

# M2 Infectiologie Cellulaire et Moléculaire, Vaccinologie

LALMANACH A-C, UMR ISP, INRA Centre de Recherche Val de Loire, Nouzilly

Module 5 Réponse mucosale aux salmonelles,  
entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

## Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*: le portage intestinal chez les oiseaux.

### **La volaille est un réservoir:**

- Colonisation du tube digestif des oiseaux par *S. Enteritidis*, contamination des élevages de volailles.
- Poussins sensibles à l'infection : plus les animaux sont jeunes, plus le taux de mortalité est important.
- Poulet et adulte : persistance intestinale (caecum) principalement asymptomatique et excrétion fécale.
- Contaminations horizontale et verticale.
- Contamination de la chaîne alimentaire (œufs, viande).

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

## Moyens de lutte:

- Sélection génétique d'animaux résistants
- Vaccination, amélioration de la protection immune
- Traitements alternatifs aux antibiotiques...

**Une nécessité commune : mieux connaître les facteurs immuns de résistance des volailles**

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

**Identifier les facteurs de l'hôte impliqués dans la résistance:  
recherche de gènes différentiellement exprimés chez R/S**

Moyens:

Comparaison de lignées de volailles divergentes selon la colonisation intestinale: expression des gènes d'intérêt.

- Inoculation orale de *S. Enteritidis*:  $5 \cdot 10^4$ cfu (poussin),  $10^8$  cfu (poule).
- Analyse du portage (numération des bactéries, caecum).
- Analyse de l'expression des gènes des facteurs ciblés (dans la zone lymphoïde caecale) par qRT-PCR en temps réel:  
TLR4, TLR5,  
IL-8, MCP, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ ,  
iNOSynthase, NRAMP1, défensines.

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

## Analyse comparée de la charge bactérienne des salmonelles entre deux lignées consanguines

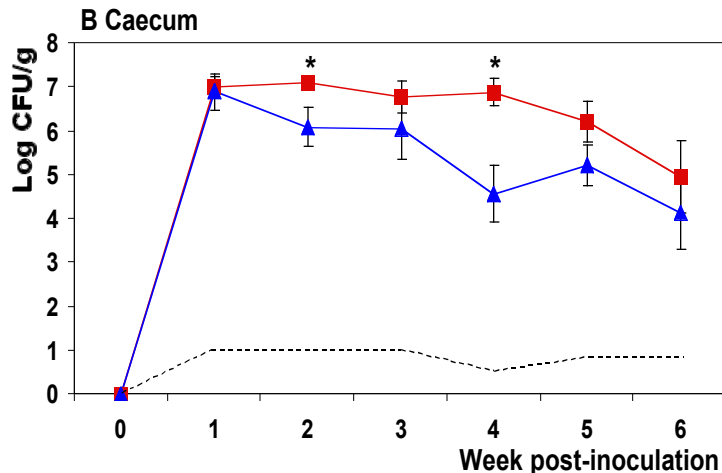


chez le jeune poulet

chez la poule



Charge bactérienne caecale



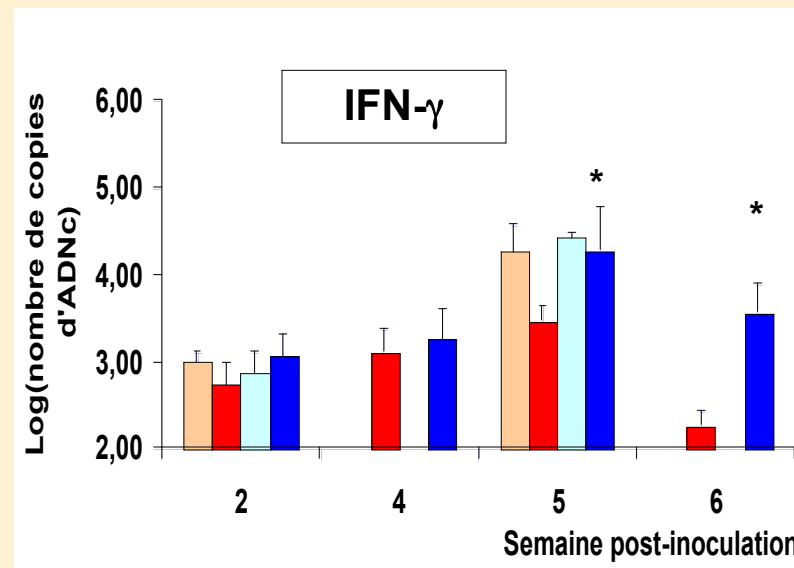
Weeks pi	Line 6		Line 15	
	Log CFU/g	Positive animals	Log CFU/g	Positive animals
1	4.37 ± 0.53	7/7	5.03 ± 0.50	7/7
2	<b>0.96 ± 0.14</b>	6/6	<b>2.25 ± 0.44</b>	8/8
4	ND	<b>0/8</b>	ND	<b>4/6</b>

- Phénotype divergent entre lignées
- Phénotype fonction de l'âge
- Les jeunes sont plus sensibles → immaturité immunitaire?

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

Analyse comparée de l'expression du gène de l'IFN- $\gamma$  entre  
poulets des deux lignées



Lignée 6 : s  
Lignée 15 : r

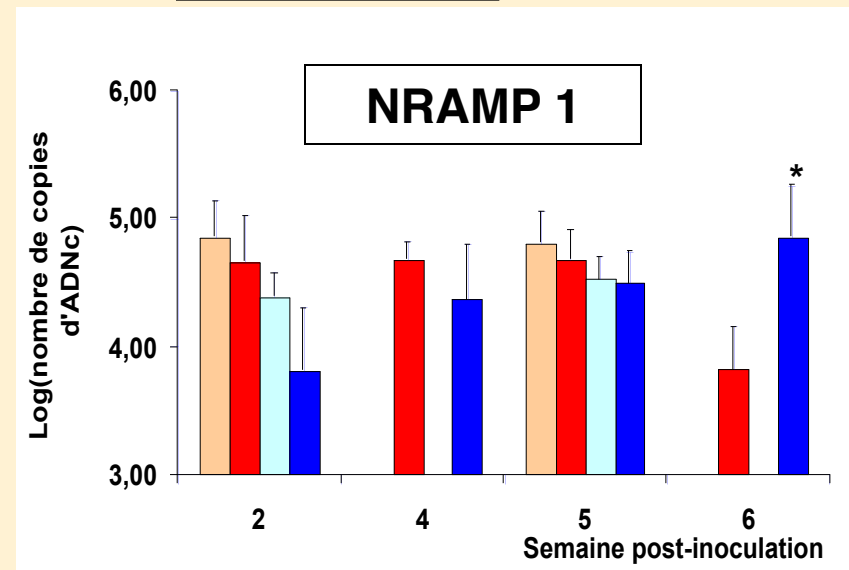
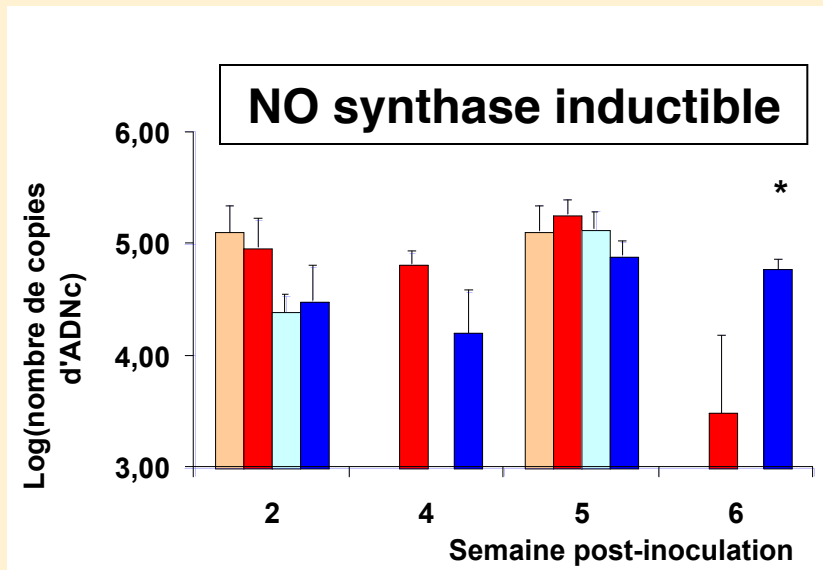
- L'IFN-g est « down-régulé » dans le caecum des jeunes animaux sensibles

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

## Analyse comparée de l'expression du gène des médiateurs anti-infectieux des phagocytes

Lignée 6 : s  
Lignée 15 : r



- La production de monoxyde d'azote (NO) et de NRAMP1 sont elle-même dérégulées chez les jeunes animaux sensibles . 7

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

## Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*: le portage intestinal chez les oiseaux.

- **Chez le jeune poulet, la lignée qui porte le moins de salmonelles:**



➤ Accroît progressivement l'expression intestinale des gènes de cytokines inflammatoires et anti-infectieuses.

↪ Augmentation des médiateurs anti-bactériens.

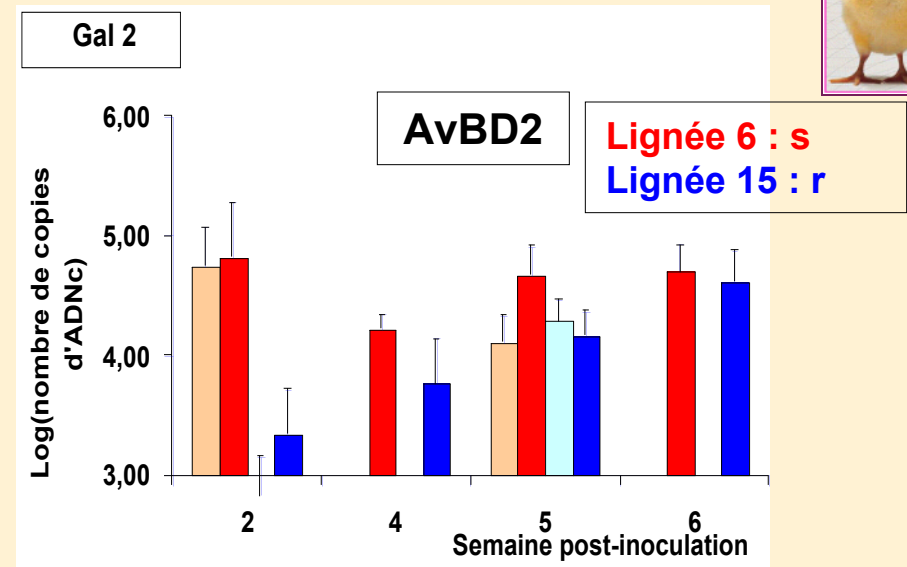
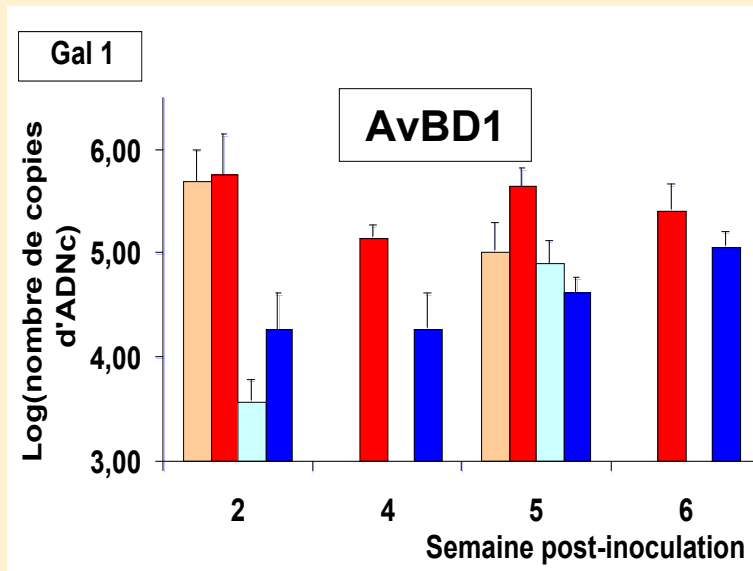
↪ Meilleure résolution de l'infection.



# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

## Analyse comparée de l'expression des gènes des défensines entre poulets des deux lignées



➤ Expression intrinsèque élevée des défensines aviaires AvBD1 et 2 dans le caecum des animaux les plus sensibles .



L'hôte ne semble pas en tirer profit.

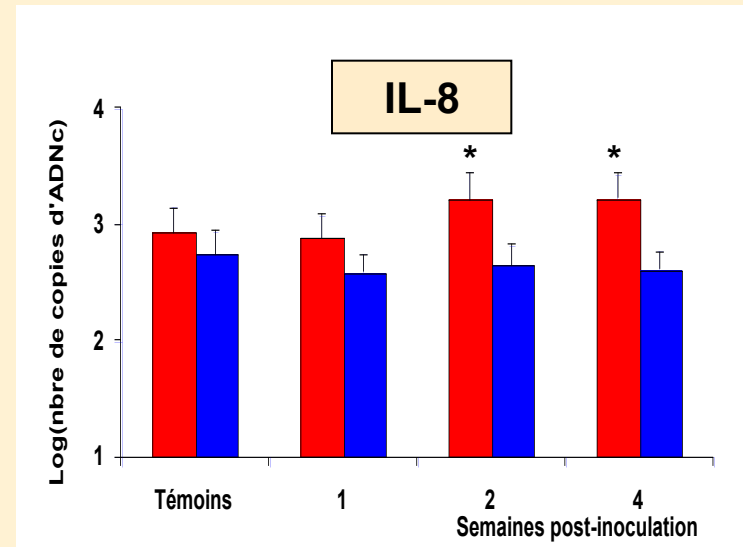
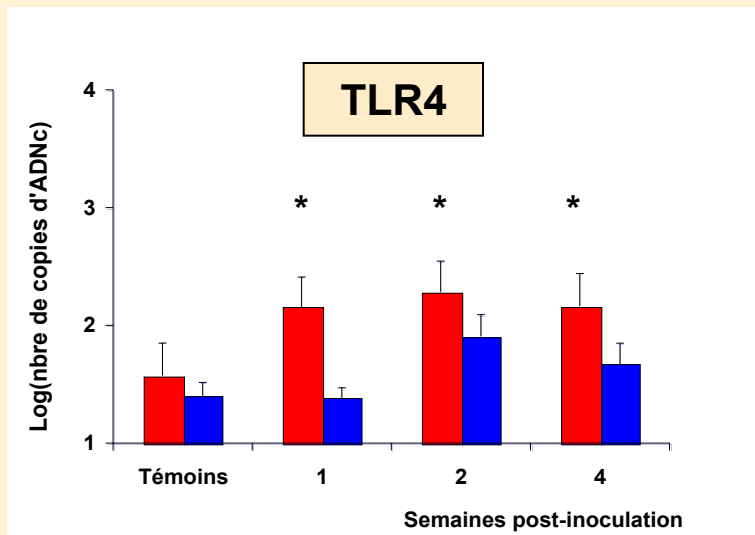


Problème de maturité, fonctionnalité?

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

Analyse comparée de l'expression des gènes de récepteur et de chimiokine entre poules (adultes) des deux lignées



Lignée 6 : R  
Lignée 15 : S

- La production d'IL-8 est « up-régulée » chez les jeunes animaux résistants, en liaison avec une expression accrue du TLR4.

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

## Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*: le portage intestinal chez les oiseaux.

- **Chez la poule, la lignée qui porte le moins de salmonelles:**



- Exprime plus de récepteurs qui sondent le LPS.



- Répond par production d'IL-8 qui recrute les phagocytes.

- Exprime plus de cytokines IL-18 et IFN- $\gamma$ .

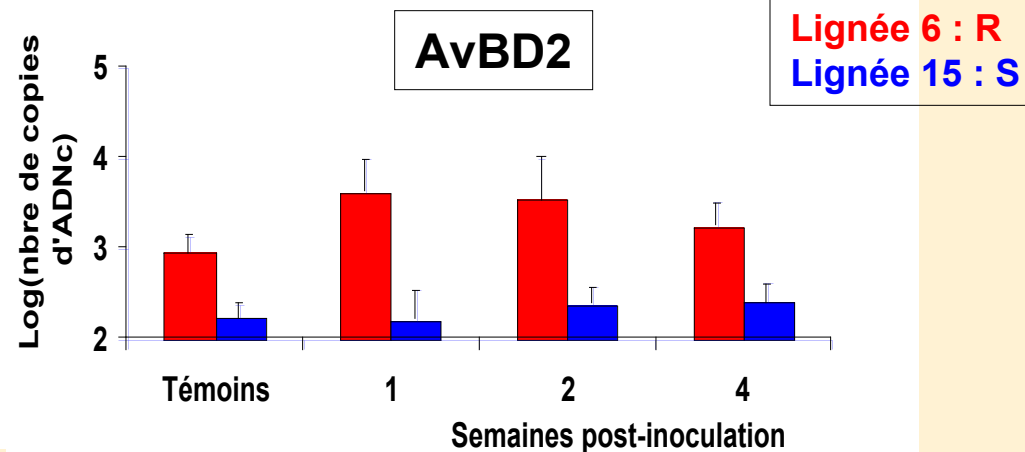
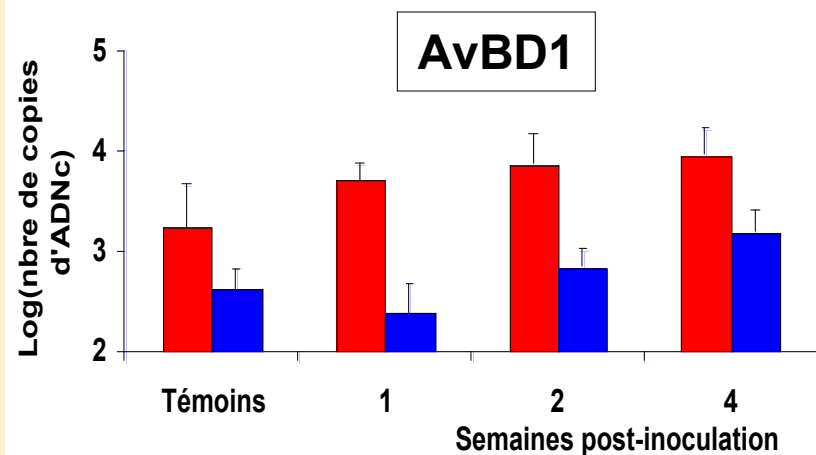


- Répond en stimulant l'activité anti-microbienne des phagocytes.

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

Analyse comparée de l'expression des gènes des défensines entre poules des deux lignées



• Chez la poule, la lignée qui porte le moins de salmonelles:

➤ Exprime intrinsèquement plus de défensines aviaires AvBD1 et 2.

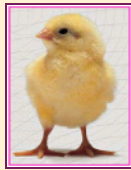
Apparaît efficace pour réduire la charge bactérienne.

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

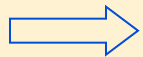
- **Différence majeure entre jeune poulet et poule pondeuse:**

La lignée 6 exprimant dix fois plus les  
défensines aviaires AvBD1 et 2



Pas de lien avec la protection  
contre la colonisation intestinale  
des salmonelles chez le jeune.

Forte corrélation avec le contrôle  
de la colonisation intestinale des  
salmonelles chez l'adulte.



**Cellules productrices de défensines aviaires?**

**Mode d'action? Efficacité contre les salmonelles?**

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

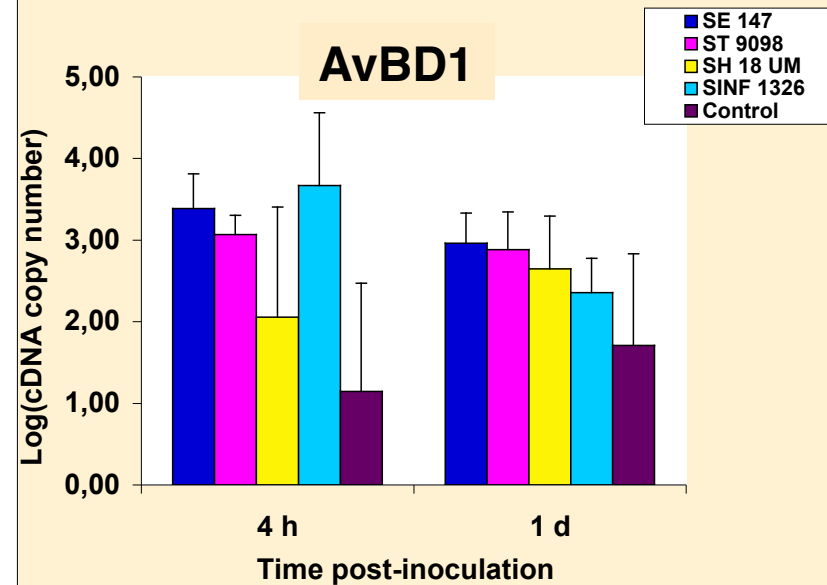
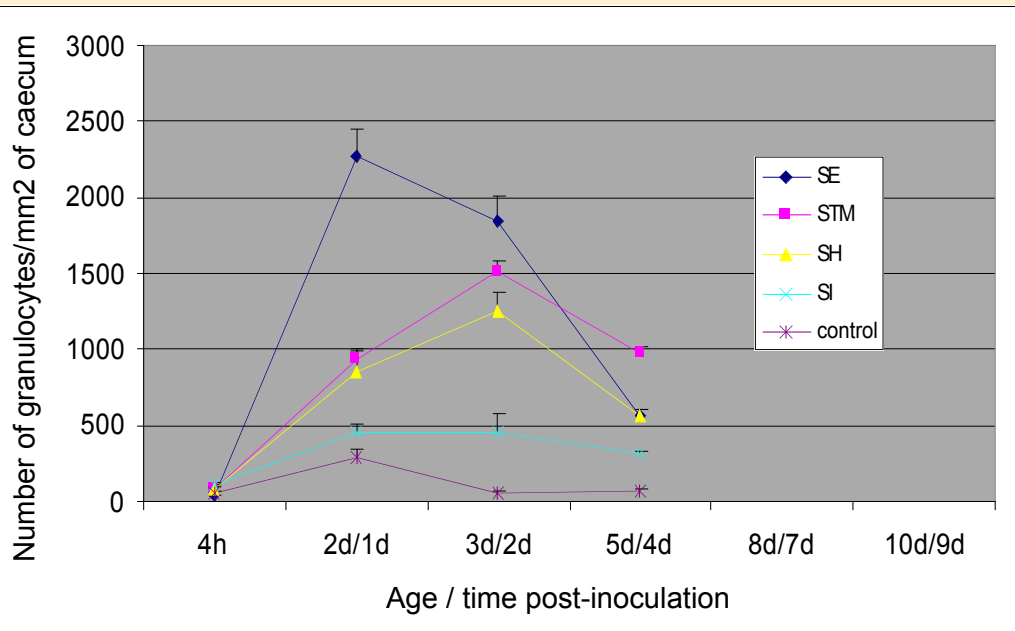
## Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*: le portage intestinal chez les oiseaux.

- **Les défensines aviaires: questions posées**
- Expression d'AvBD1 et AvBD2 par d'autres cellules que les hétérophiles\* (=neutrophiles des oiseaux) dans l'intestin?
- Comme chez les mammifères, épithélium intestinal = source de  $\beta$ -défensines?
- Activité des AvBD1 et 2 contre *S. Enteritidis*?

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

- Les granulocytes hétérophiles de l'intestin sont les seules cellules source d'AvBD1 and 2 ?



➤ L'infiltration précoce des granulocytes dans le caecum des oiseaux infectés n'est pas corrélée à l'expression des gènes d'AvBD1 et 2.

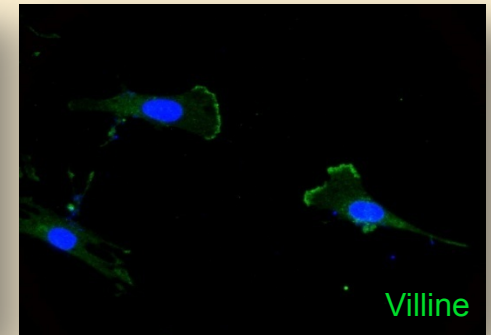
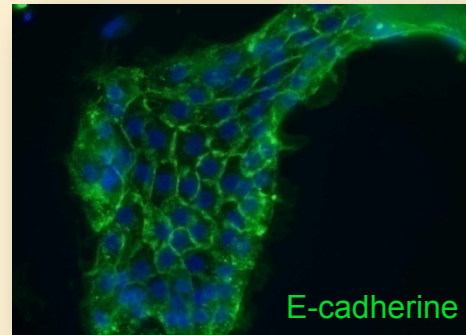
# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

- **Les cellules épithéliales intestinales des oiseaux sont elles source d'AvBD1 and 2 ?**

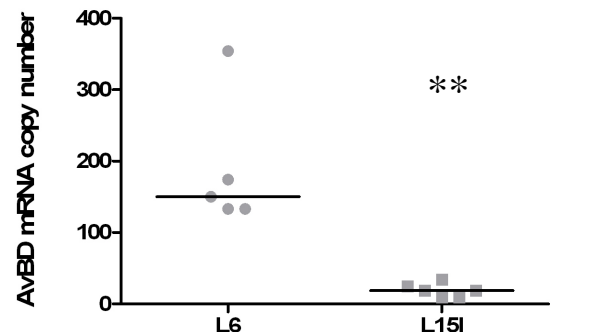
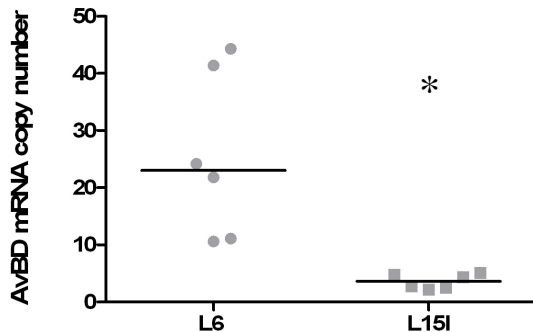
Intestins d'embryons de poulets:  
isolement d'explants avec  
entérocytes embryonnaires en  
monocouche cellulaire

- Culture primaire:  
marqueurs épithéliaux



**AvBD1**

**AvBD2**



- Cellules épithéliales capables d'exprimer les gènes *AvBD1* et *AvBD2* selon la lignée dont elles sont issues

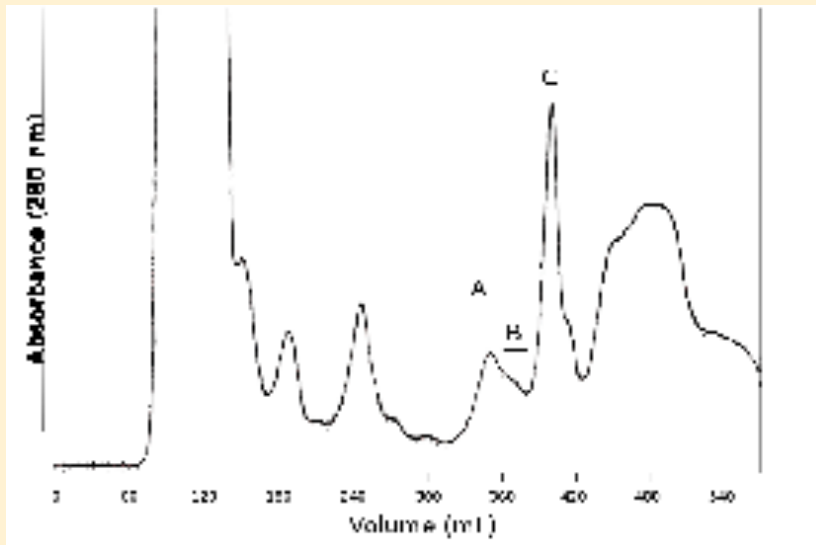


# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

## • Les AvBD1 and 2 sont-elles actives contre *Salmonella*?

Préparation des défensines à partir de la moelle osseuse de poulet:  
(site actif de la granulopoïèse, tissu exprimant fortement les gènes des AvBDs)



- Extraction des peptides en acide acétique 10%
- Chromatographie d'exclusion de taille (Biogel P10, Biorad) puis RP-HPLC
- Analyse des fractions par spectrométrie de masse



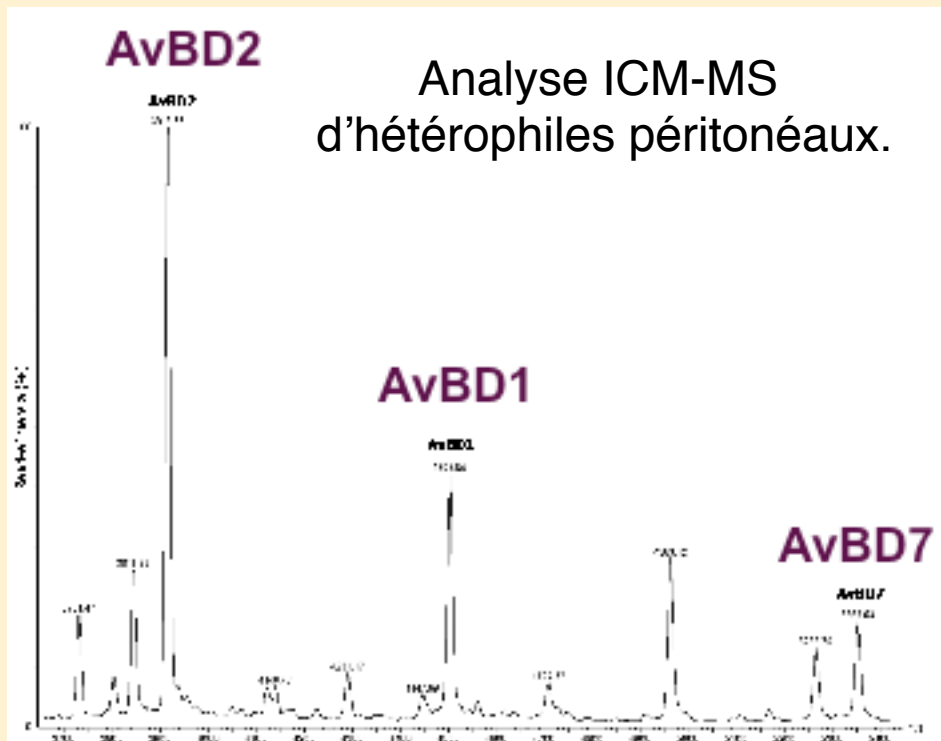
Purification d'AvBD2 (C) et d'AvBD1 (B, amidation W en C-terminal)  
Purification d'une nouvelle AvBD<sup>17</sup> (A).

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

- **Les AvBD1, 2 et 7 sont-elles actives contre *Salmonella*?**

Préparation des défensines à partir de la moelle osseuse de poulet:  
défensines matures? Identiques à celles des neutrophiles?



AvBD1, AvBD2 et AvBD7  
identiques en masse à celles  
de la moelle osseuse.



Produites sous forme mature  
dans la moelle osseuse.



Utilisables en test de diffusion  
radiale en gélose

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

- Les AvBD1, 2 et 7 sont-elles actives contre *Salmonella*?

	Bacterial strains	MIC in $\mu\text{M}$			
		MSI94	AvBD1	AvBD2	AvBD7
Gram+	<i>B. subtilis</i>	0.73	0.19	0.28	0.21
	<i>B. cereus</i>	0.32	0.21	0.47	0.20
	<i>S. aureus</i>	0.34	0.08	0.42	0.11
	<i>L. monocytogenes</i>	0.41	0.26	0.22	0.31
Gram-	<i>S. Enteritidis</i> 14026	0.32	0.17	0.80	0.16
	<i>S. Enteritidis</i> LA5	0.31	0.16	6.05	0.21
	<i>S. Typhimurium</i>	0.37	0.15	2.39	0.21
	<i>E. coli</i>	0.59	0.27	0.72	0.28
	<i>K. pneumoniae</i>	0.26	0.10	0.71	0.32

# Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*:  
le portage intestinal chez les oiseaux.

## Etude des défensines aviaires - Perspectives

**Activité sur bactéries multirésistantes aux antibiotiques**

**Synergie d'activité antimicrobienne entre défensines**

**Robustesse: résistance à la dégradation par les protéases**

**Autres fonctions: activité chimiotactique,  
immunostimulante**

**Intérêt thérapeutique AvBD1, 2 et 7: essais in vivo sur  
modèles infectieux**

