

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- γ ,
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

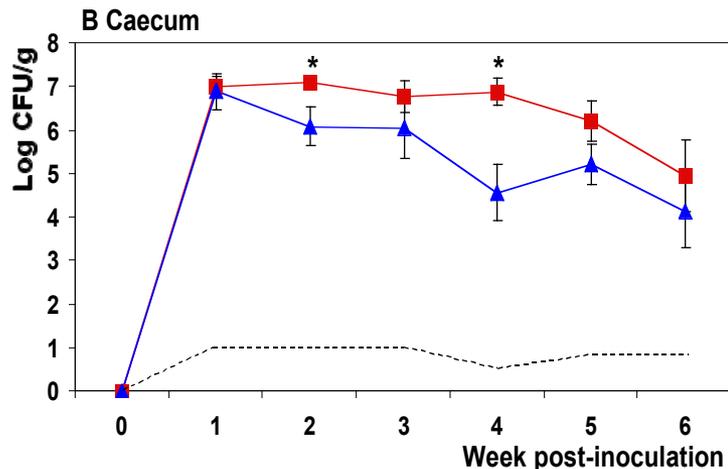


chez le jeune poulet

chez la poule



Charge bactérienne caecale



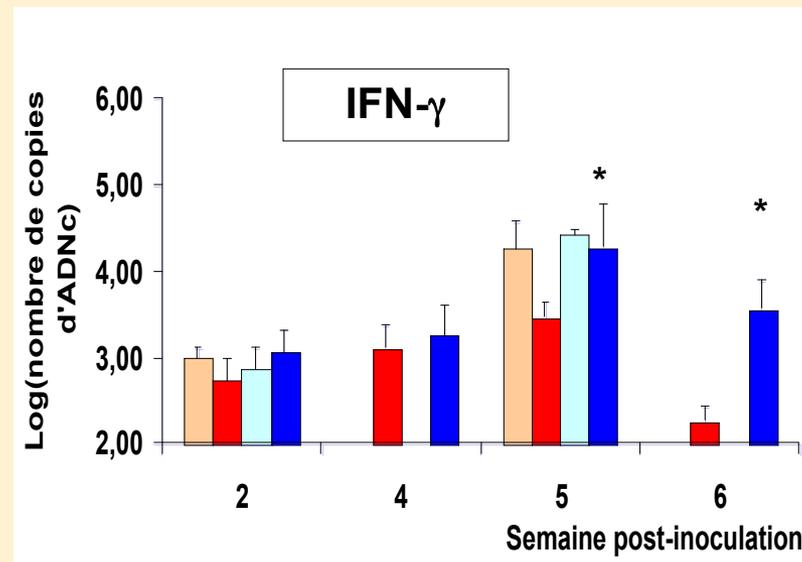
Weeks pi	Line 6		Line 15	
	Log CFU/g	Positive animals	Log CFU/g	Positive animals
1	4.37 ± 0.53	7/7	5.03 ± 0.50	7/7
2	0.96 ± 0.14	6/6	2.25 ± 0.44	8/8
4	ND	0/8	ND	4/6

- 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- γ entre
poulets des deux lignées



Lignée 6 : s
Lignée 15 : r

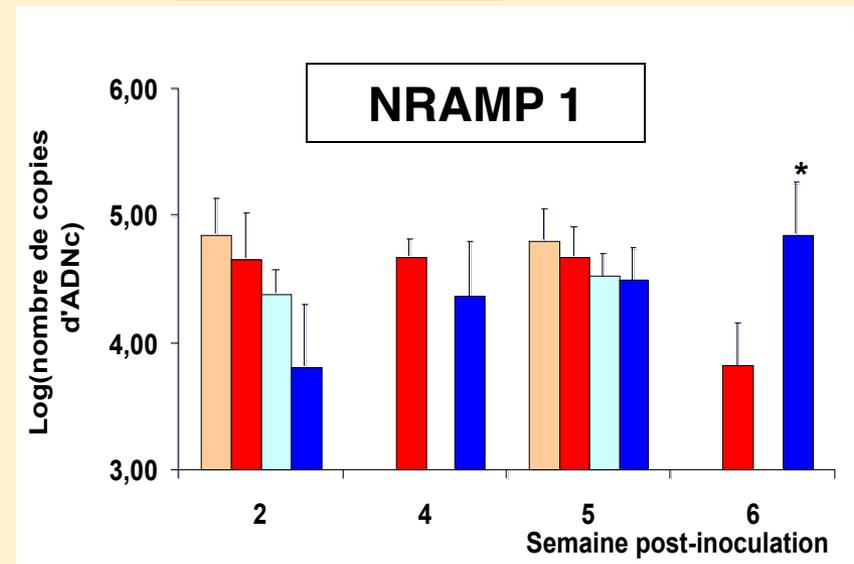
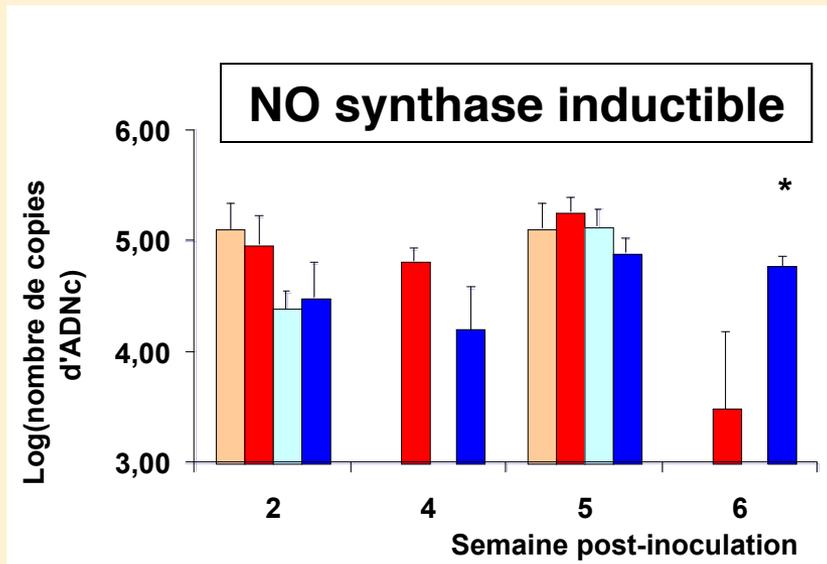
- L'IFN-g est « down-régulé » dans le caecum des jeunes animaux sensibles

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.

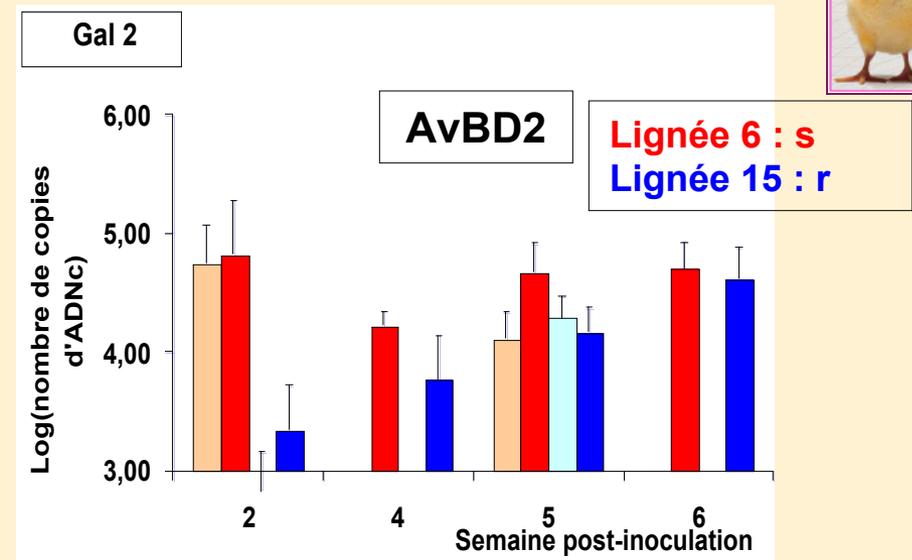
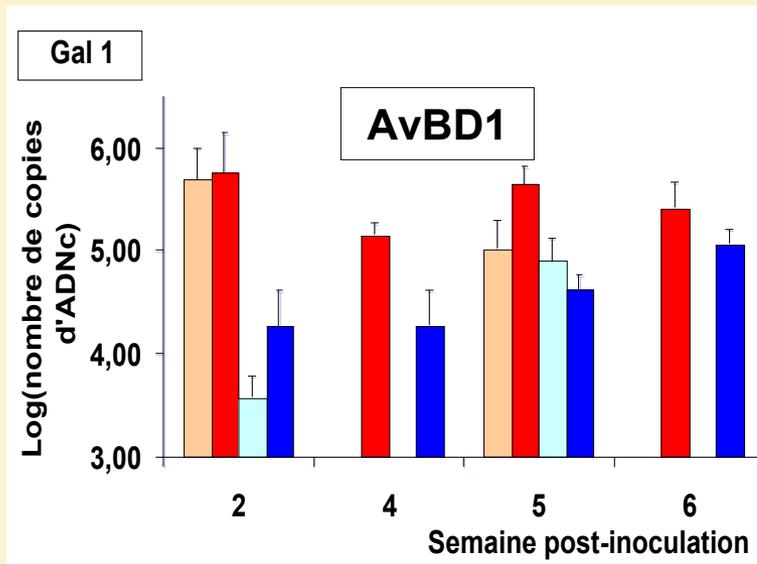
↪ Augmentation des médiateurs anti-bactériens.

↪ 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.

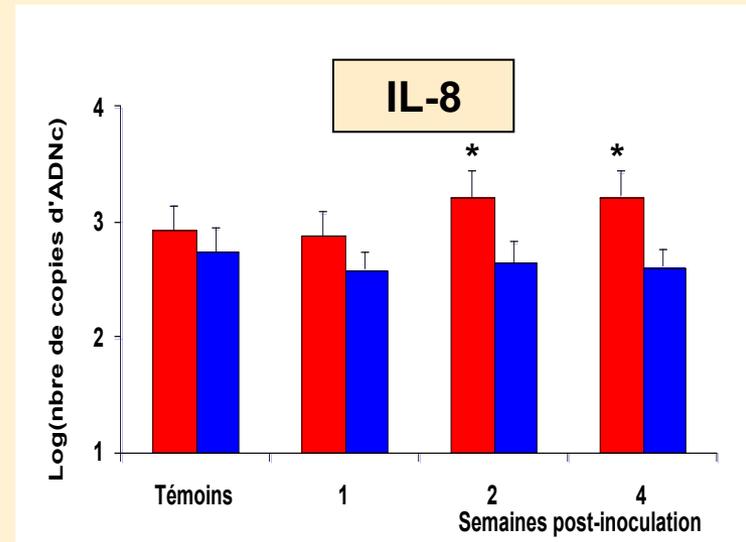
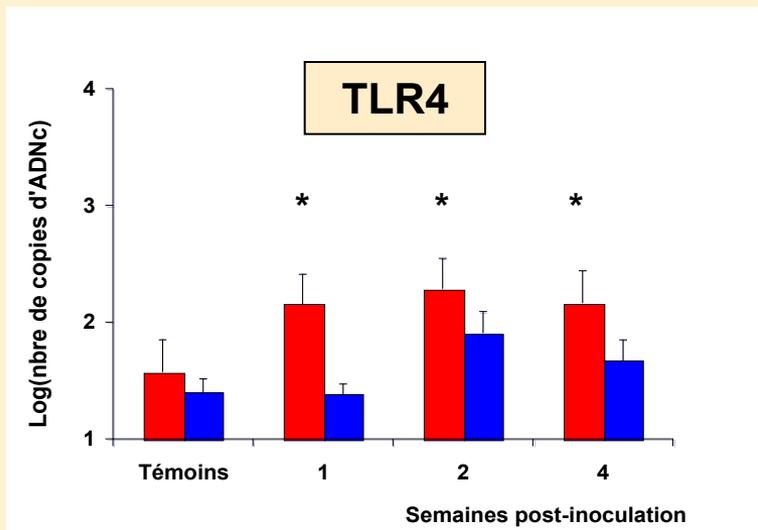


Problème de maturité, fonctionnalité?

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- γ .

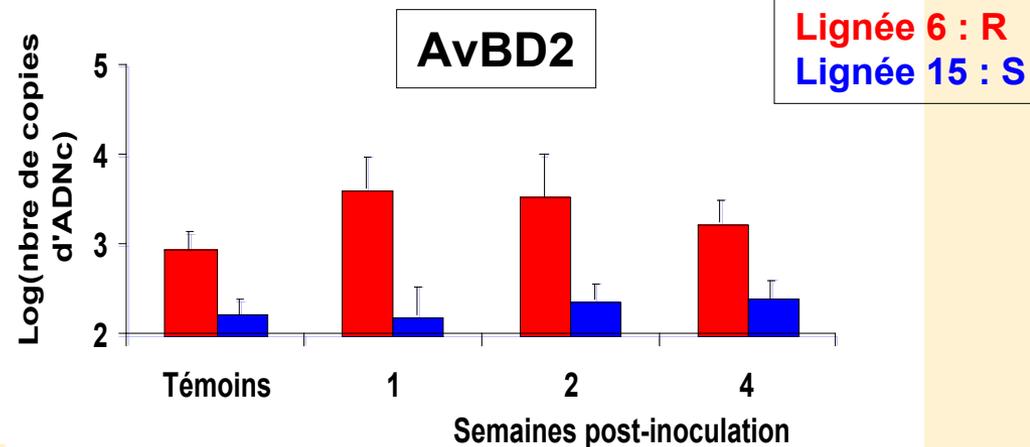
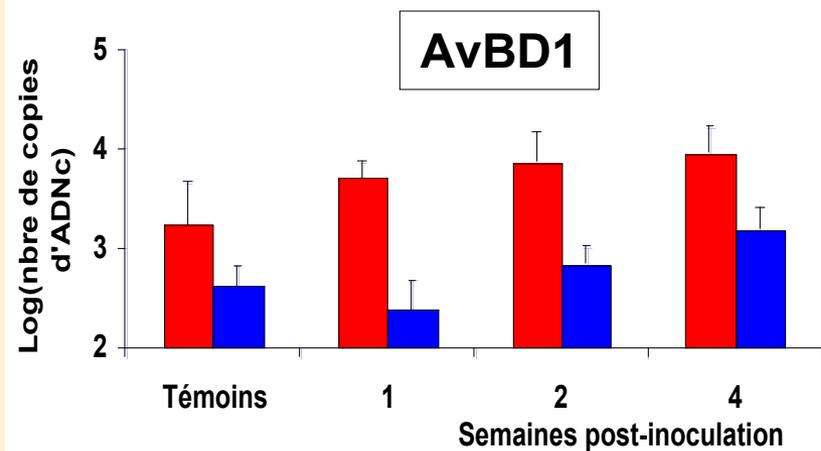


- Répond en stimulant l'activité anti-microbienne des phagocytes.

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.

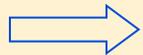
- **Différence majeure entre jeune poulet et poule pondeuse:**

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

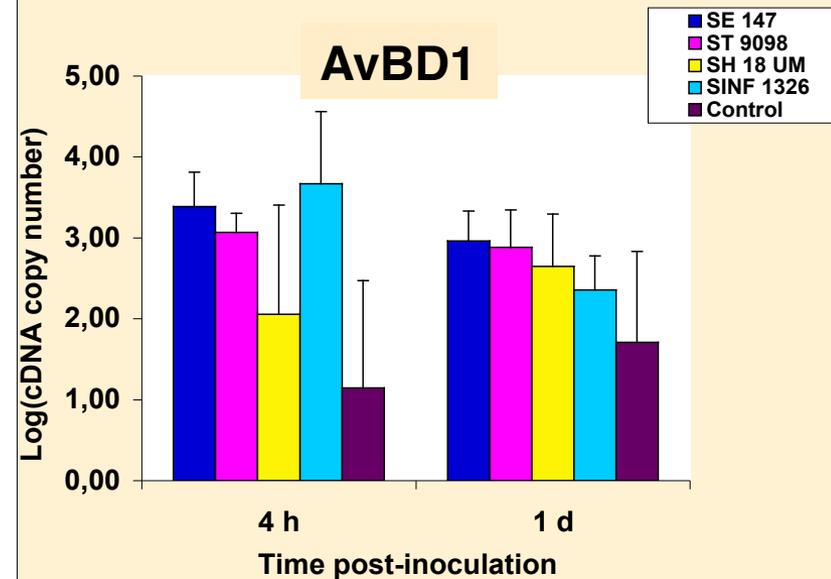
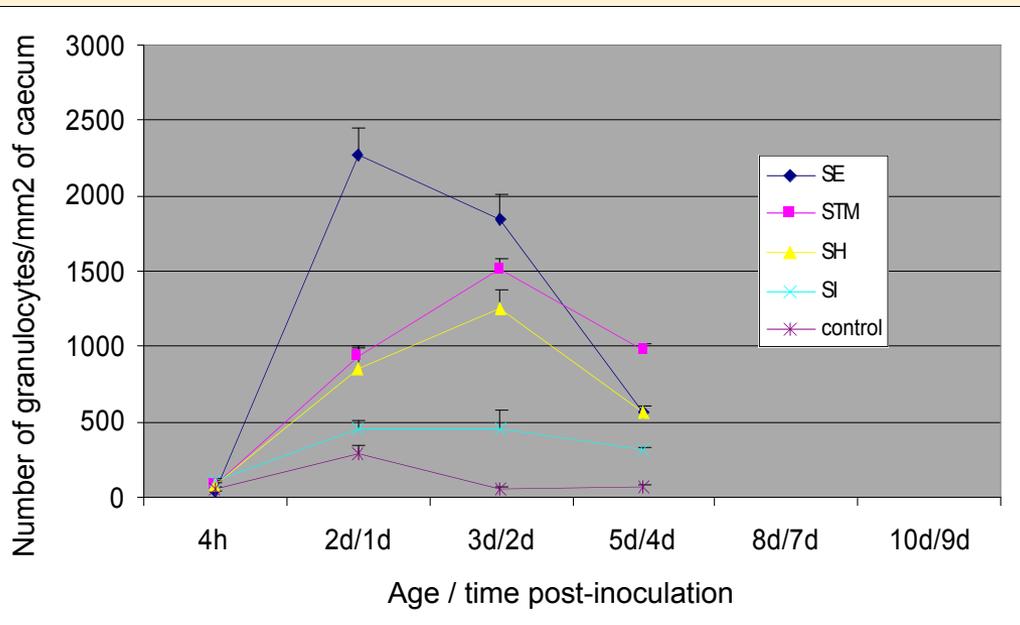
Exemple particulier de relation hôte-*Salmonella*: le portage intestinal chez les oiseaux.

- **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 β -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.

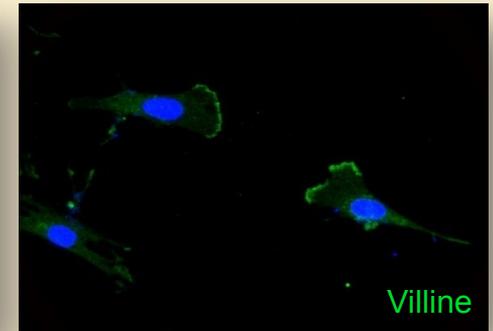
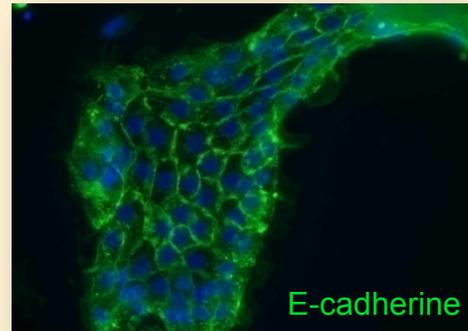
Réponse mucosale aux entérobactéries pathogènes

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 ?**

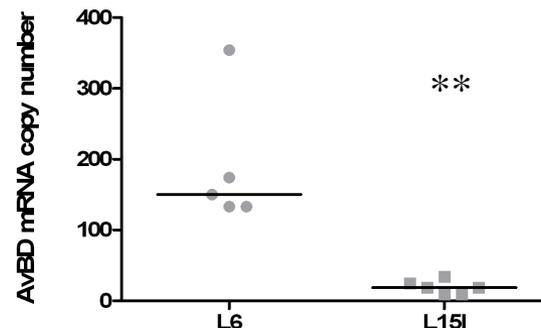
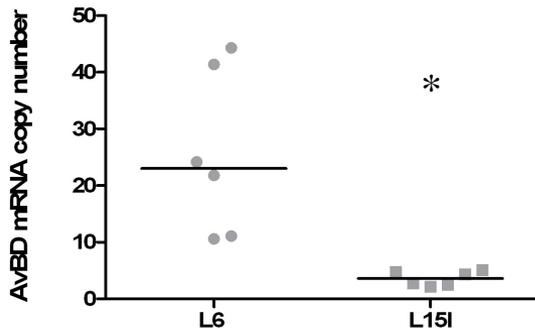
Intestins d'embryons de poulets:
isolement d'explants avec
entérocytes embryonnaires en
monocouche cellulaire

- Culture primaire:
marqueurs épithéliaux



AvBD1

AvBD2



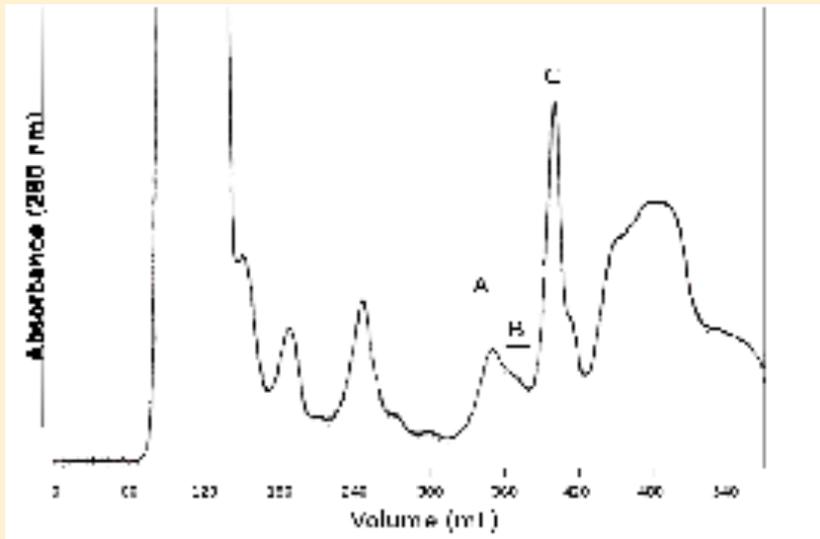
- Cellules épithéliales capables d'exprimer les gènes *AvBD1* et *AvBD2* selon la lignée dont elles sont issues

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



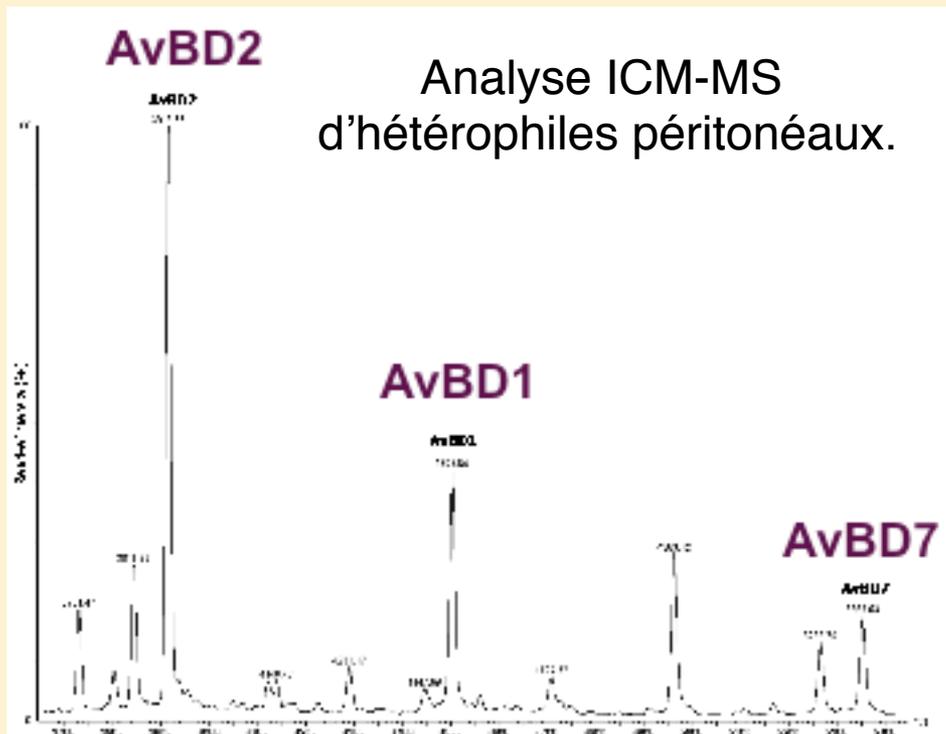
Purification d'AvBD2 (C) et d'AvBD1 (B, amidation W en C-terminal)
Purification d'une nouvelle AvBD¹⁷ (A).

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 μM			
		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**

