, confirment le fait qu'à l'intérieur d'un même séroгroupe l'expression d'adhésines peut être différente (Duguid et col., 1979). L'épreuve d'héماغglutination est une méthode indirecte de mettre en évidence certaines adhésines et ne permet probablement pas de démontrer la présence de toutes les

adhésines qui seraient présentes. L'utilisation de sondes génomiques spécifiques aux différentes adhésines auraient été une autre façon de vérifier la présence possible des gènes codant pour des adhésines non détectables par la réaction d'hémagglutination. En effet, il serait intéressant de comparer le profil génotypique de nos isolats (*pap* et *pil* ou *fim*) appartenant au lot 43 versus ceux au lot 45 pour savoir si les isolats HA~ possèdent, entre autres, le gène *pil* ou *fim* puisqu'ils ne semblent pas exprimer le fimbriae F1 lorsque cultivés dans le TSB.

La cytométrie en flux permet d'analyser divers paramètres cellulaires à une vitesse allant de 100 à 1000 cellules par seconde avec une sensibilité permettant de détecter quelques centaines de molécules fluorescentes par cellule (Boye and Steen, 1993; Davey et Kell, 1996). Nous avons utilisé cette méthodologie pour évaluer la capacité d'attachement de la fibronectine soluble aux isolats de *E. coli* pour améliorer notre compréhension de l'étape de l'adhésion dans la pathogénie de la cellulite. La fibronectine est une glycoprotéine adhésive multifonctionnelle, au même titre que la laminine (Kukkonen et coll., 1993; Fawcett, 1994), jouant un rôle central dans l'adhésion cellulaire (Ruoslahti, 1988). Il a été rapporté que *Staphylococcus aureus* adhère à la fibronectine (Kuusela, 1978), de même que *Streptococcus pyogenes* (Speziale et coll., 1984) et *E. coli* (Fröman et coll., 1984). Nous avons utilisé la fibronectine soluble pour évaluer la capacité de liaison de nos isolats de *E. coli* associés à la cellulite. D'après certains, un traumatisme mécanique pourrait causer des micro-lésions à l'épithélium de la peau exposant ainsi la fibronectine et par conséquent permet aux bactéries présentes sur la peau de coloniser de telles lésions avant d'envahir le tissu, ce qui pourra entraîner une infection (Wadström et coll., 1985; Faris et coll., 1987; Jin et coll., 1991). Il a été

démontré que des isolats de *E. coli* obtenus de cas de diarrhée infantile et de mammite bovine, cultivés à 33°C sur milieux CFA ont lié la fibronectine soluble (Fröman et coll., 1984; Faris et coll., 1987). D'autres études effectuées à l'aide d'isolats uropathogènes et de souches de laboratoire cultivées sur gélose Luria et en bouillon BHI à 37°C, respectivement, n'ont pas lié la fibronectine soluble mais ont adhéré à la fibronectine insoluble (Westerlund et coll., 1989; Sokurenko et coll., 1992). Les isolats de *E. coli* que nous avons testé ont démontré peu d'affinité pour la fibronectine soluble. Ceci pourrait être dû au fait qu'en solution, la molécule de fibronectine a une forme globulaire et démontre une interaction monovalente de faible affinité avec les fimbriae des bactéries, mais lorsque la fibronectine devient adsorbée sur un substrat, elle prend une forme linéaire et les interactions entre la bactérie et la molécule de fibronectine seraient multivalentes, augmentant ainsi les chances d'interactions (Westerlund et coll., 1989; Sokurenko et coll., 1992). Mosher (1989) ont également rapporté que le maintien prolongé en laboratoire de souches de *S. pyogenes* et *E. coli* pouvait résulter en la perte de l'expression du récepteur de la fibronectine. Les bactéries pourraient avoir besoin du récepteur pour croître dans les tissus de l'hôte, mais pas sur milieu artificiel enrichi. Cette perte de l'expression dans le temps s'expliquerait probablement par le fait que les bactéries synthétisent les récepteurs à un même taux, mais qu'ils seraient dégradés à des taux différents (Mosher, 1989). Nous avons pu observer ce phénomène avec l'isolat clinique de *S. pyogenes*, mais pas avec nos isolats aviaires dont le niveau d'attachement en début d'expérimentation était déjà peu élevé. L'expression du fimbriae F1 comme facteur de virulence est encore aujourd'hui controversé et ce facteur d'attachement est présent en plus grand nombre chez les souches systémiques que chez les souches

intestinales (Wooley et coll., 1992).

Bien que l'épreuve d'adhérence au tissu fut réalisée avec des échantillons de peau où aucune réaction inflammatoire n'était présente, l'utilisation de méthanol pour la fixation de coupes congelées permet, à cause du faible pouvoir fixateur du méthanol, de précipiter les protéines globulaires par dénaturation et altérer ainsi la structure tertiaire des protéines, mais de laisser pratiquement intact les groupes réactifs des protéines et préserver ainsi leur capacité à réagir avec d'autres molécules (Nairn, 1969; Ganter et Jollès, 1969; Pearse, 1980).

Malgré que des différences aient été observées selon les milieux de culture et les conditions d'incubation utilisés, nos résultats suggèrent que les isolats provenant des lots à prévalence élevée de cellulite adhèrent mieux aux sections profondes du tissu cutané que ne le font les isolats provenant des lots à faible prévalence de cellulite.

La culture en milieu CFA à une température de 26°C favorise l'expression des facteurs d'attachement Tsh et le curli. Il a été démontré que l'adhésine curli interagissait uniquement avec les composants de formes solubles dans la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, la laminine, le collagène I et IV, et dernièrement le CMH-I (Collinson et coll., 1993; Olsén et coll., 1998; Maurer et coll., 1998). Des études d'inhibition ont indiqué que la FN médie l'adhésion des souches de *E. coli* possédant un curli en formant un lien entre la bactérie et le collagène de type 1 retrouvé dans la couche réticulaire de la peau (Westerlund et Korkonen, 1993; Olsén et coll., 1993). Dans la liaison à la fibronectine soluble évaluée par la cytométrie en flux, nos isolats cultivés dans le CFA à 26°C auraient dû lier de façon plus marquée cette protéine s'ils avaient produit le curli. Il semble donc que l'expression de l'adhésine Tsh serait plutôt en cause

pour expliquer l'adhésion des isolats concernés aux sections de tissu congelé.

La croissance sur TSAB à 37°C favorise, entre autres, l'expression du fimbriae P, qui est reconnu pour lier seulement la fibronectine insoluble et non la fibronectine soluble, démontrant ainsi que la liaison est dépendante de la conformation de la molécule (Westerlund et coll., 1989). Cette observation pourrait expliquer pourquoi les isolats du lot 43 adhèrent aux coupes de tissu mais ne lient pas la fibronectine soluble. Ceci serait également corroboré par le fait que les isolats se fixent de façon plus marquée aux couches profondes du tissu cutané et que la fibronectine insoluble se localise dans les trois couches profondes du tissu (Fawcett, 1994).

La croissance de nos isolats en bouillon TSB à 37°C avait pour but la production optimale des fimbriae F1 qui, tout comme le fimbriae P, se lient à la fibronectine insoluble, et non à sa forme soluble (Sokurenko et coll., 1992; Kukkonen et coll., 1993), de même qu'à la laminine insoluble, une glycoprotéine de la membrane basale qui forme un réseau d'interactions avec différentes cellules et molécules (Smyth et coll., 1994). Nos résultats tendent à démontrer que ce type de fimbriae est produit par les isolats du lot 45 puisque ces derniers causent une hémagglutination MSHA et se lient bien aux couches profondes du tissu cutané. Les isolats du lot 43 bien que provenant d'un lot à forte prévalence de cellulite, ne semblent pas produire de fimbriae F1 car ils ne causent pas d'hémagglutination et ils n'adhèrent pas plus que le témoin négatif aux coupes de tissu congelé.

L'analyse de nos résultats lors d'études permettant de comparer l'influence des conditions de culture sur l'adhérence des isolats à chacune des couches tissulaires a démontré que seuls les isolats provenant du lot 45 (troupeau à prévalence élevée de

cellulite) ont semblé être influencés par les conditions de culture. Les différents niveaux d'adhérence observés avec ces isolats pourraient laisser croire qu'ils possèdent différents mécanismes permettant l'attachement et que ces mécanismes seront exprimés selon les conditions dans lesquelles se trouvent les isolats. L'incubation en milieu liquide (TSB) à 37°C semble toutefois être une condition qui permet une bonne expression de l'adhésine fimbriale F1. Lorsque cette analyse est répétée mais cette fois-ci en tenant compte du sérotype des isolats, l'adhérence d'isolats appartenant au sérotype O78 aux différentes couches tissulaires est influencée par les conditions d'incubation. L'adhérence plus marquée d'isolats de ce sérotype pourrait expliquer pourquoi des isolats de ce sérotype sont fréquemment isolés de lésions de cellulite (Messier et coll., 1993; Peighambari et coll., 1995a; Gomis et coll., 1997b).

D'une manière analogue à l'évaluation de l'effet du D-mannose sur la réaction d'hémagglutination, nous avons vérifié l'effet de ce composé sur l'adhérence des isolats aux coupes de tissu congelé. Les résultats confirment les différentes observations précédentes en ce sens que l'adhérence des isolats du lot 45 cultivés dans le milieu TSAB à 37°C est inhibée par la présence de D-mannose et ceux-ci exprimeraient donc la fimbriae F1. L'absence d'attachement par ces isolats à la partie superficielle du tissu cutané en présence de D-mannose laisserait supposer que seulement cette adhésine est impliquée dans l'adhérence à cet endroit. Au niveau des couches profondes l'inhibition de l'adhérence n'est pas totale suggérant que l'expression d'autres facteurs d'attachement produits en même temps que les fimbriae F1 est possible par ces isolats.

Les récepteurs tissulaires pour la fimbriae F1 semblent être ceux qui sont le plus affectés par le traitement à la formaline tel que le démontrent les résultats des épreuves

d'adhérence avec les isolats cultivés dans les différentes conditions d'incubation. La nature du récepteur du fimbriae F1, chez les souches uropathogènes, serait les glycoprotéines portant plusieurs chaînes saccharides différentes liées à la même séquence du polypeptide (Smyth et coll., 1994).

Dans le test d'adhésion sur coupes de tissus fixés à la formaline (résultats non publiés), nous avons pu constater que les quelques isolats cultivés dans les trois milieux de culture provenant de lots à forte prévalence de cellulite n'ont pu adhérer aussi bien que sur les tissus congelés parce que la formaline modifie certaines structures moléculaires des récepteurs associés aux adhésines bactérienne; et que les isolats cultivés dans le CFA à 26°C manifestent une adhérence au tissu en région musculaire. Ces faits suggèrent que les récepteurs de nos isolats sont retrouvés dans le tissu profond plutôt que dans le tissu superficiel.

De part la localisation des différents isolats adhérents aux coupes de tissus traités à la formaline et colorés par immunohistochimie au Fast-Red, nous pouvons émettre certaines hypothèses quant aux protéines impliquées dans l'adhérence de nos isolats au tissu cutané. Le collagène semble un choix logique étant donné sa présence à presque toutes les couches du tissu cutané (Weiss, 1988; Fawcett, 1994). Il est également présent dans le fascia entourant les fibres musculaire et nous avons observé de nombreuses bactéries présentes à cette localisation. La présence d'élastine, de fibronectine et de thrombospondine est également notée dans des proportions qui peuvent varier selon la portion de tissu considérée (Weiss, 1988; Fawcett, 1994).

5. CONCLUSIONS

L'observation de réactions d'hémagglutination causées par certains des isolats provenant de lésions de cellulite laisse à penser qu'ils peuvent exprimer des structures favorisant leur liaison aux tissus de l'hôte.

Nous avons observé que la liaison à la fibronectine soluble, comme mécanisme de liaison, ne semble pas importante dans l'attachement au tissu cutané lésé puisque nous n'avons pas tenu un nombre appréciable d'isolats avec un ratio de fluorescence supérieur ou égal à 2.0 dans le test de liaison à la fibronectine. Ainsi, pour mieux comprendre les étapes de la pathogénie de la cellulite, d'autres protéines de la matrice extracellulaires devront être étudiées afin d'évaluer leur rôle dans le mécanisme de liaison.

Lors du test d'adhérence sur coupes de tissus congelés, nous avons pu constater que les isolats à forte prévalence de cellulite ont une meilleure capacité d'adhérence aux trois couches profondes du tissu cutané. Chacun de nos deux lots à forte prévalence de cellulite possédaient un profil différent d'HA, ce qui pourrait expliquer les différences obtenues dans l'adhérence au tissu. Également, certains sérogroupes sont plus souvent associés que d'autres dans l'adhérence au tissu, entre autres, le séro groupe O2, O78 et O101. Enfin, l'inhibition par le D-mannose laisse supposer que le fimbriae F1 serait exprimé par les isolats du lot 45, et ce, sur milieu de culture solide.

En somme, l'expression par les isolats d'adhésines, dans un milieu de culture donné, révèle le profil de leurs sites d'adhérence à travers le tissu cutané. L'adhérence spécifique pourrait expliquer le pouvoir pathogène que ceux-ci peuvent posséder *in vivo* et le développement de lésions de cellulite, le cas échéant. Les sites d'adhérence seraient probablement associés aux types de collagènes puisqu'ils sont des constituants majeurs des couches profondes du tissu cutané. Dans des études ultérieures, ces protéines

devraient être étudiées pour mieux comprendre comment fonctionne le(s) mécanisme(s) d'adhérence qu'utilisent les isolats de *E. coli* aviaires associés à la cellulite pour adhérer aux couches profondes du tissu cutané.

6. BIBLIOGRAPHIE

Arnqvist, A., A. Olsén, J. Pteifer, D. G. Russell, and S. Normark. 1992. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol. Microbiol.* **6**:2443-2452.

Arp, L. H. 1989. Colibacillosis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th ed. American Association of Avian Pathologists, Iowa, pp. 12-13.

Barnes, H. J., and W. B. Gross. 1997. Colibacillosis. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 131-141.

Ben Nasr, A., A. Olsén, U. Sjöbring, W. Müller-Esterl, and L. Björck. 1996. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:927-935.

Bergmann, V. V., and J. Scheer. 1979. Ökonomisch bedeutungsvolle Verlustursachen bei schlachtgeflügel. *Mh. Vet. Med.* **34**:543-547.

Bisaillon, J.-R., A. H. Meek, and T. E. Feltmate. 1988. An assessment of condemnations of broiler chicken carcasses. *Can. J. Vet. Res.* **52**:269-276.

Boye, E., and B. Steen. 1993. The physical and biological basis for flow cytometry of *Escherichia coli*. In: Flow cytometry in microbiology, chapter 2, Lloyd, D., ed. Springer-Verlag, London.

Carbonetti, N. H., and P. H. Williams. 1985. Detection of synthesis of the hydroxamate siderophore aerobactin by pathogenic isolates of *Escherichia coli*. In: The virulence of *Escherichia coli*. M. Sussman, ed. The Society for General Microbiology by Academic Press, London, United Kingdom, pp. 419-424.

Caya, F., J. M. Fairbrother, L. Lessard, and S. Quessy. 1999. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J. Food Protection* **62**:741-746.

Chanteloup, N. K., M. Dho-Moulin, E. Esnault, A. Brée, and J. P. Lafont. 1991. Serological conservation and location of the adhesin of avian *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Microb. Pathogen.* **10**:271-280.

Cheville, N. F., and L. H. Arp. 1978. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **173**:584-587.

Cheville, N. F. 1994. In *Ultrastructural pathology : an introduction to interpretation*, 1st ed., Iowa State University Press, Ames, pp. 288-289.

- Clegg, S., and G. F. Gerlach.** 1987. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* **169**:934-938.
- Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson and E. M. Odor.** 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis.* **29**:1084-1093.
- Collinson, S. K., S. C. Clouthier, J. L. Doran, P. A. Banser, and W. W. Kay.** 1996. *Salmonella enteritidis agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* **178**:662-667.
- Collinson, S. K., P. C. Doig, J. L. Doran, S. Clouthier, T. J. Trust, and W. W. Kay.** 1993. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* **175**:12-18.
- Davey, H. M., and D. B. Kell.** 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogenous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiol. Rev.* **60**:641-696.
- Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* **30**:299-316.
- Dietzel, A.** 1988. Skin tears, scratches, barebacks and scabby hip syndrome in broilers. In: Bio-Cox, A technical service report, Agri-Bio Corp., Gainesville, GA.

Doran, J. L., S. K. Collinson, J. Burian, G. Sarlos, E. C. D. Todd, C. K. Munro, C. M. Kay, P. A. Banser, P. I. Peterkin, and W. W. Kay. 1993. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2263-2273.

Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bossé. 1992. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* **60**:2648-2656.

Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh and J. M. Fairbrother. 1995. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Micro.* **45**:297-309.

Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss III. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli*, and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Inf. Immun.* **68**:4145-4154.

Duguid, J. P., S. Clegg, and M. I. Wilson. 1979. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **12**:213-227.

Duguid, J. P., I. W. Smith, G. Dempster, and P. N. Edmunds. 1955. Non flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J. Pathol. Bacteriol. **70**:335-349.

Elfadil, A. A., J.-P. Vaillancourt, and A. H. Meek. 1996a. Impact of stocking density, breed, and feathering on the prevalence of abdominal skin scratches in broiler chickens. Avian Dis. **40**:546-552.

Elfadil, A. A., J.-P. Vaillancourt, A. H. Meek, and C. L. Gyles. 1996b. A prospective study of cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. Avian Dis. **40**:677-689.

Elfadil, A. A., J.-P. Vaillancourt, A. H. Meek, R. J. Julian, and C. L. Gyles. 1996c. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. Avian Dis. **40**:690-698.

Elfadil, A. A., J.-P. Vaillancourt, and A. H. Meek. 1996d. Farm management risk factors associated with cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. Avian Dis. **40**:699-706.

Eterradossi, N. 1989. La dermite nécrotique du poulet de chair. Aspects anatomocliniques, étiologie et étude expérimentale de la maladie. Thèse de fin d'études, École nationale vétérinaire, Nantes.

Etteradossi, N., P. Drouin, et J.-Y. Toux. 1997. Dermite nécrotique et cellulite : mêmes causes, mêmes effets. Supplément à la Semaine Vétérinaire, no 841 du 25 janvier, pp. IV.

Faris, A., K. Krovacek, G. Fröman, and T. Wadström. 1987. Binding of fibronectin to *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis from different geographical regions. *Vet. Microbiol.* **15**:129-136.

Fawcett, D. W. 1994. Epithelium. In: A textbook of histology, 12th ed. Chapman & Hall, New York, pp. 72-73.

Fröman, G., L. M. Switalski, A. Faris, T. Wadstrom, and M. Hook. 1984. Binding of *Escherichia coli* to fibronectin. A mechanism of tissue adherence. *J. Biol. Chem.* **259**:14899-14905.

Ganter, P., and G. Jollès. 1969. Histochimie normale et pathologique, vol I. Paris. 923 p.

Garcia Gonzalez, E. 1992. Adhesion factors of extraintestinal *Escherichia coli* strains. PhD thesis, University of Utrecht. The Netherlands. 161 p.

Giampapa, C. S., S. N. Abraham, T. M. Chiang, and E. H. Beachey. 1988. Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **263**:5362-5367.

Glünder, G. 1990. Dermatitis in broilers caused by *Escherichia coli*: isolation of *Escherichia coli* from field cases, reproduction of the disease with *Escherichia coli* O78:K80 and conclusions under consideration of predisposing factors. J. Vet. Med. B. **37**:383-391.

Gomis, S. M., T. Watts, C. Riddell, A. A. Potter, and B. J. Allan. 1997a. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. Avian Dis. **41**:234-240.

Gomis, S. M., R. Goodhope, L. Kumor, N. Caddy, C. Riddell, A. A. Potter, and B. J. Allan. 1997b. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broilers at slaughter. Can. Vet. J. **38**:159-162.

Goodhope, R. G., C. Riddell, and B. Allan. 1992. A descriptive study of cellulitis in Saskatchewan broiler chickens. Proc. 129th Annual Meet. Am. Vet. Med. Assoc., Boston. p. 129.

Göransson, M., and E. E. Uhlin. 1984. Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *Escherichia coli*. EMBO J. **3**:2885-2888.

Gross, W. B. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans, C. L. Gyles, ed. CAB Int., Wallingford, UK. pp. 237-260.

Gyimah, J. E., and B. Panigrahy. 1988. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis.* **32**:74-78.

Haméon, G. 1995. La cellulite du poulet de chair au Québec, description des lésions et évaluation de la diversité génétique des isolats d'*Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal. 123 p.

Harel, J., and C. Martin. 1999. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* **30**:131-155.

Harry, E. G., and Hemsley, L. A. 1965. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia. *Vet. Rec.* **77**:35-40.

Herenda, D., and O. Jakel. 1994. Poultry abattoir survey of carcass condemnation for standard, vegetarian, and free range chickens. *Can. Vet. J.* **35**:293-296.

Herenda, D. C., and D. A. Franco. 1996. Integumentary system and pigments. In: *Poultry disease and meat hygiene*. Iowa state University Press, Ames. Iowa, pp. 151-154.

Hoerr, F. J. 1988. Cellulitis as a cause of broiler condemnations. *Broiler News*. August.

Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew, and S. Falkow. 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* **33**:933-938.

Jann, K., and H. Hoschützky. 1990. Nature and organization of adhesins. In: *Bacterial adhesins.* *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**:55-70.

Jann, K., and Jann, B. 1992. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can. J. Microbiol.* **38**:705-710.

Jin, H.-M., P. A. Vincent, W. E. Charash, T. M. Saba, P. McKeown-Longo, F. A. Blumenstock, and E. Lewis. 1991. Incorporation of circulating fibronectin into various tissues during sepsis: colocalization with endogenous tissue fibronectin. *Exp. Mol. Pathol.* **55**:203-216.

Johnson, L. C., S. F. Bilgili, F. J. Hoerr, O. A. Oyarzabal, and M. K. Eckman. 1996. Evaluation of various inoculation routes to reproduce cellulitis in broilers using field isolates of *Escherichia coli*. *Poultry Sc.* **75** (Suppl. 1):121.

Kallenius, G., S. B. Svenson, R. Möllby, B. Cedergren, H. Hultberg, and J. Winberg. 1981. Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli*. *Lancet* **II**:604-606.

Klemm, P. 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Infect. Dis. 7:321-340.

Korhonen, T. K., R. Virkola, K. Lähteenmäki, Y. Björkman, T. Raunio, A.-M. Tarkkanen, and B. Westerlund. 1992. Penetration of fimbriate enteric bacteria through basement membranes: a hypothesis. FEMS Microbiol. Lett. 100:307-312.

Krogfelt, K. A. 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Infect. Dis. 13:721-735.

Kuehn, M. J., J. Heuser, S. Normark, and S. J. Hultgren. 1992. P pili in uropathogenic *Escherichia coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. Nature (London) 356:252-255.

Kukkonen, M., T. Raunio, R. Virkola, K. Lähteenmäki, P. H. Mäkelä, P. Klemm, S. Clegg, and T. K. Korhonen. 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type 1 fimbriae of *Salmonella enteritica* and *Escherichia coli* to laminin. Mol. Microbiol. 7:229-237.

Kumor, L. W., A. A. Olkowski, S. M. Gomis and B. J. Allan. 1998. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. Avian Dis. 42:285-291.

Kuusela, P. 1978. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature (London)* **276**:718-720.

Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Inf. Dis.* **155**:377-389.

Lindberg, M., B. Lund, L. Johansson, and S. Normark. 1987. Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus. *Nature (London)* **328**:84-87.

Lucas, A. M., and P. R. Stettenheim. 1972. Integument. In: *Avian anatomy, part II, Agricultural Handbook 362, Department of Agriculture. US Government Printing Office, Washington.* pp. 485-510.

Marklund, B.-I., J. M. Tennent, E. Garcia, A. Hamers, M. Båga, F. Lindberg, W. Gastra, and S. Normark. 1992. Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. *Mol. Microbiol.* **6**:2225-2242.

Maurer, J. J., T. P. Brown, W. L. Steffens, and S. G. Thayer. 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **42**:106-118.

- McMurtrey, B. L., Norton, R. A., Macklin, K. S., and Bilgili, S. F.** 1997. Investigations into the role of *Escherichia coli* in yolksac and cellulitis infections. In: Proceedings of the 38th Southern Conference on Avian Diseases, Atlanta, Georgia, USA, abstract no. S171.
- Messier, S., S. Quessy, Y. Robinson, L. A. Devriese, and J. Homme.** 1993. Focal dermatitis and cellulitis in broiler chickens: bacteriological and pathological findings. *Avian Dis.* 37:839-844.
- Morris, M. P.** 1991. Cellulitis in broilers. *Broiler Industry.* September:32-40.
- Mosher, D. F.** 1989. Fibronectin. Biology of extracellular matrix. A series. Academic Press, San Diego. 474 p.
- Nairn, R. C.** 1969. Fluorescent protein tracing, 3rd ed. London, Livingstone. 503 p.
- Ngeleka, M., J. K. P. Kwaga, D. G. White, T. S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A. A. Potter, and B. Allan.** 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.* 64:3118-3126.
- Norton, R. A.** 1997. Avian cellulitis. *World's Poultry Sci. J.* 53:337-349.

Norton, R. A. 1999. Cellulitis: a continuing problem for the modern poultry industry. Atlantic Poultry Conference, Auburn, AL. p. 105-107.

Norton, R. A., S. F. Bilgili, and B. C. McMurtrey. 1997. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.* **41**:422-428.

Ofek, I., and E. H. Beachey. 1980. General concepts and principles of bacterial adhesion. In: *Bacterial adherence*, vol. 6, series A, E. H. Beachey, ed. Chapman and Hall, London, pp. 1-29.

Ofek, I., and J. Goldhar, Y. Eshdat, and N. Sharon. 1982. The importance of mannose specific adhesins (lectins) in infections caused by *Escherichia coli*. *Scand. J. Infectious Dis.-Suppl.* **33**:61-67.

Ofek, I., and R. J. Doyle. 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues, I. Ofek and R. J. Doyle, ed. Chapman & Hall, New York. 578 p.

Old, D. C. 1985. Hemagglutination. In: *The virulence of Escherichia coli*. M. Sussman, ed. The Society for General Microbiology by Academic Press, London, UK. 473 p.

Olkowski, A. A., L. Kumor, D. Johnson, M. Bielby, M. Chirino-Trejo, and H. L. Classen. 1999. Cellulitis lesions in turkeys identified during processing. *Vet. Rec.* **145**:228-229.

Olsén, A., A. Jonsson, and S. Normark. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature (London)* **338**:652-655.

Olsén, A., A. Arnqvist, M. Hammar, and S. Normark. 1993. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infectious Agents & Disease* **2**:272- 274.

Olsén, A., M. J. Wick, M. Mörgelin, and L. Björck. 1998. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* **66**:944-949.

Onderka, D. K., J. A. Hanson, K. R. McMillan, and B. Allan. 1997. *Escherichia coli* associated cellulitis in broilers: correlation with systemic infection and microscopic visceral lesions, and evaluation for skin trimming. *Avian Dis.* **41**:935-940.

Parkkinen, J., and T. K. Korhonen. 1989. Binding of plasminogen to *Escherichia coli* adhesin protein. *FEBS Lett.* **250**:437-440.

Pass, D. A. 1989. The pathology of the avian integument: a review. *Avian Pathol.* **18**:1-72.

Pearse, A. G. E. 1980. The chemistry and practice of fixation. In: *Histochemistry theoretical and applied*, vol. 1: Preparative and optical technology, 4th ed. Churchill Livingstone. pp. 97-158.

Peighambari, S. M., J.-P. Vaillancourt, R. A. Wilson, and C. L. Gyles. 1995a. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis.* **39**:116-124.

Peighambari, S. M., J.-P. Vaillancourt, R. A. Wilson, and C. L. Gyles. 1995b. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. *Avian Dis.* **39**:125-134.

Pourbakhsh, S. A., and J. M. Fairbrother. 1994. Purification and characterization of P fimbriae from an *Escherichia coli* strain isolated from a septicemic turkey. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**:313-318.

Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother. 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathogen.* **22**:331-341.

Provence, D. L., and R. Curtiss III. 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. *Infect. Immun.* **60**:4460-4467.

Provence, D. L., and R. Curtiss III. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **62**:1369-1380.

Quessy, S., et S. Messier. 1992. Évaluation du statut microbien sous-cutané des lésions de cellulite chez le poulet à griller. *Med. Vet. Québec.* **22**:103-104.

Randall, C. J., P. A. Meakins, M. P. Harris, and F. J. Watt. 1984. A new skin disease in broiler?. *Vet. Rec.* **114**:246.

Rosenberger, J. K., P. A. Fries, S. S. Cloud, and R. A. Wilson. 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis.* **29**:1094-1107.

Ruoslahti, E. 1988. Fibronectin and its receptors. *Annual Rev. Biochem.* **57**:375-413.

Savageau, M. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am. Nat.* **122**:732-744.

Schleifer, J. 1988. Costly skin tear problem has several major causes. *Poultry Digest.* December:580-586.

Shane, S. 1996. Culling the cause of cellulitis. *Poultry Marketing and Technology.* December/January:18-20.

Sjöbring, U., G. Pohl, and A. Olsén. 1994. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol. Microbiol.* **14**:443-452.

Smyth, C. J., M. Marron, and S. G. J. Smith. 1994. Fimbriae of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans, C. L. Gyles, ed. CAB International, Wallingford, UK, pp. 399-425.

Sojka, W. J. 1965. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, England.

Sokurenko, E. V., H. S. Courtney, S. N. Abraham, P. Klemm, and D. L. Hasty. 1992. Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**:4709-4719.

Sokurenko, E. V., H. S. Courtney, D. E. Ohman, P. Klemm, and D. L. Hasty. 1994. FimH family of type 1 fimbrial adhesins: Functional heterogeneity due to minor sequence variations among *fimH* genes. *J. Bacteriol.* **176**:748-755.

Spearman, R. I. C., and J. A. Hardy. 1985. Integument. In: Form and function in birds, volume 3, A. S. King and J. McLelland, ed. Academic Press, London. UK. 522 p.

Speziale, P., M. Hook, L. M. Switalski, and T. Wadstrom. 1984. Fibronectin binding to a *Streptococcus pyogenes* strain. *J. Bacteriol.* **157**:420-427.

Stettenheim, P. R. 1972. The integument of birds. In: *Avian biology*, volume II, D. S. Farner and J. R. King, ed. Academic Press, New York, pp. 3-9.

Stevens, A., and J. S. Lowe. 1993. Cellules de soutien et matrice extracellulaire. Dans: *Histologie*, Éditions Pradel, Paris. pp. 42-49.

Summers, J. D. 1997. Cellulitis: Is a new approach needed? *Canada Poultryman*. November:19-21.

Taylor, P. W. 1985. Measurement of the bactericidal activity of serum. In: *The virulence of Escherichia coli*. M. Sussman, ed. The Society for General Microbiology by Academic Press, London, UK. pp. 445-456.

Vaillancourt, J. P., A. Elfadil, et J. R. Bisailon. 1992. La cellulite chez le poulet de chair. *Med. Vet. Québec.* **22**:168-172.

Valentin, A., and K. Wilsch. 1987. Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese der tiefen Dermatitis bei Schlachtbroilern. *Mh. Vet. Med.* **41**:708-711.

Valvano, M. A. 1992. Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **38**:711-719.

van den Bosch, J. F., J. H. I. M. Hendriks, I. Gladigau, H. M. C. Willems, P. K. Storm, and F. K. de Graaf. 1993. Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **61**:800-806.

Vidotto, M. C., H. R. Navarro, and L. C. J. Gaziri. 1997. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **59**:79-87.

Wadström, T., L. Switalski, P. Speziale, K. Rubin, K. Ryden, C. Fröman, G. Faris, A. Lindberg, and M. Höök. 1985. Binding of microbial pathogens to connective tissue fibronectin: An early step in localized and invasive infections. In: G. Jackson, ed. The pathogenesis of bacterial infections. Bayer-Symposium VIII. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 193-207.

Waters, V. L., and J. H. Crosa. 1991. Colin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* **55**:437-450.

Weiss, L. 1988. Cell and tissue biology. In: A textbook of histology, 6th ed. Urban & Schwarzenberg Inc., Germany, pp. 142-143.

Westerlund, B., and T. K. Korhonen. 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular membrane. *Mol. Microbiol.* **9**:687-694.

Westerlund, B., P. Kuusela, T. Vartio, I. van Die, and T. K. Korhonen. 1989. A novel lectin-independent interaction of P fimbriae of *Escherichia coli* with immobilized fibronectin. *FEBS Lett.* **243**:199-204.

Westerlund, B., I. van Die, C. Kramer, P. Kuusela, H. Holthöfer, A.-M. Tarkkanen, R. Virkola, N. Riegman, H. Bergmans, W. Hoekstra, and T. K. Korhonen. 1991. Multifunctional nature of P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*: mutations in *fsoE* and *fsoF* influence fimbrial binding to renal tubuli and immobilized fibronectin. *Mol. Microbiol.* **5**:2965-2975.

White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, and T. S. Whittam. 1993. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb. Pathol.* **14**:399-409.

Whiteman, C. E. 1996. Avian colibacillosis. In: Whiteman and Bickford's Avian disease manual, 4th ed. B. R. Charlton, A. J. Bermudez, M. Boulianne, R. J. Eckroade, J. S. Jeffrey, L. J. Newman, J. E. Sander and P. S. Wakenell, ed. Pennsylvania, U. S. A, pp. 75-78.

Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan, and O. J. Fletcher. 1992.
Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian
Escherichia coli. Avian Dis. 36:679-684.

7. ANNEXES

ANNEXE I

**Sélection du nombre d'isolats de *E. coli* provenant
de l'environnement et des lésions de cellulite**

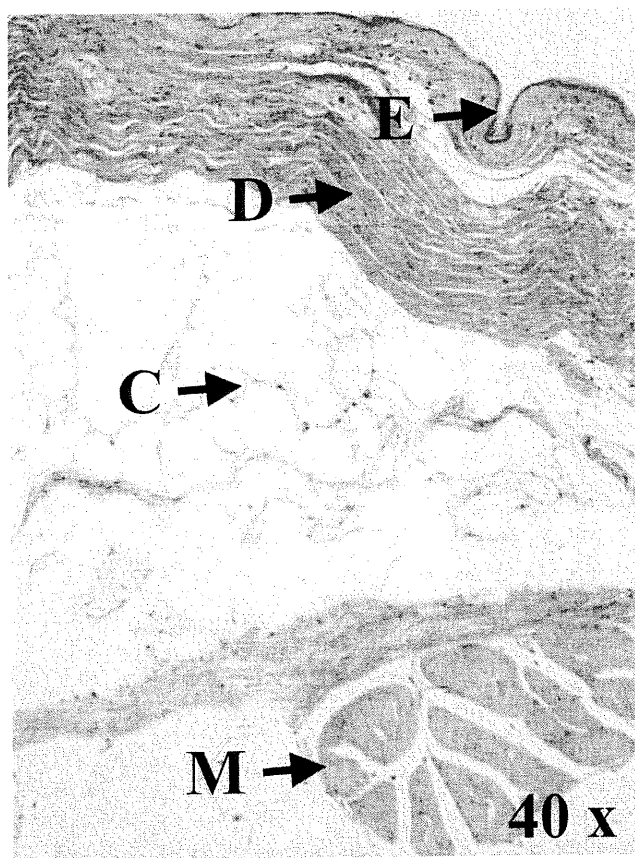
Tableau 1. Répartition des isolats de *E. coli* sélectionnés selon la provenance de l'échantillon des lots à faible prévalence (lots 9 et 11) et des lots à forte prévalence (lots 43 et 45) de cellulite.

Origine des isolats	Identification des lots				Nombre total d'isolats
	9	11	43	45	
Environnement	0	0	2	1	3
Lésions de cellulite	3	1	20	13	37

ANNEXE II

Coupe histologique de peau de poulet sain colorée au HPS

montrant les différentes couches du tissu cutané



Coupe histologique de peau de poulet sain de trois semaines d'âge colorée au HPS (Hématoxyline-Éosine-Safran) montrant les différentes couches du tissu cutané (E : Épiderme; D : Derme; C : Tissu sous-cutané; M : Tissu musculaire).