



HAL
open science

Antigène O, modulation de la réponse immunitaire et conséquences pour la lutte contre les mammites à *Escherichia coli*

Pierre Germon

► **To cite this version:**

Pierre Germon. Antigène O, modulation de la réponse immunitaire et conséquences pour la lutte contre les mammites à *Escherichia coli*. Réunion annuelle du groupement Op+lait, Groupement Op+lait, Oct 2022, Drummondville, Canada. hal-04181964

HAL Id: hal-04181964

<https://hal.inrae.fr/hal-04181964>

Submitted on 23 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

INRAE

➤ Antigène O, modulation de la réponse immunitaire et conséquences pour la lutte contre les mammites à *Escherichia coli*



Pierre Germon

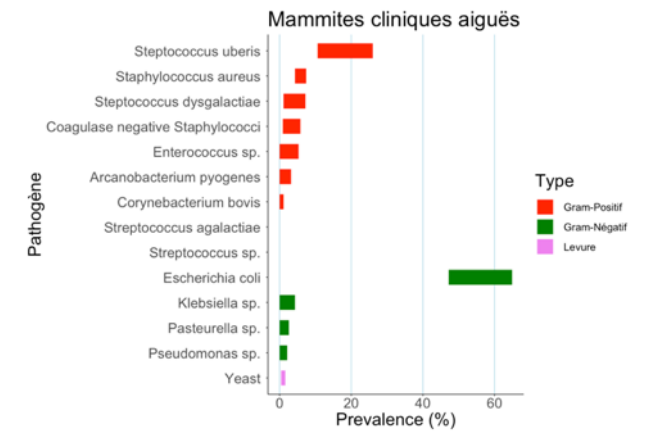
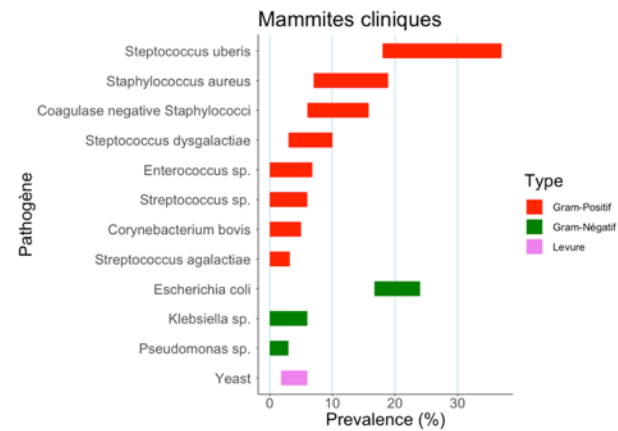
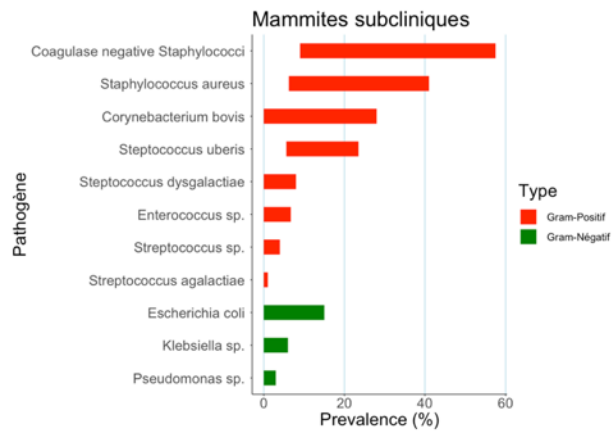
UMR Infectiologie et Santé Publique

Equipe « Infections Bactériennes et Immunité des Ruminants



➤ Prévalence des pathogènes de mammites en France

Prévalence par catégorie de mammité (Poutrel 2019)



INRAE

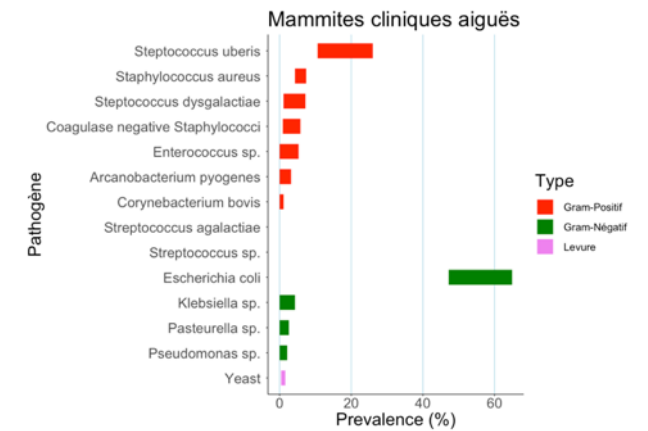
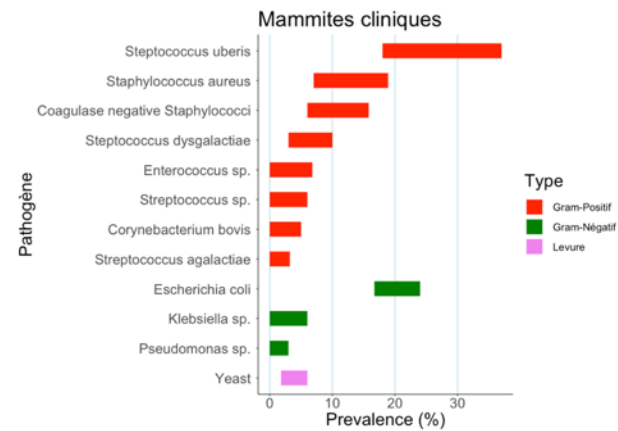
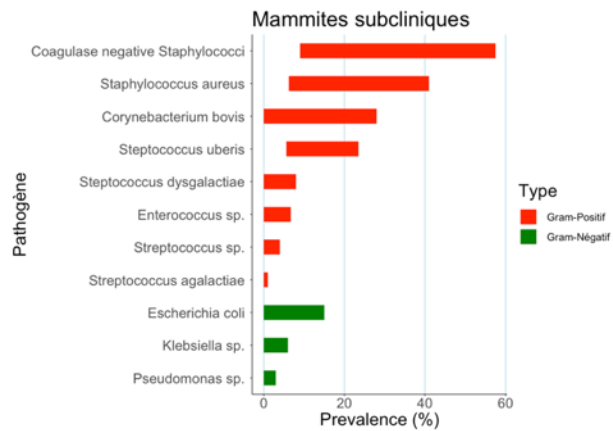
Rencontre Op+lait

18/10/2022 – P. Germon

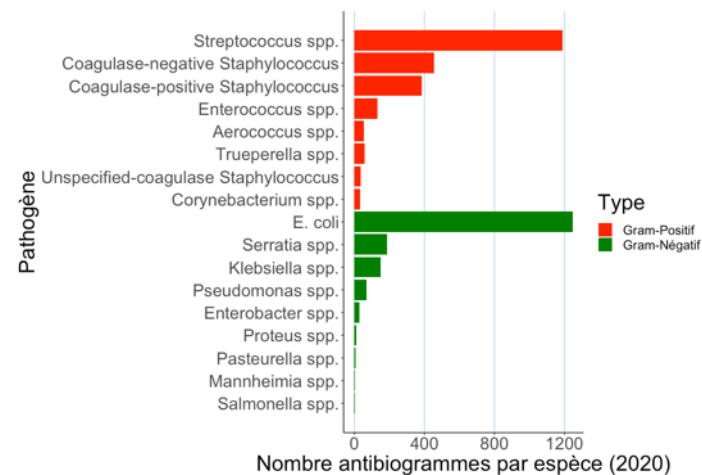


➤ Prévalence des pathogènes de mammites en France

Prévalence par catégorie de mammite (Poutrel 2019)



Prévalence (antibiogrammes réalisés sur échantillons issus de mammites – 2020)



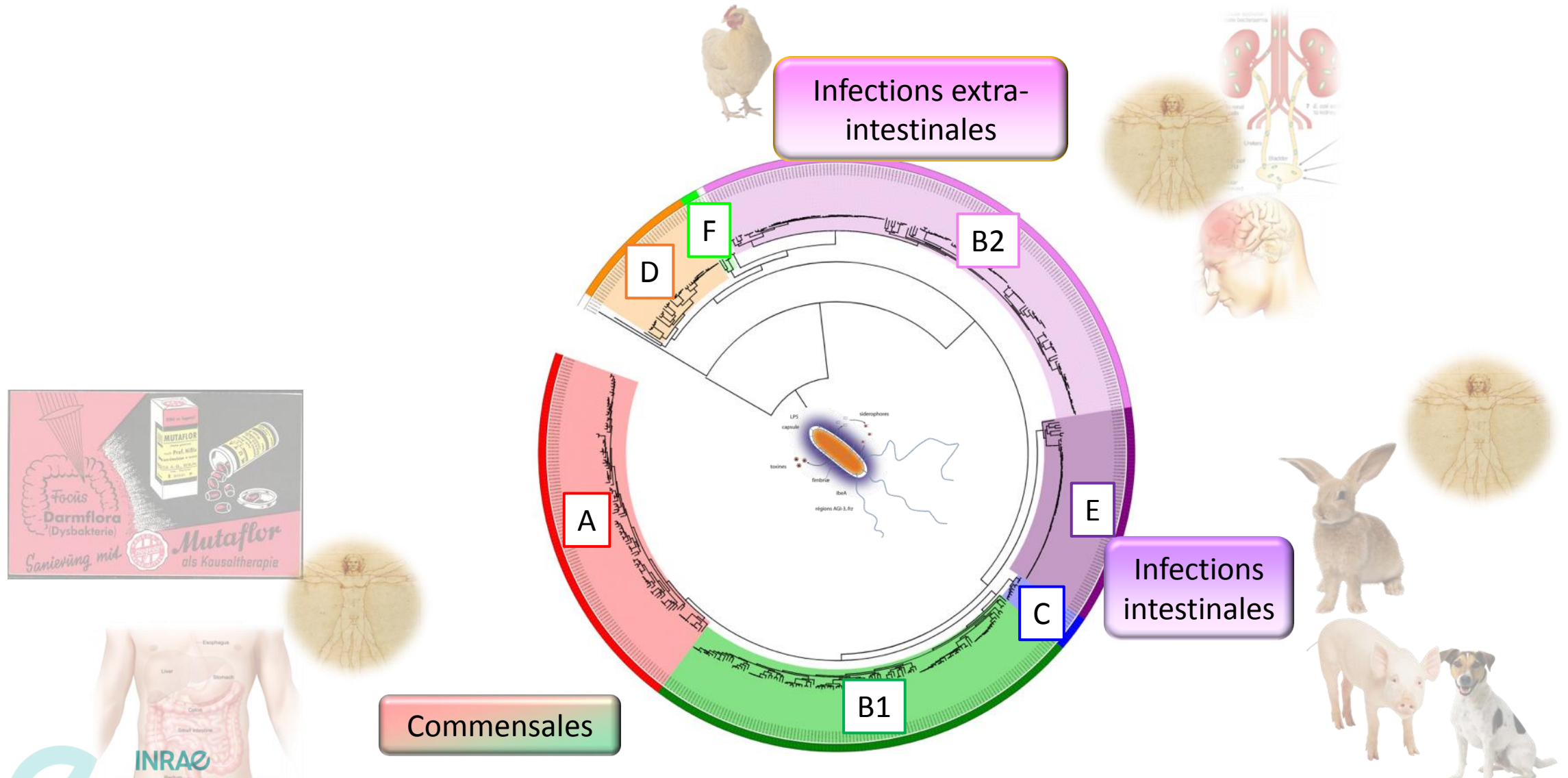
INRAE

Rencontre Op+lait

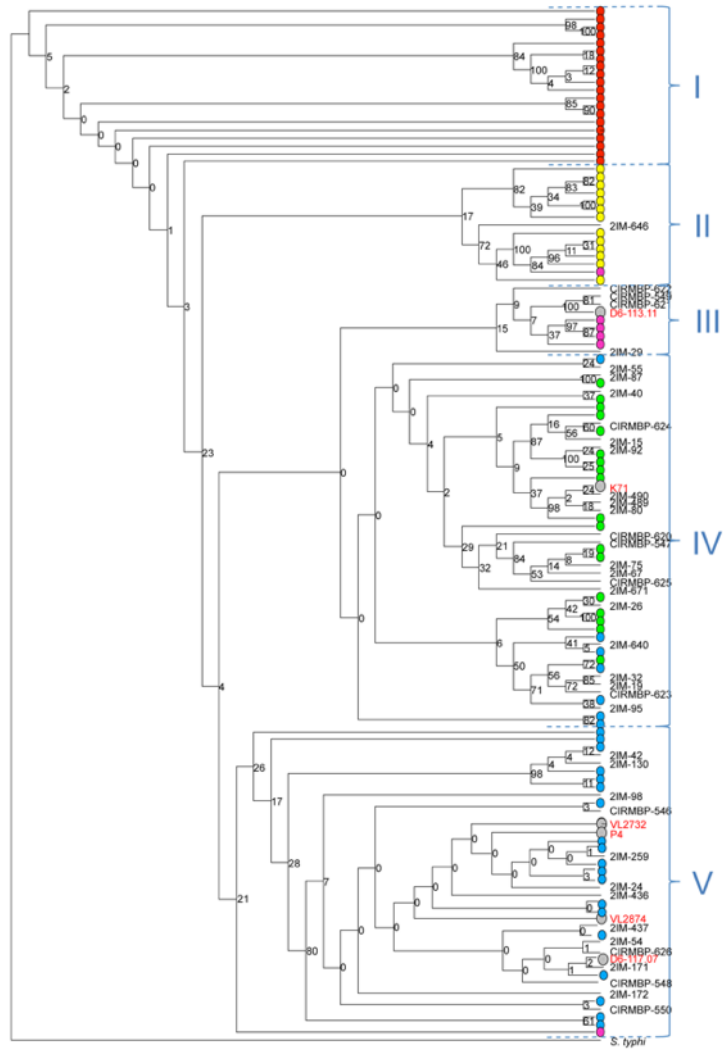
18/10/2022 – P. Germon



➤ La diversité de l'espèce *E. coli*

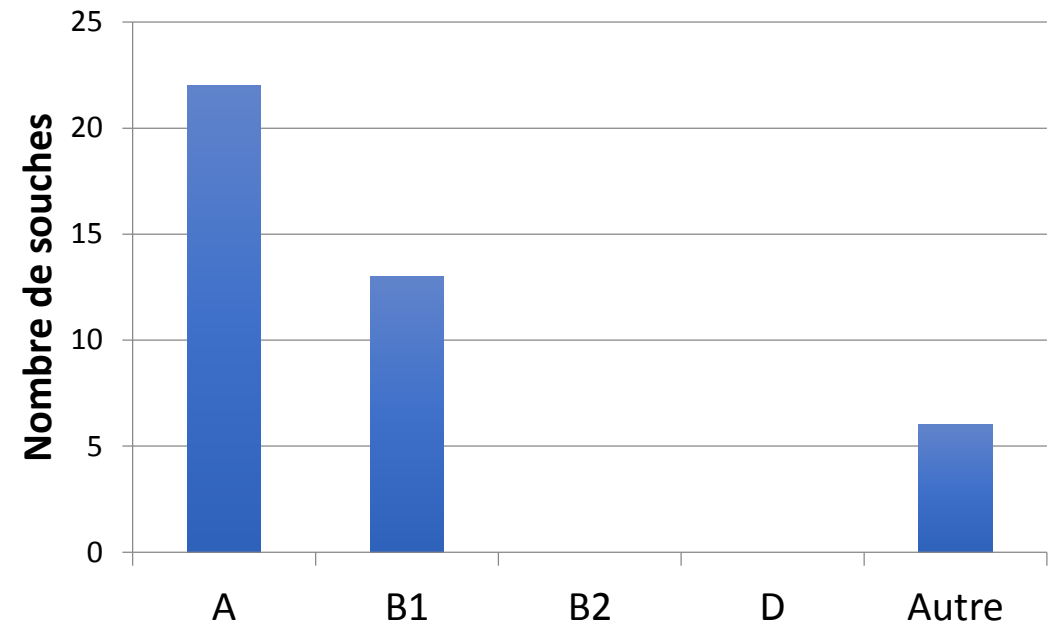


➤ Les souches d'*E. coli* de mammites



Phylogroups: ● A ● B1 ● B2 ● D ● E

Typage MLST 41 souches collection 2IM
(7 gènes de ménage - schéma MLST
Achtman)



➤ Présence/absence de gènes de virulence ou d'adaptation

- Analyse sur génomes complets – recherche de 320 gènes de virulence : Kempf *et al.* 2016

- Systèmes d'acquisition du fer
- Résistance au sérum
- Toxines, Invasines,...

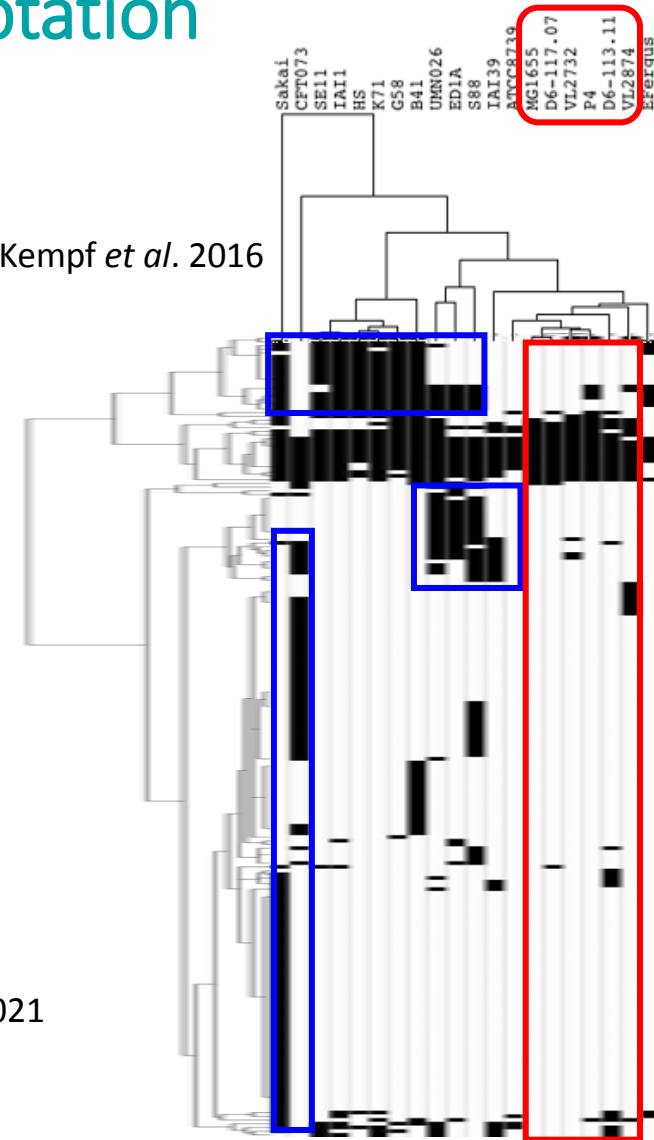
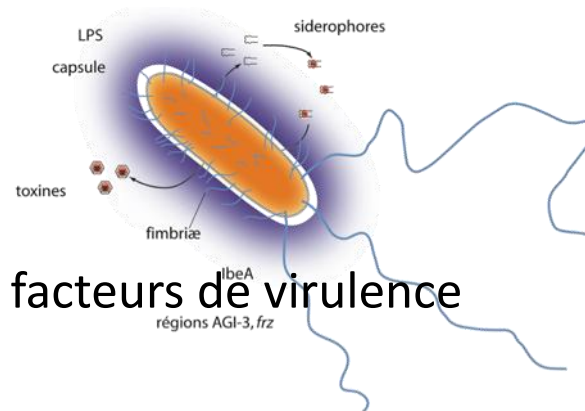
➔ Plutôt caractérisées par une absence de facteurs de virulence

- Prévalence accrue pour 3 opérons: Goldstone *et al.* 2016

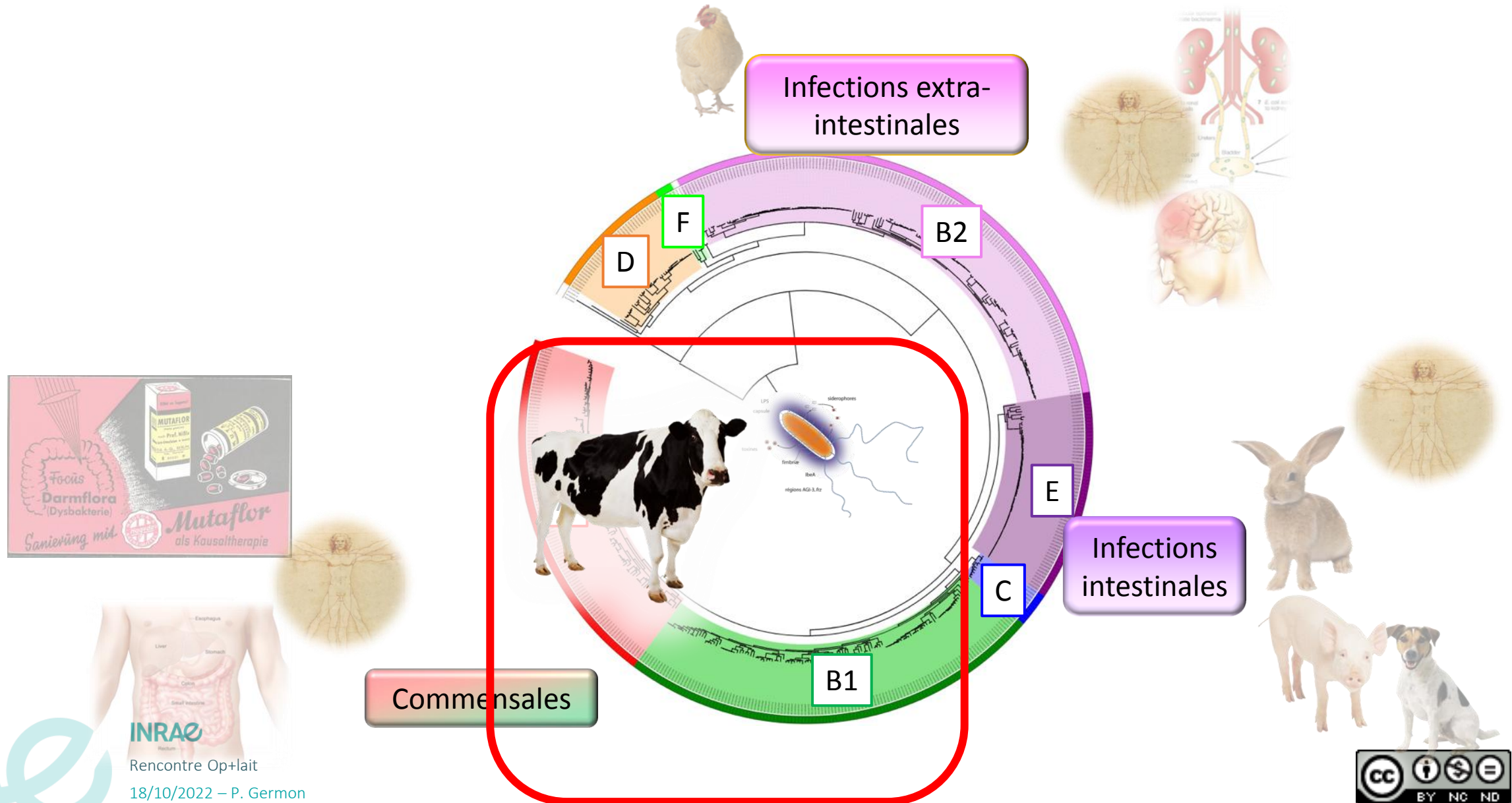
- Acquisition du fer via le citrate
- Opéron dégradation de l'acide phenylacetique
- Opéron *ymdE-ycdU*

- Neuf marqueurs potentiels de souches de mammites (MAEC) : Jung *et al.* 2021

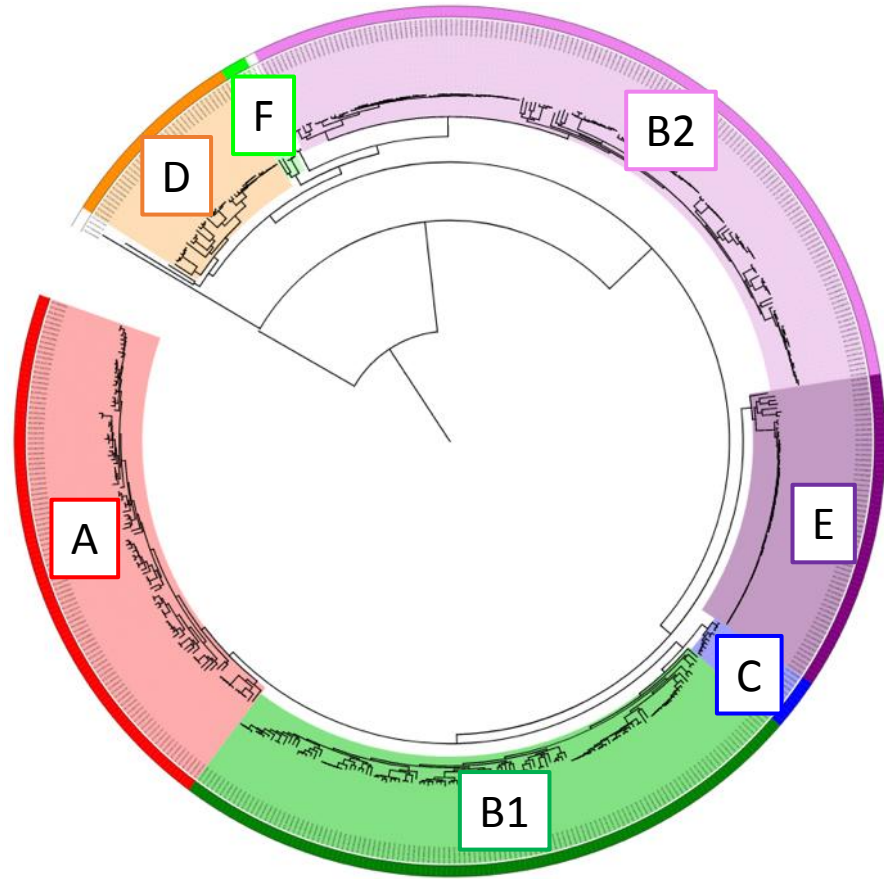
- *adeQ, yfiE, nifJ, ygjI, yhjX, ygjJ, pqqL, fdeC*



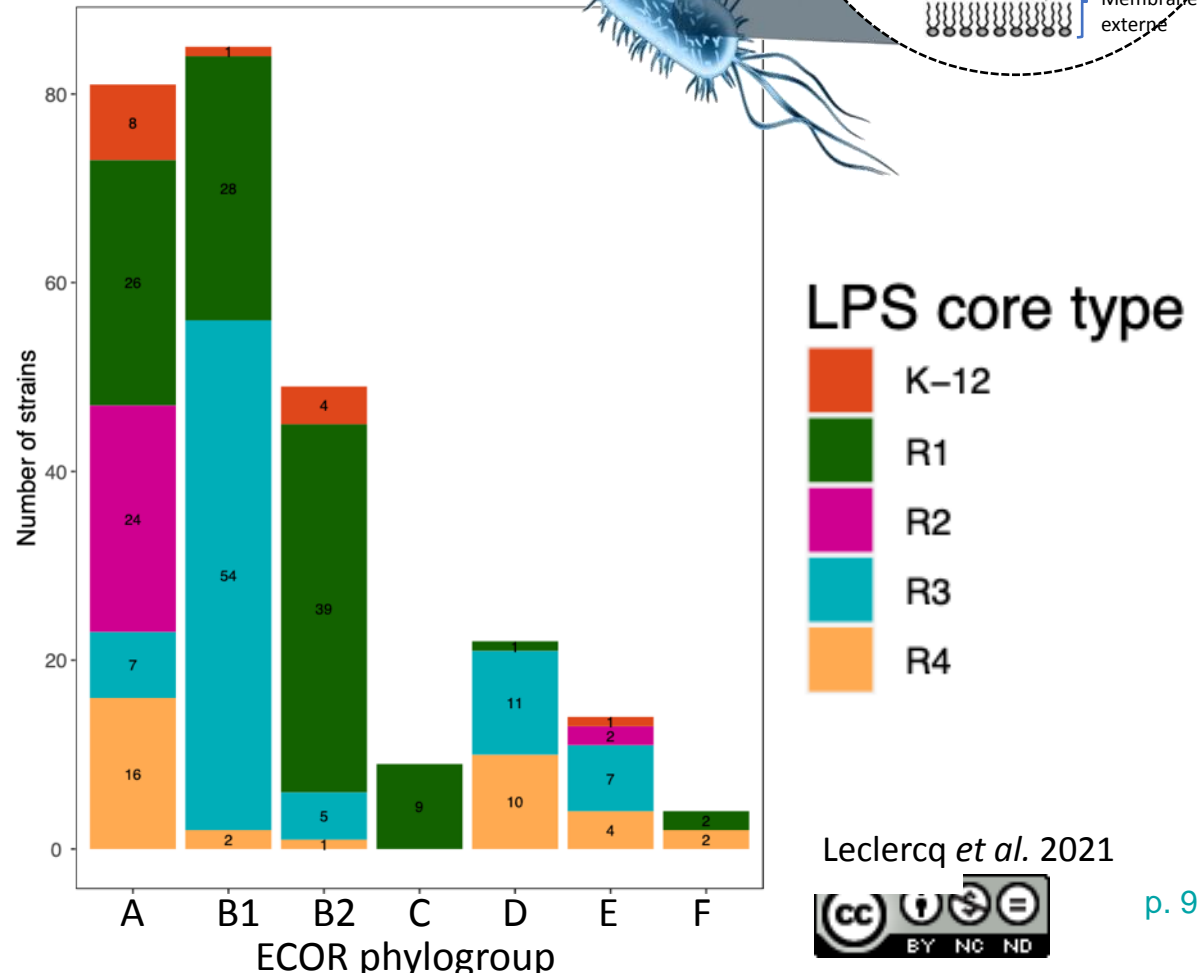
➤ Les souches d'*E. coli* responsables de mammites



➤ Une autre source de variabilité: la région core du LPS



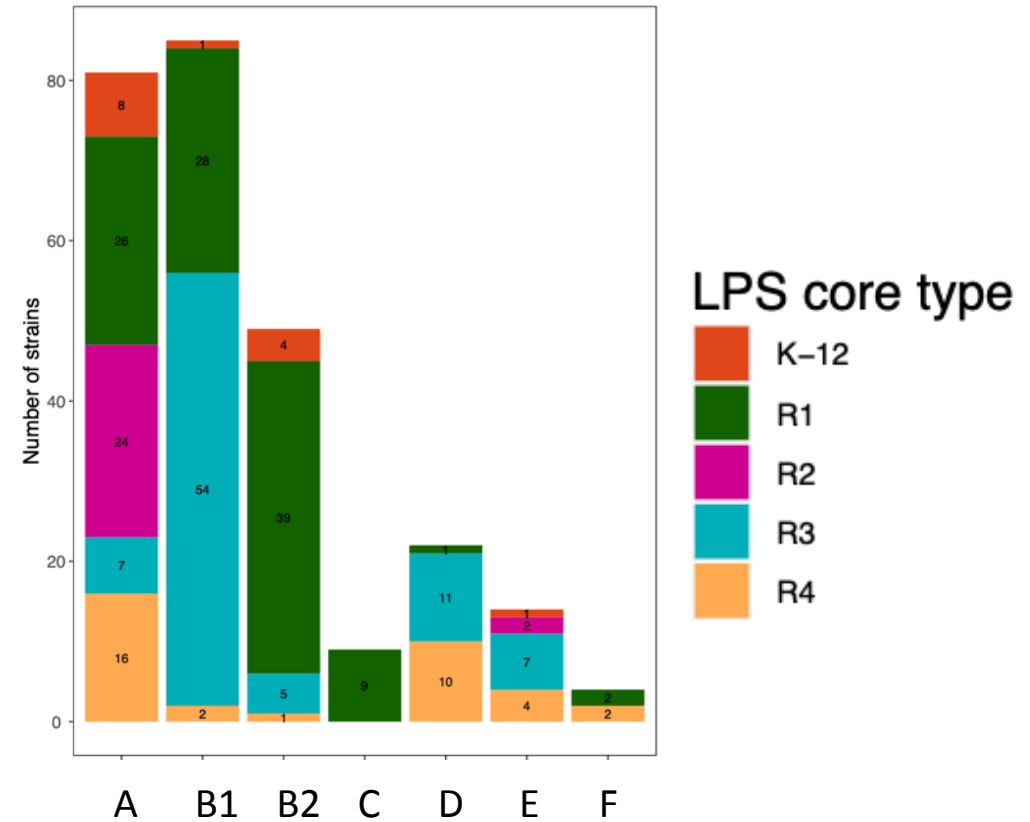
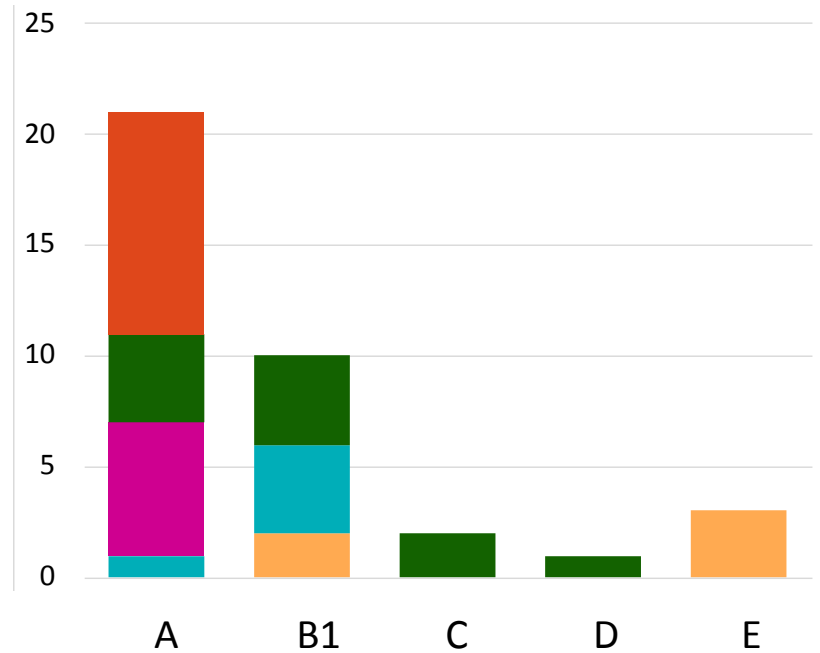
5 types de cores différents :



Leclercq *et al.* 2021



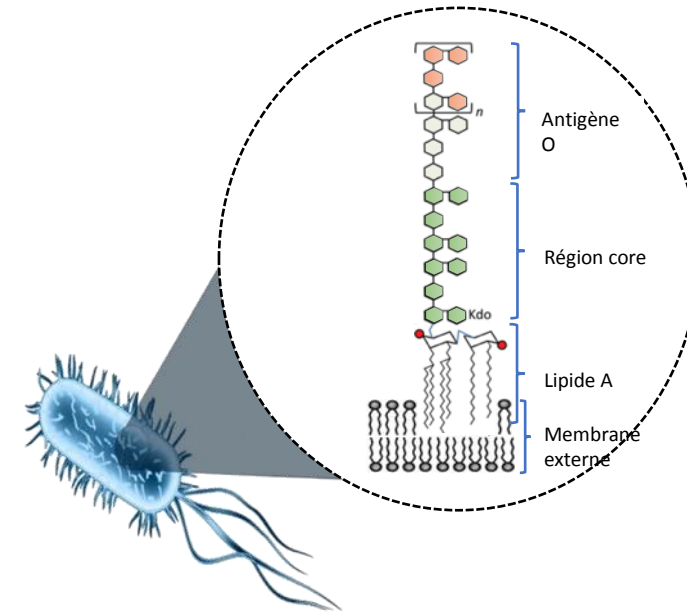
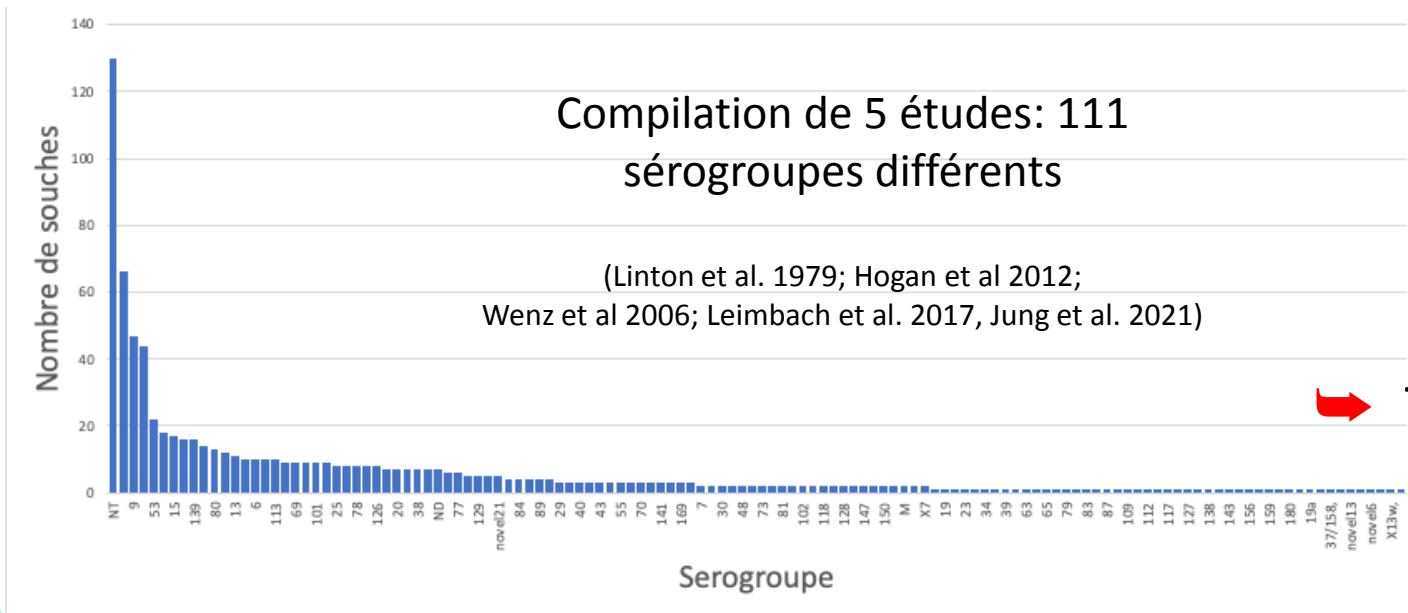
Souches de mammites labo (n=37)



- Plus forte prévalence du core K-12, plus faible pour le core R4
- Conséquences ?

➤ Les souches d'*E. coli* de mammites et antigène O

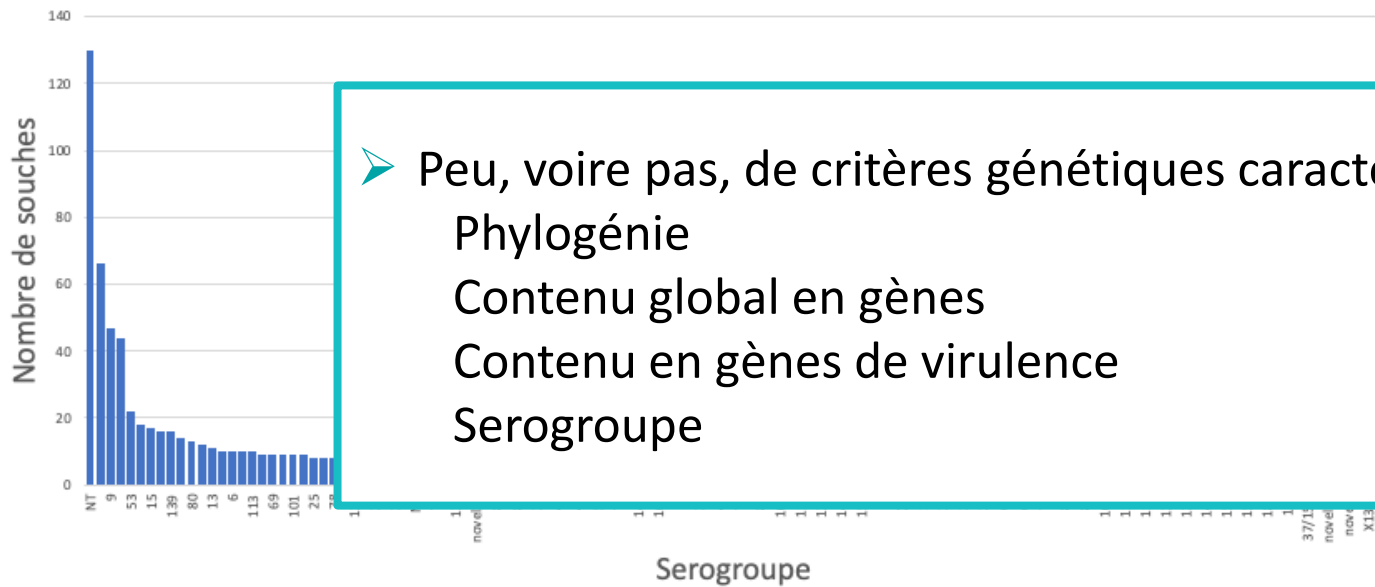
- Antigène dominant
- Dans l'espèce *E. coli*
 - Plus de 180 antigènes O différents
- Souches isolées de mammites :



➔ Très grande variabilité de sérogroupe et pas de lien avec sévérité

➤ Les souches d'*E. coli* de mammites et antigène O

- Antigène dominant
- Dans l'espèce *E. coli*
 - Plus de 180 antigènes O différents
- Souches isolées de mammites :



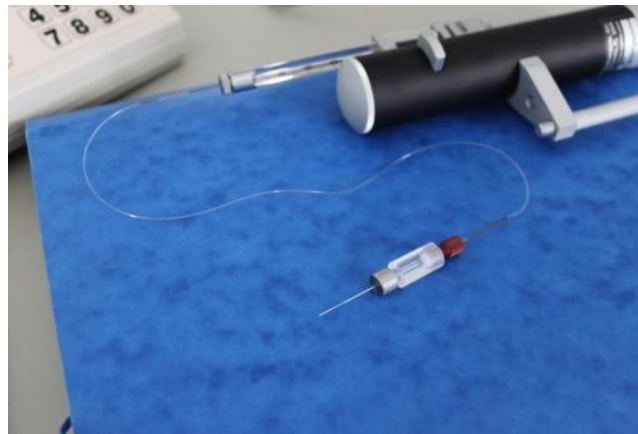
➤ Caractérisation phénotypique

- *In vivo* : sévérité d'une infection mammaire en modèle murin
- *In vitro* : résistance au sérum, au pouvoir bactéricide des neutrophiles, stimulation de cellules épithéliales mammaires...



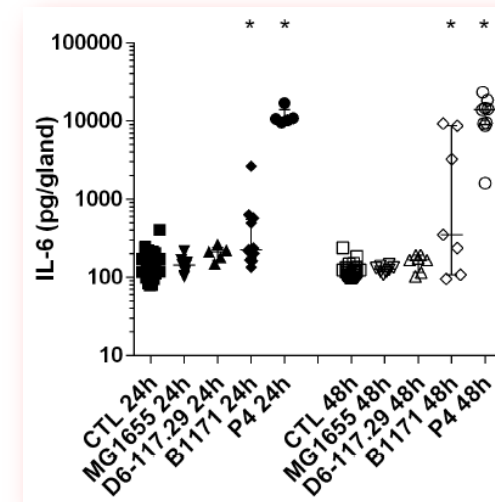
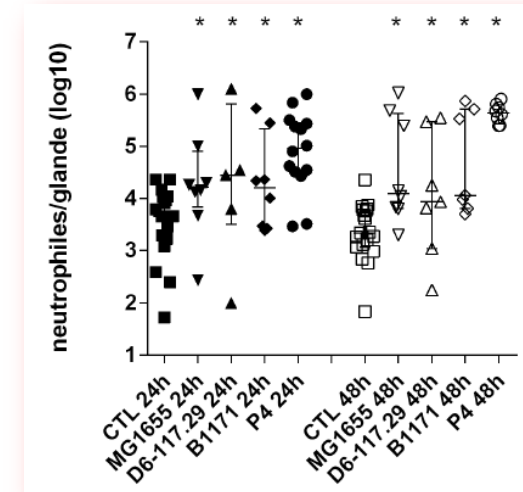
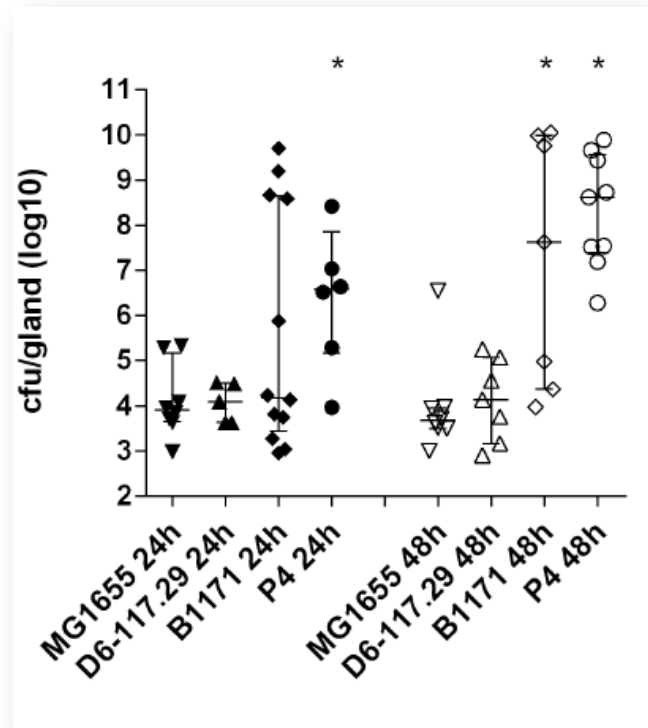
➤ Modèle de mammite murine à *E. coli*

- C57Bl/6 en lactation (7-10j après mise bas)
- *Escherichia coli* ➔ 1000 cfu
 - *E. coli* K-12 MG1655
 - Souches de mammite: P4 et D6-117.29
 - Souche de type pathogène intestinale: B1171
- Aiguille 33G
- Numération bactérienne, recrutement cellulaires, sécrétion de cytokines...



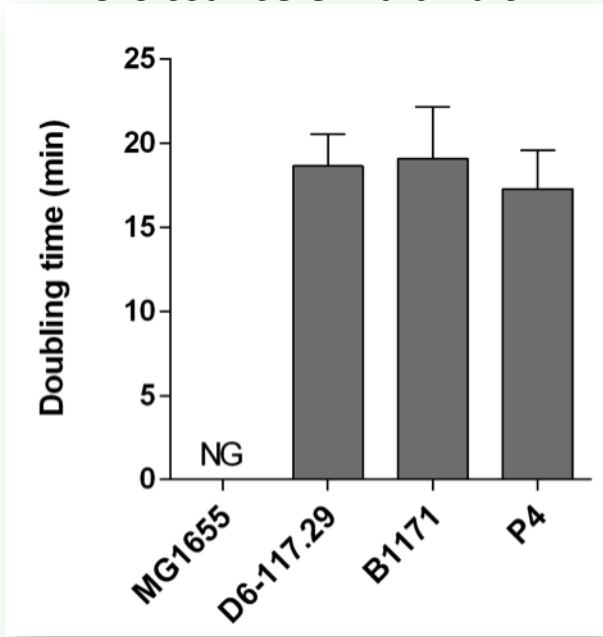
Souches testées:

- *E. coli* K-12 MG1655
- Souches de mammite: P4 et D6-117.29
- Souche de type pathogène intestinale: B1171

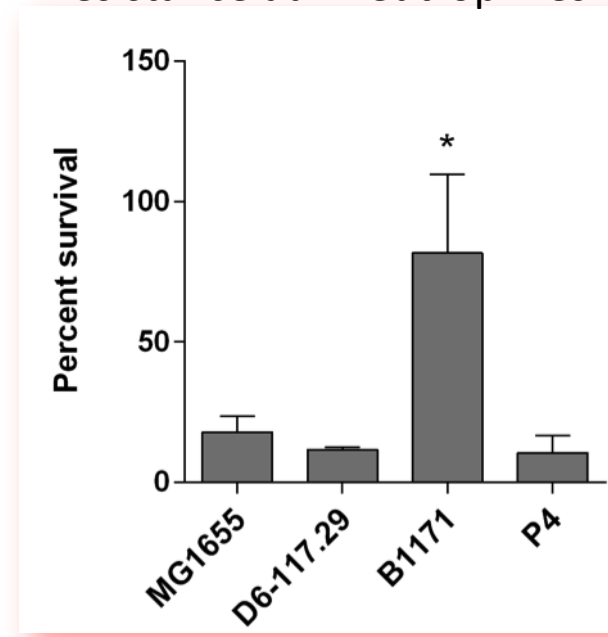


Sévérité variable : **P4** > **B1171** > D6-117.29 ≈ K-12 MG1655

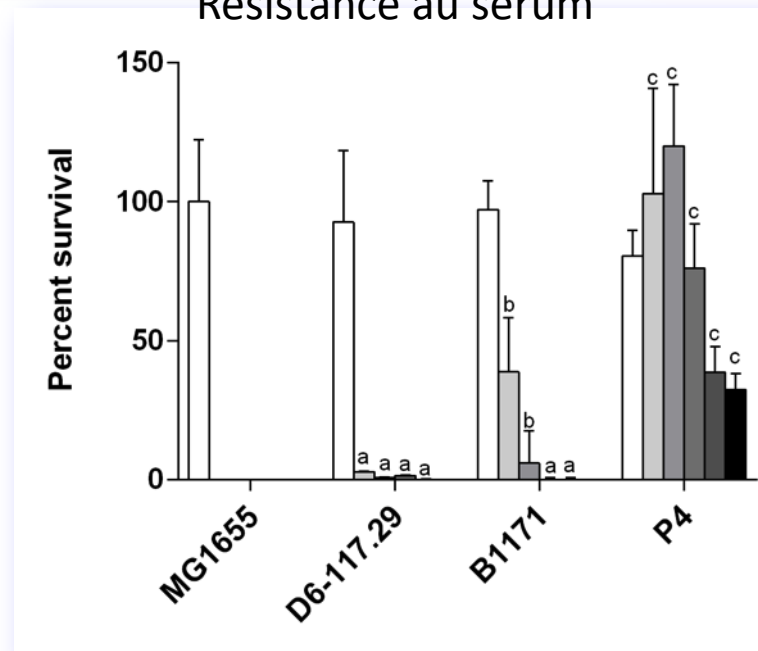
Croissance en lait frais



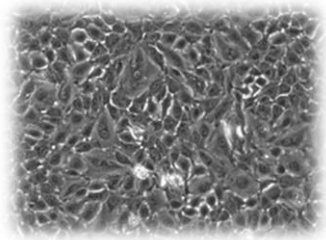
Résistance aux neutrophiles



Résistance au sérum

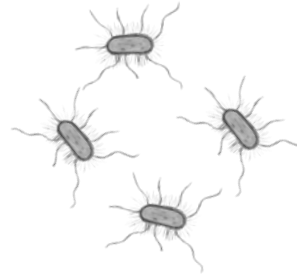


➤ Les CEMs répondent à une stimulation par E. coli

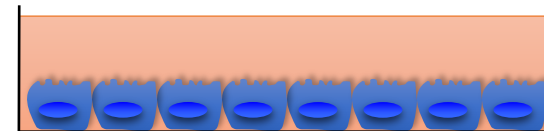


Lignée PS
(cellules épithéliales
mammaires)

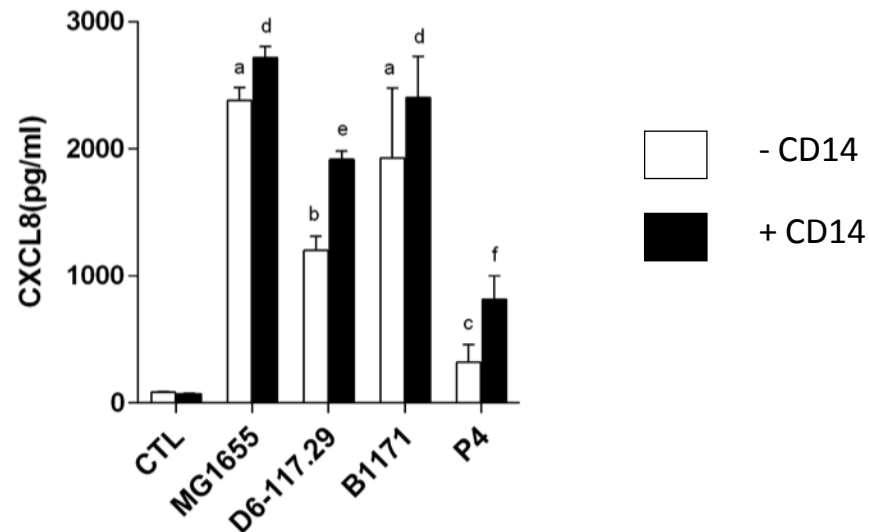
+



3h puis
gentamycine
21h

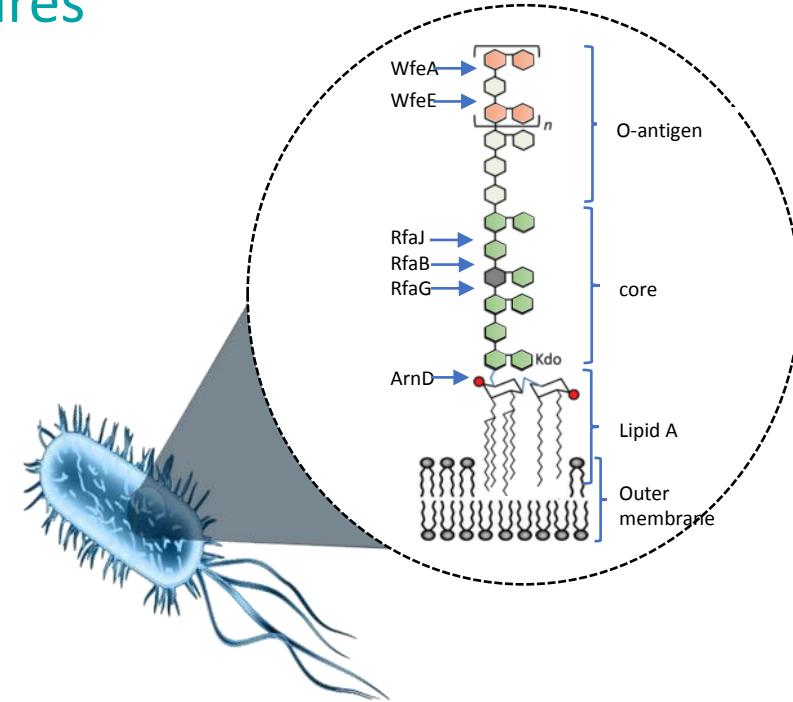
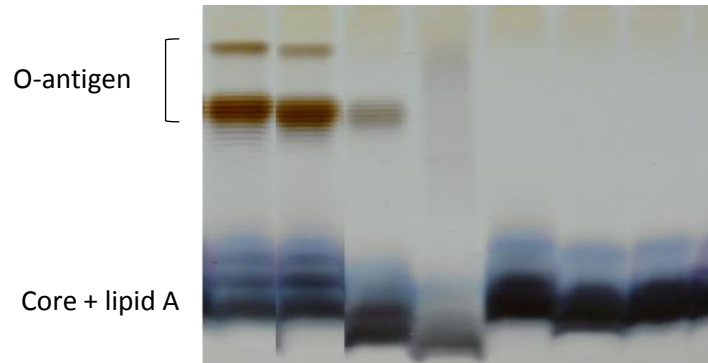
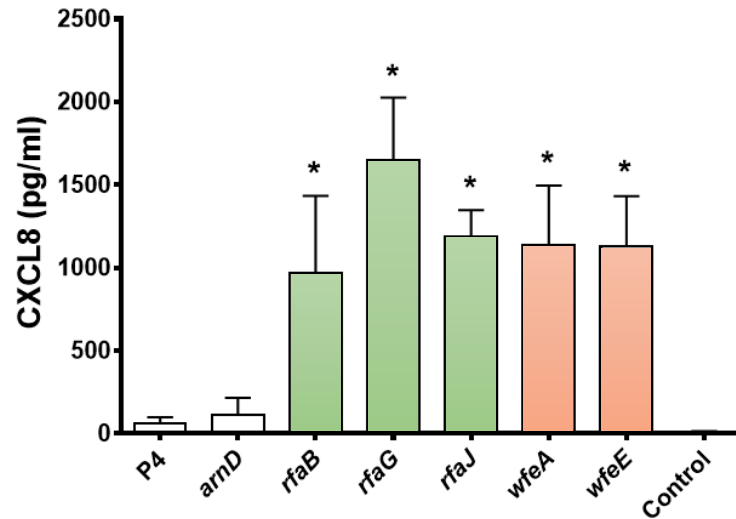


Dosage ELISA CXCL-8



➤ Identification de mutants d'E.coli P4 induisant une réponse accrue des CEM

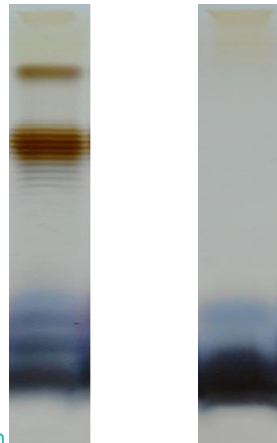
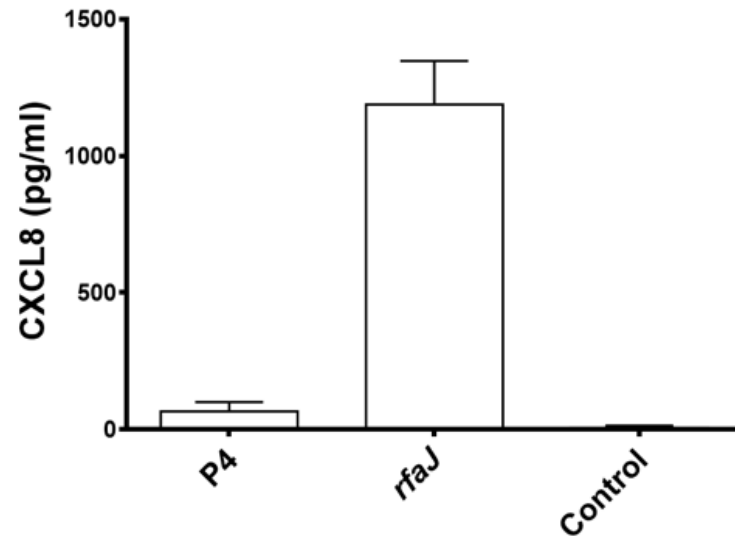
- Criblage d'une banque de mutants aléatoires



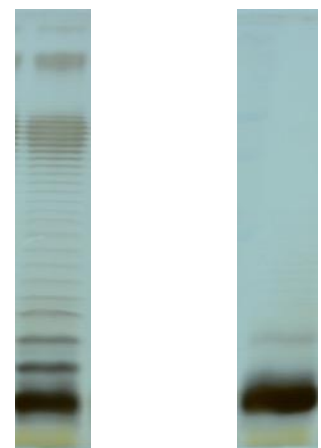
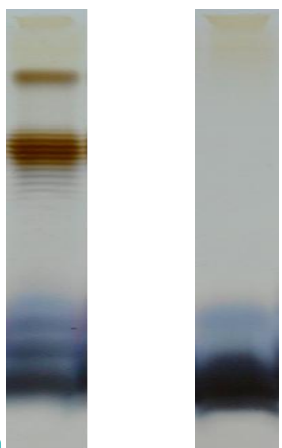
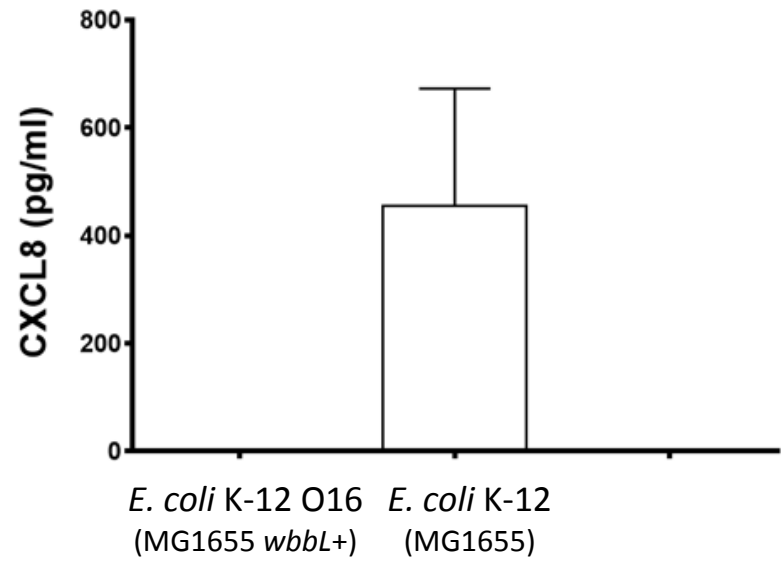
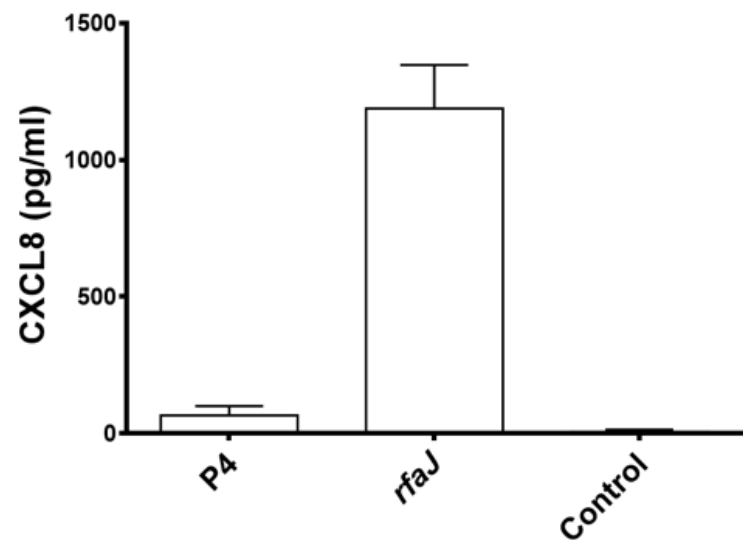
-> la plupart des mutants sont affectés dans la synthèse de l'antigène O

Vedrine *et al.* 2018

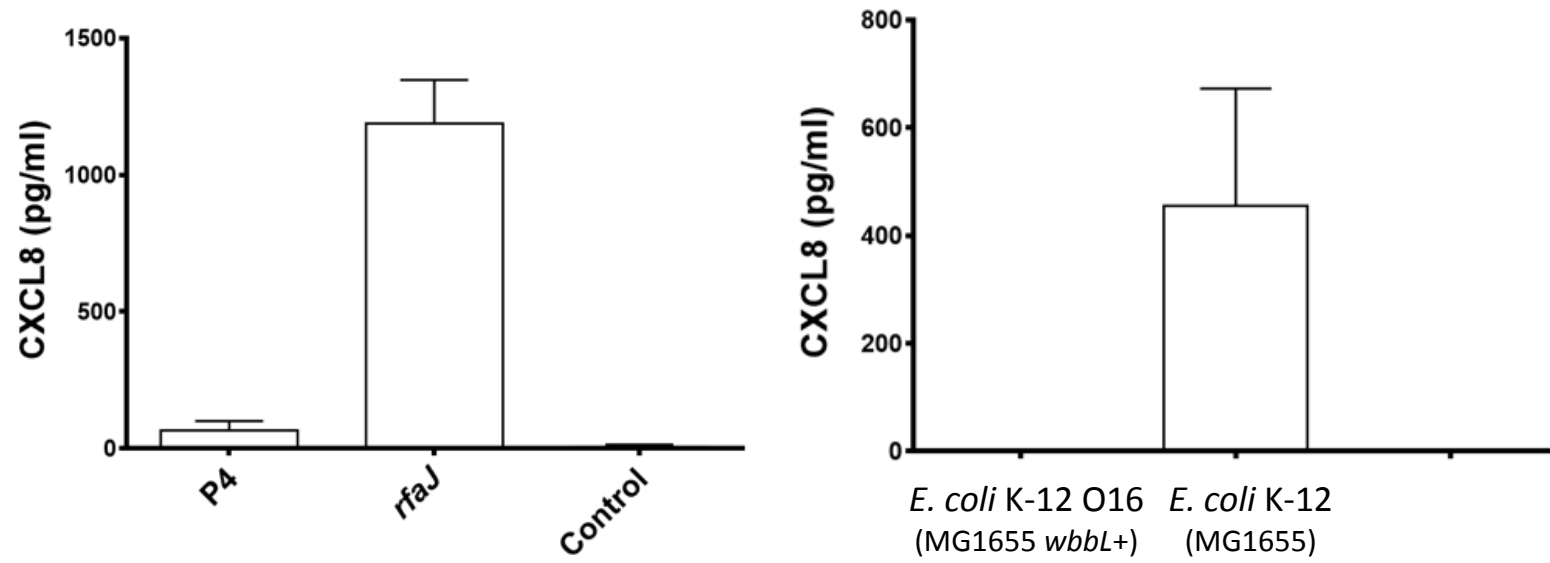
➤ La présence d'un antigène O réduit la réponse des CEM



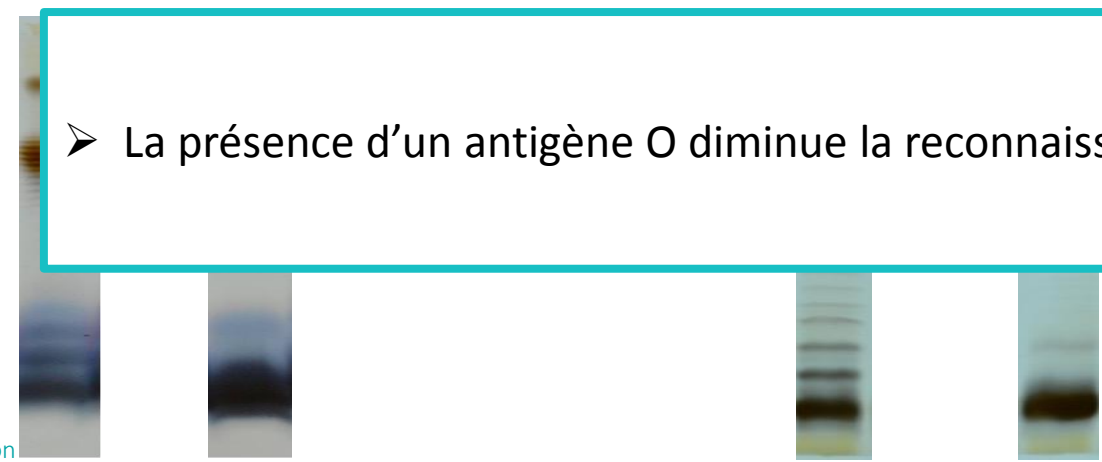
➤ La présence d'un antigène O réduit la réponse des CEM



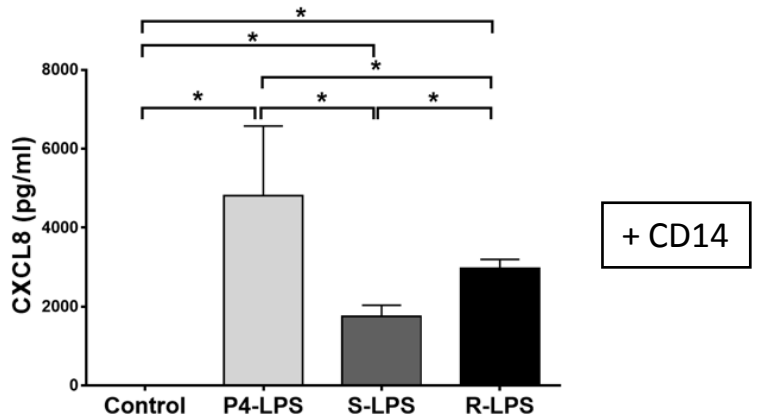
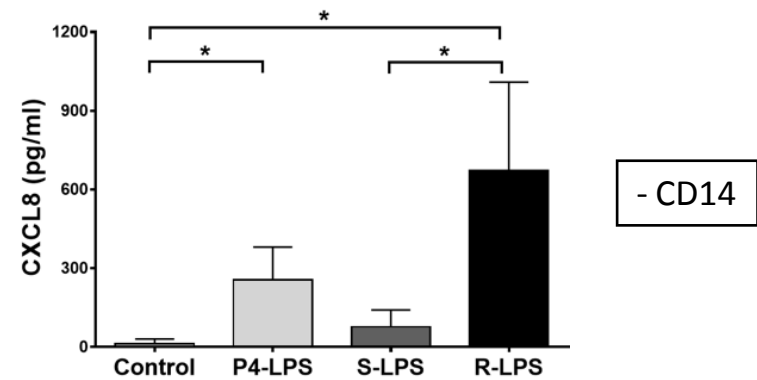
➤ La présence d'un antigène O réduit la réponse des CEM



➤ La présence d'un antigène O diminue la reconnaissance du LPS par les CEM



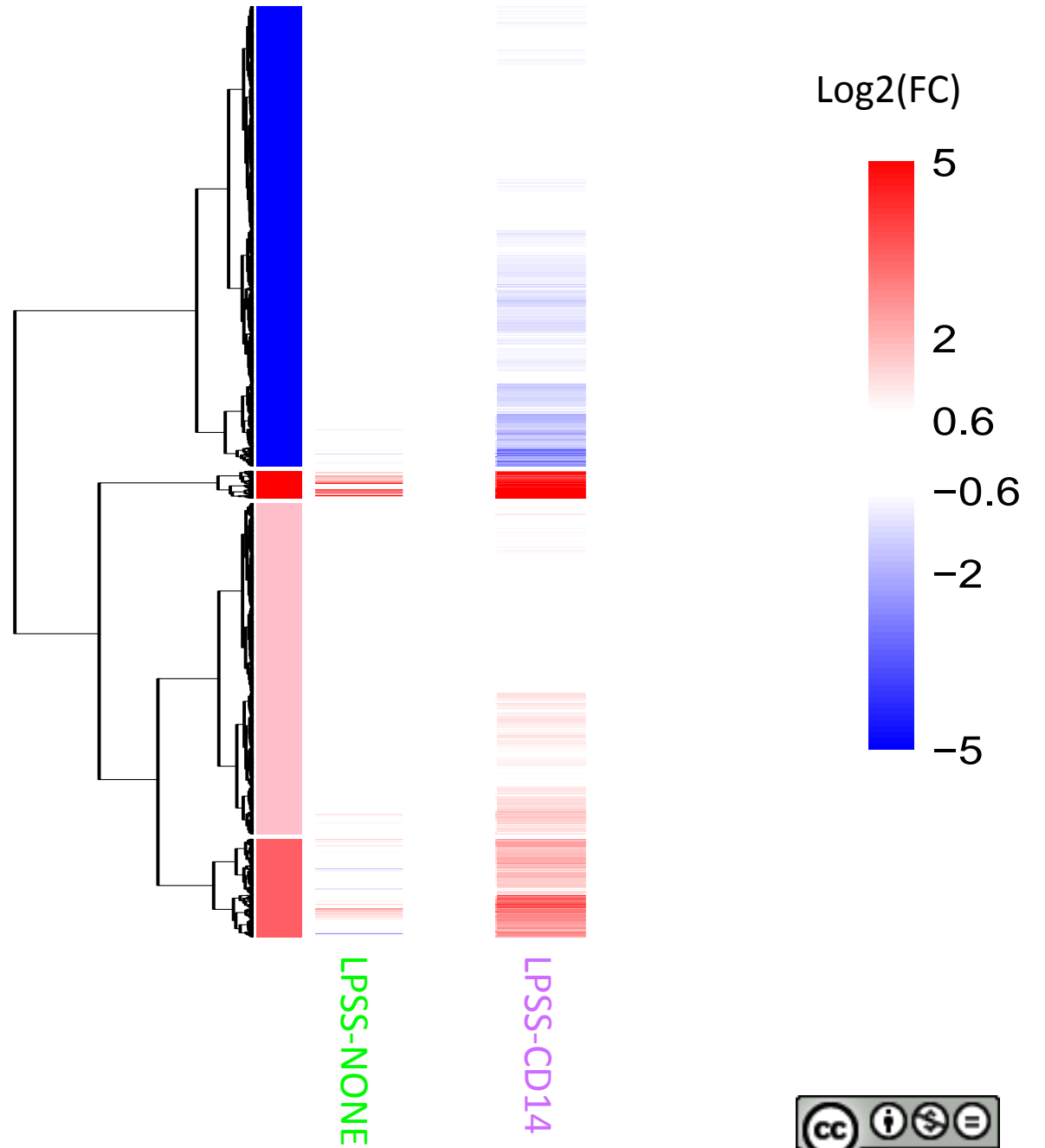
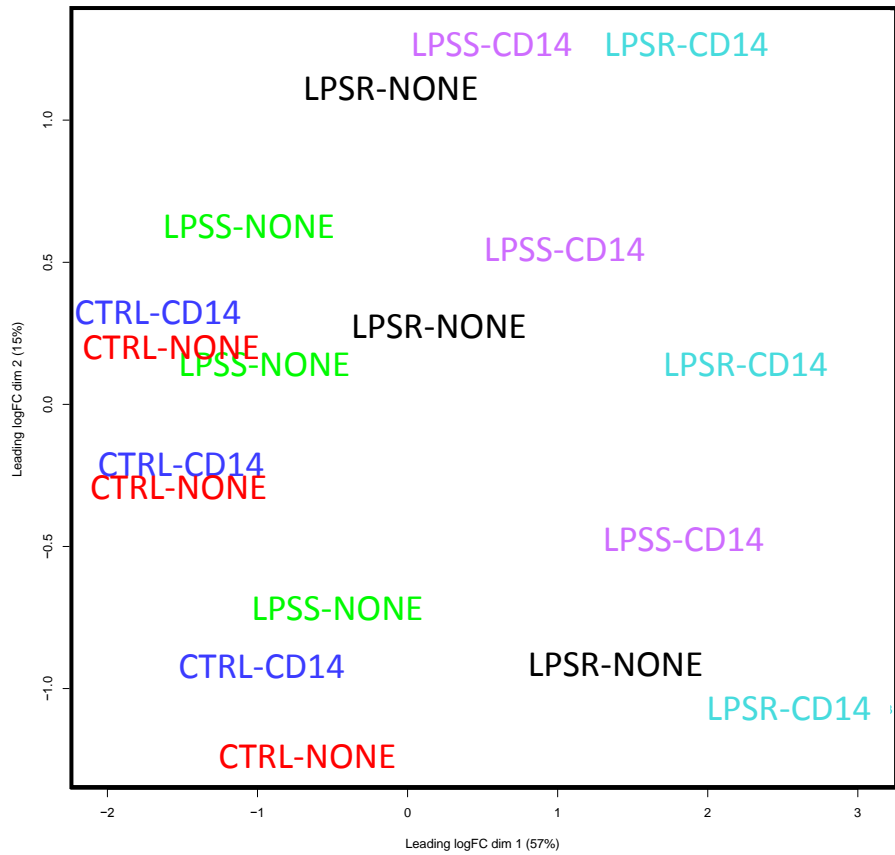
➤ La réponse des CEMs au LPS-S requiert le cofacteur CD14

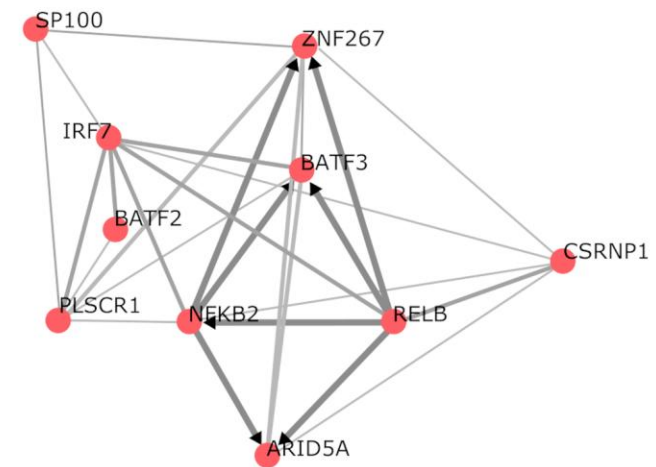
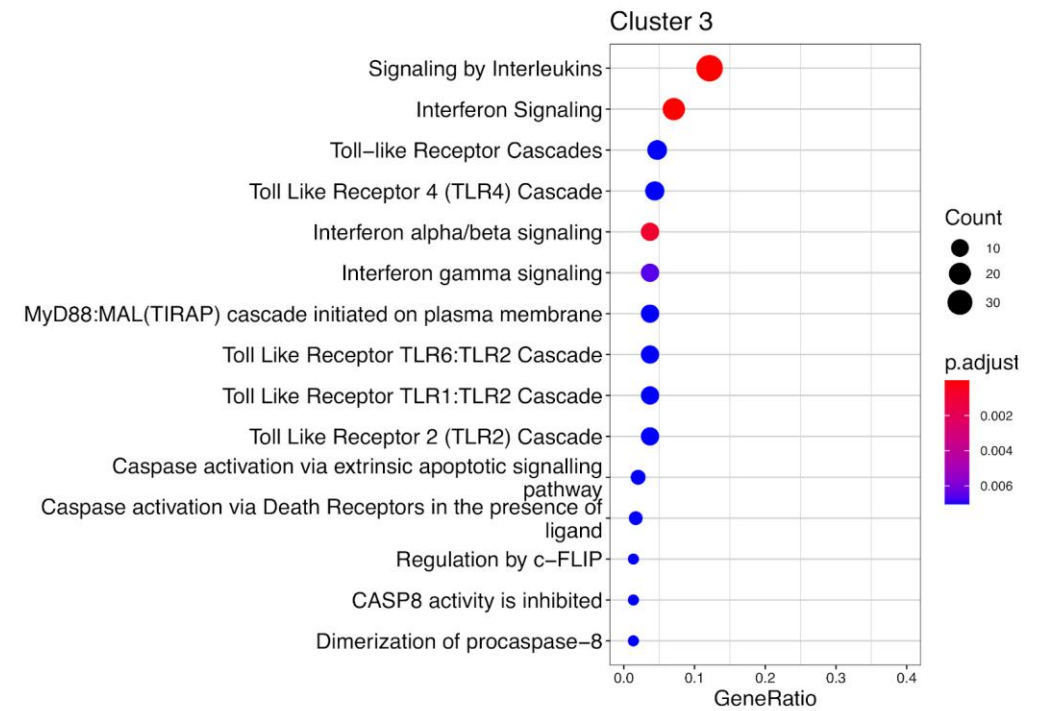
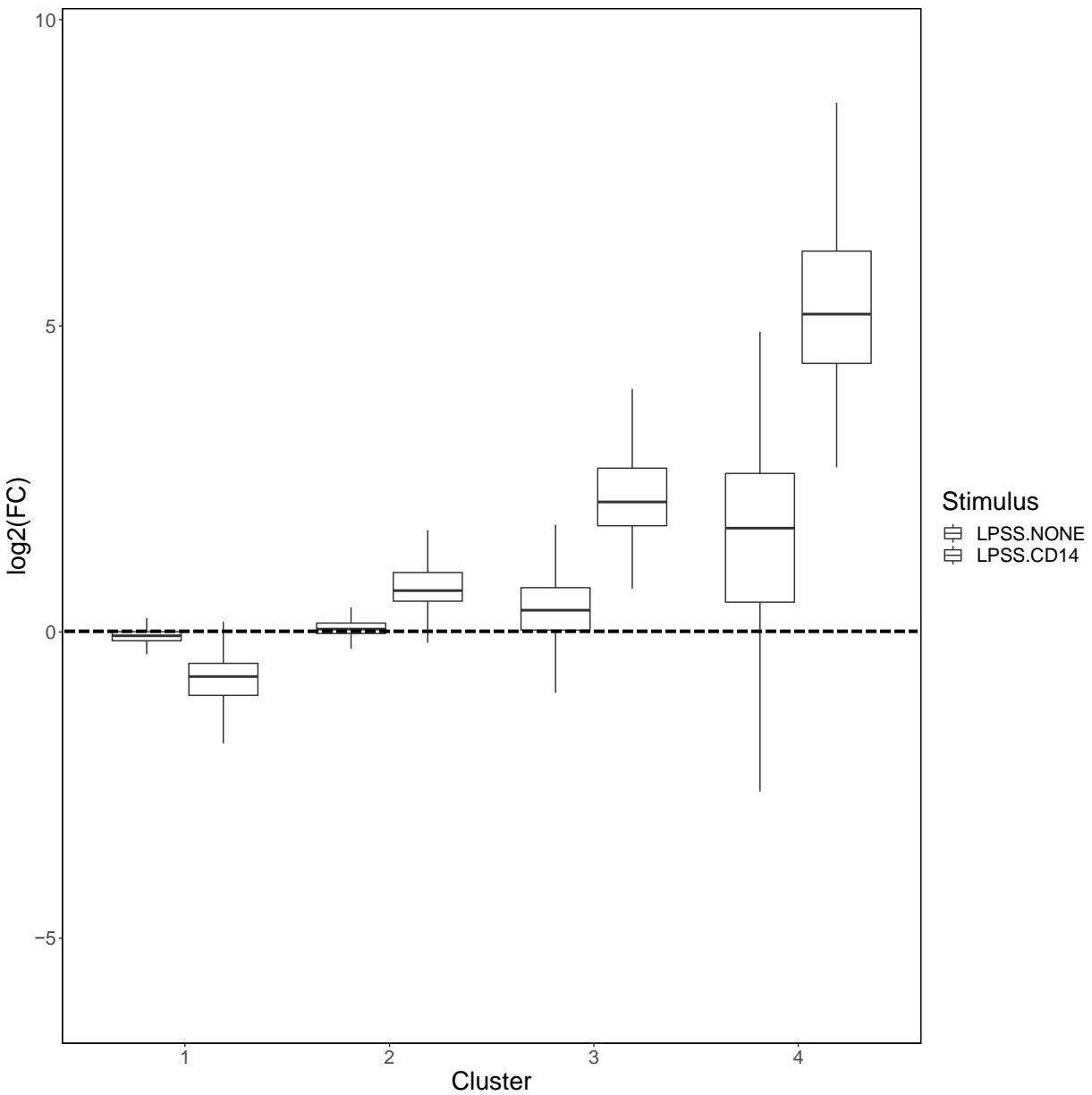


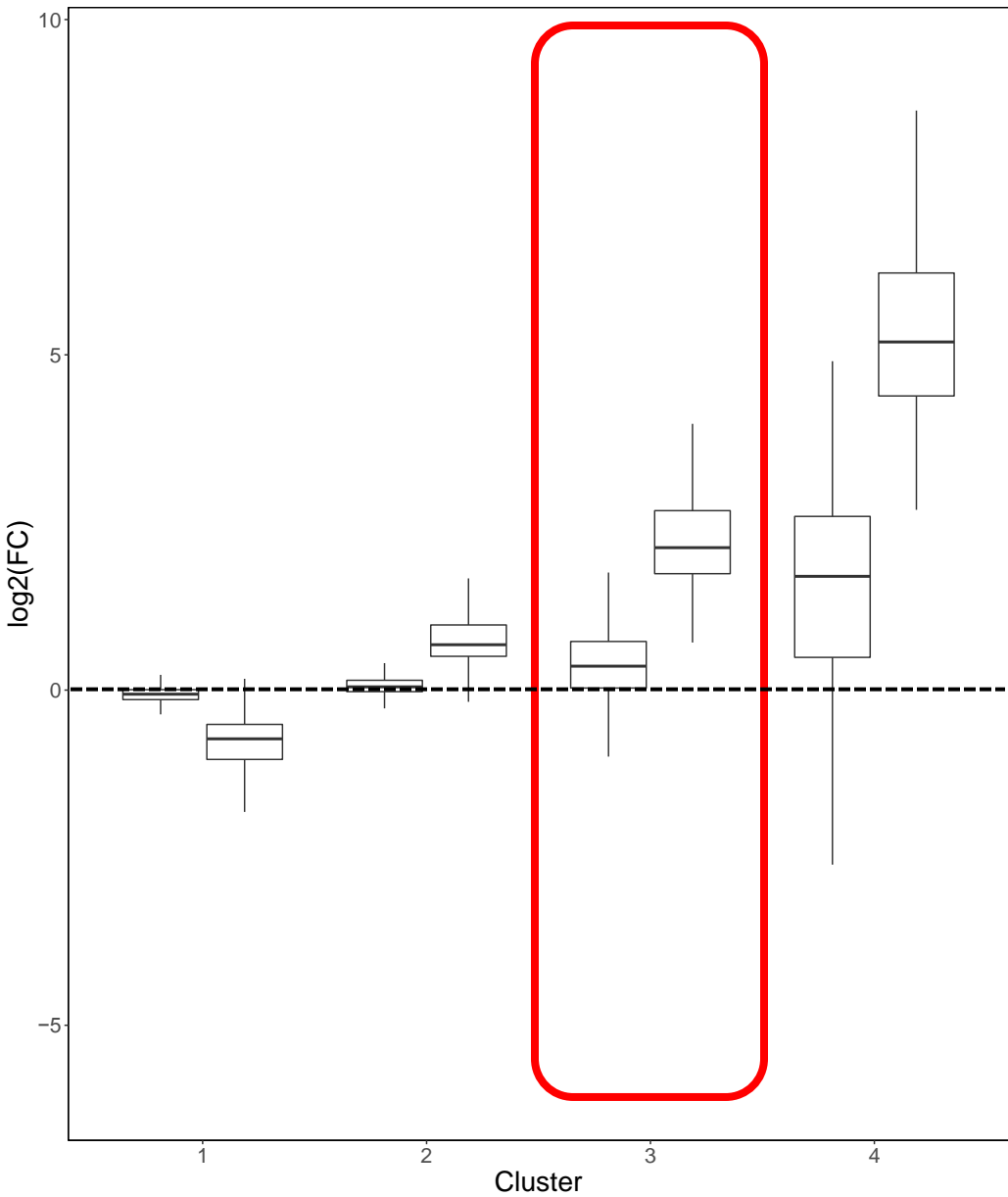
➤ Analyse par RNAseq du rôle de CD14 dans la modulation de la réponse des CEMs

➤ Stimulation avec LPS-S ou LPS-R

➤ En présence ou non de CD14

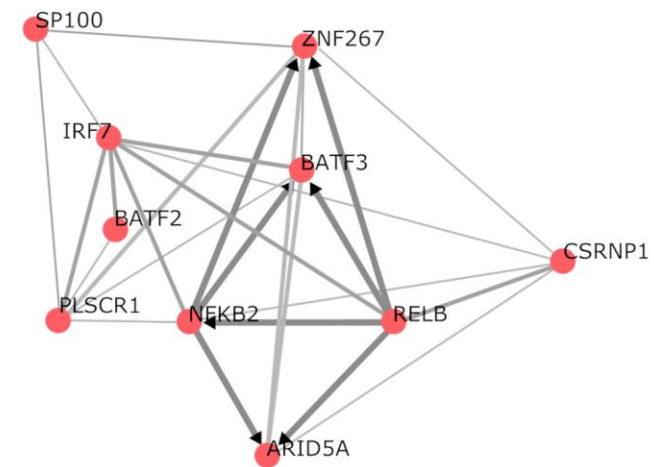
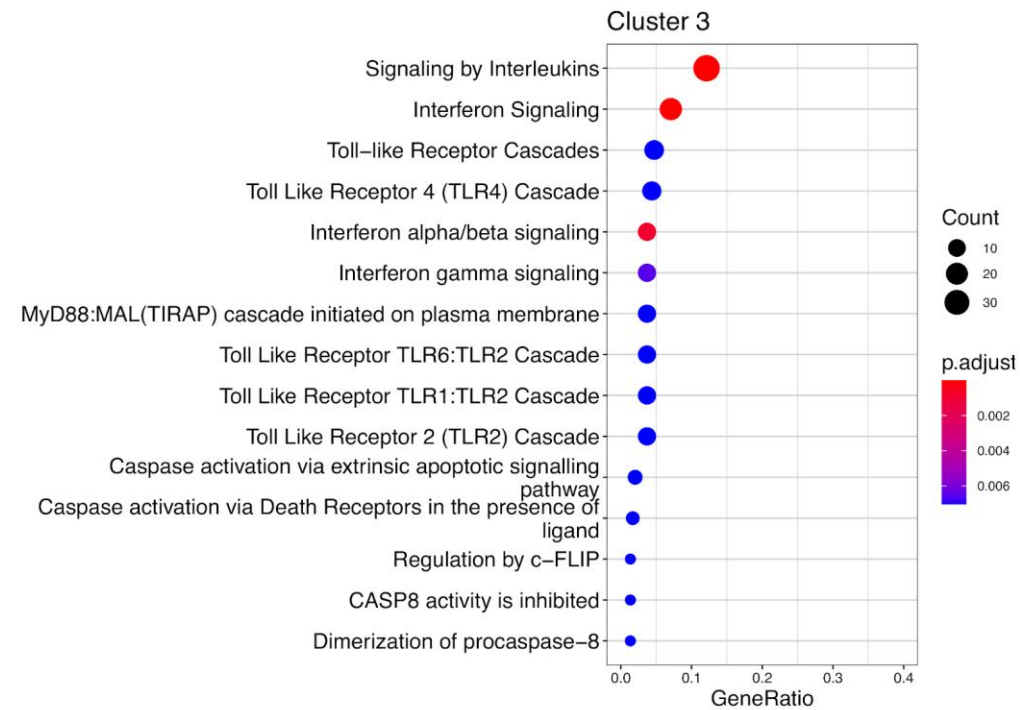






Stimulus

- LPSS.NONE
- ▒ LPSS.CD14

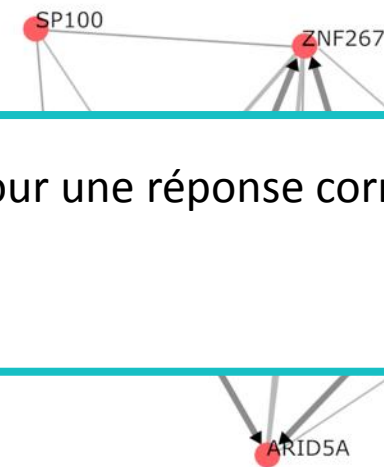
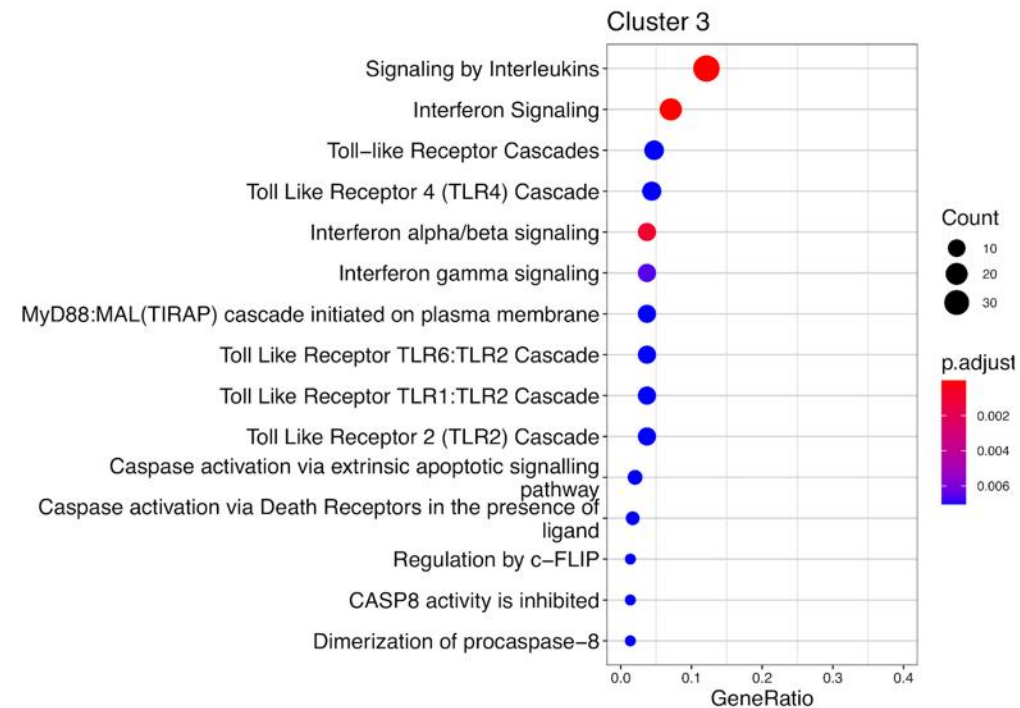
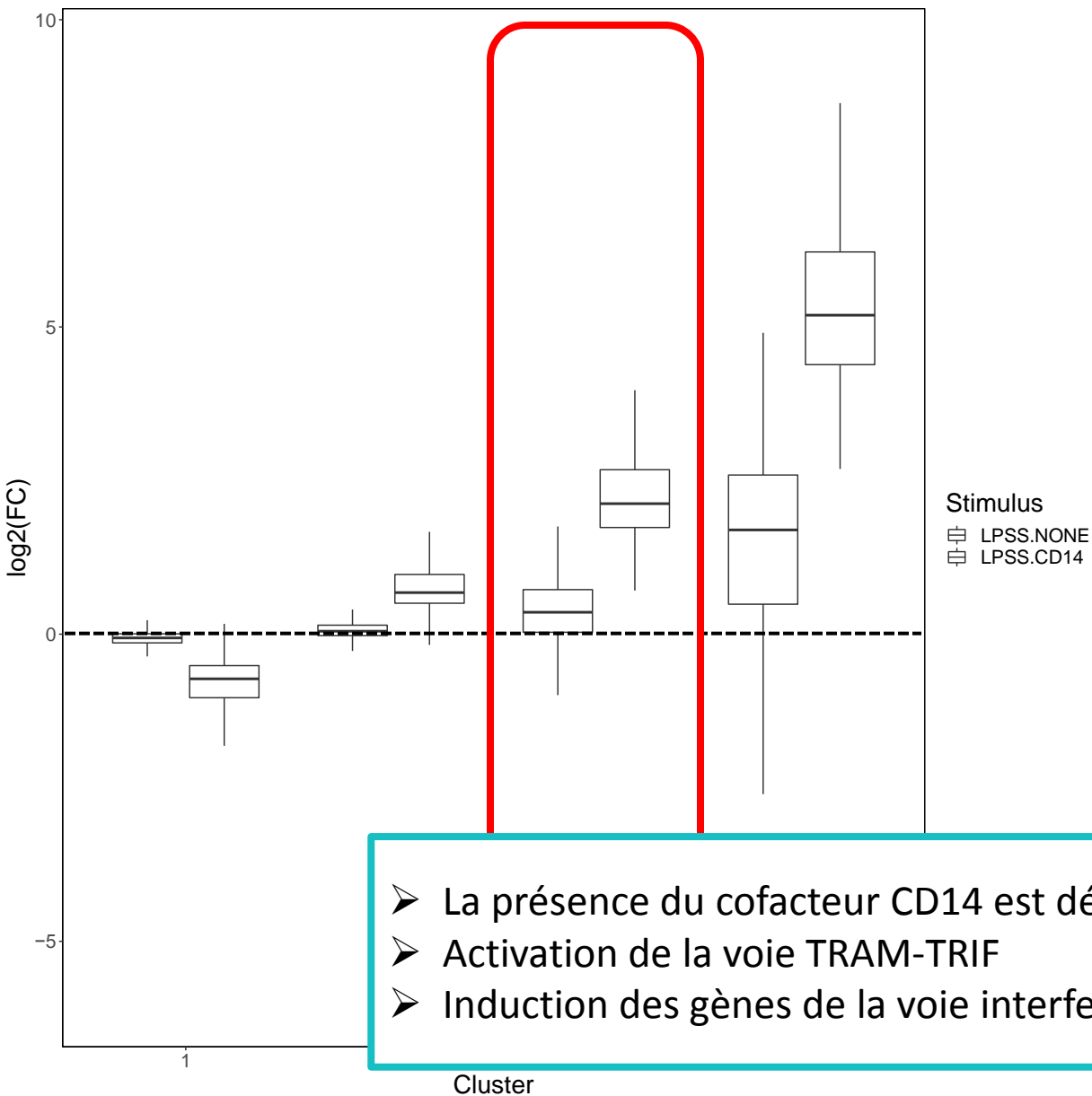


INRAE

Rencontre Op+lait

18/10/2022 – P. Germon

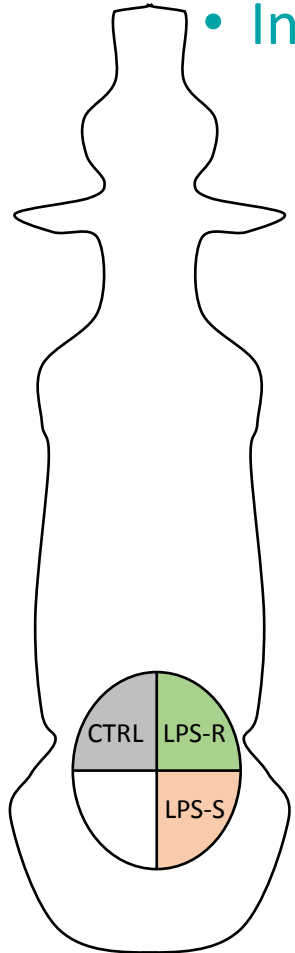




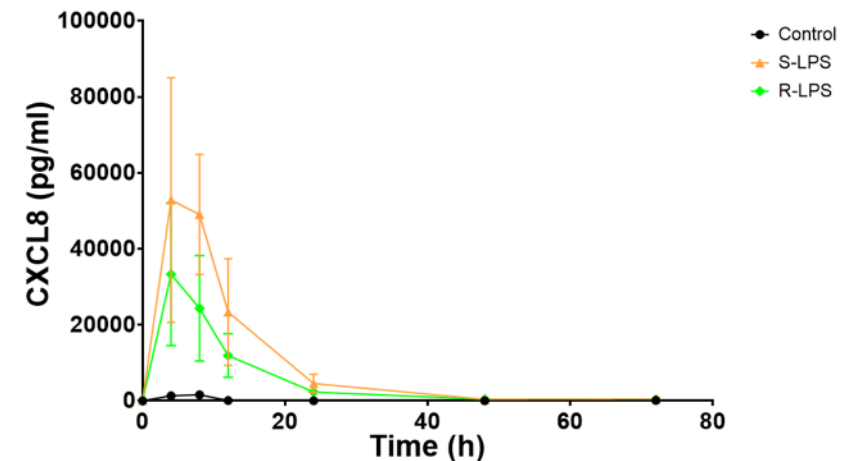
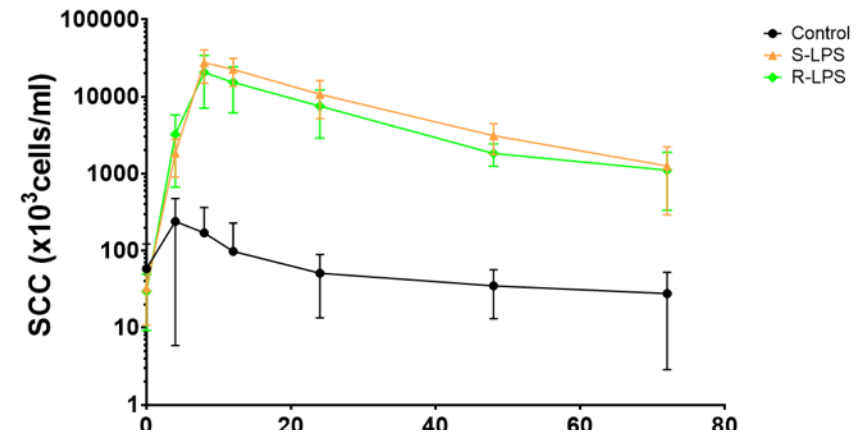
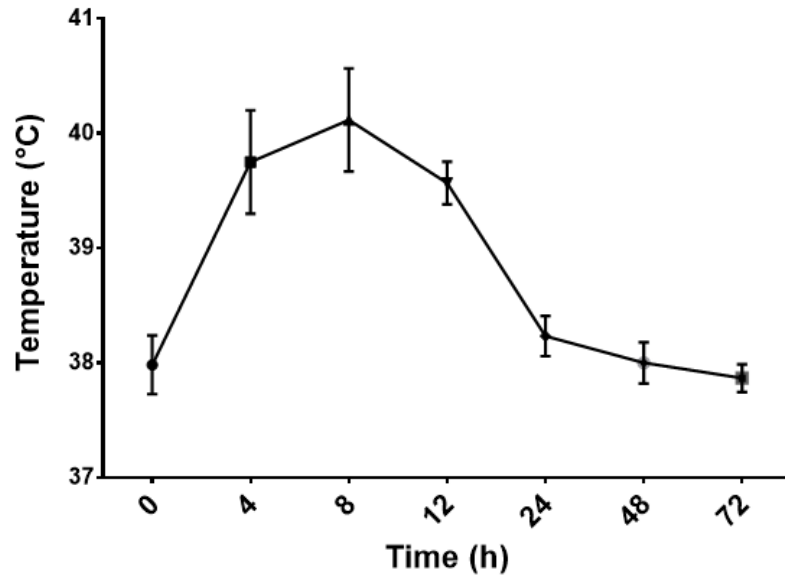
- La présence du cofacteur CD14 est déterminante pour une réponse correcte au LPS-S
- Activation de la voie TRAM-TRIF
- Induction des gènes de la voie interferon de type 1

➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo

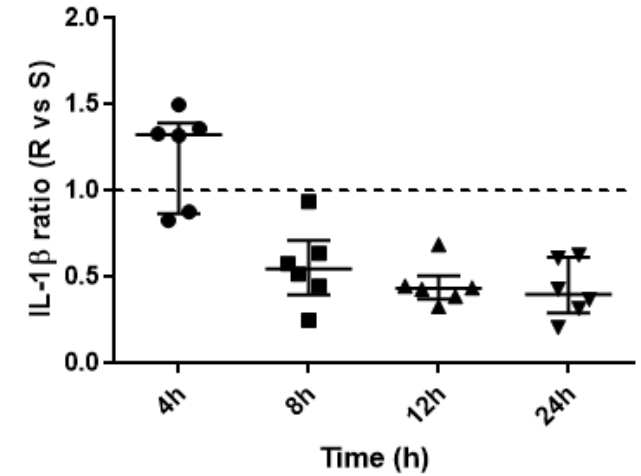
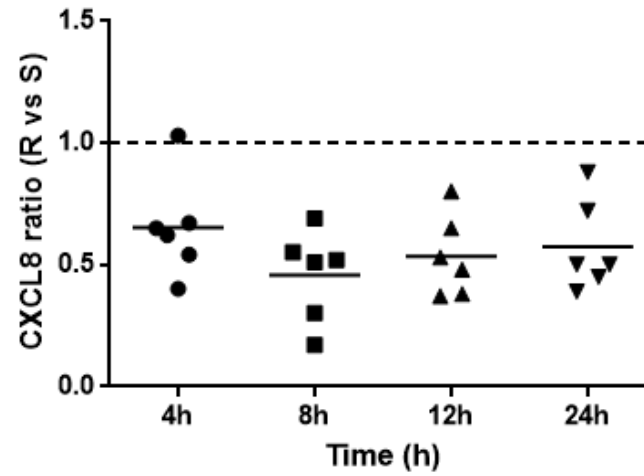
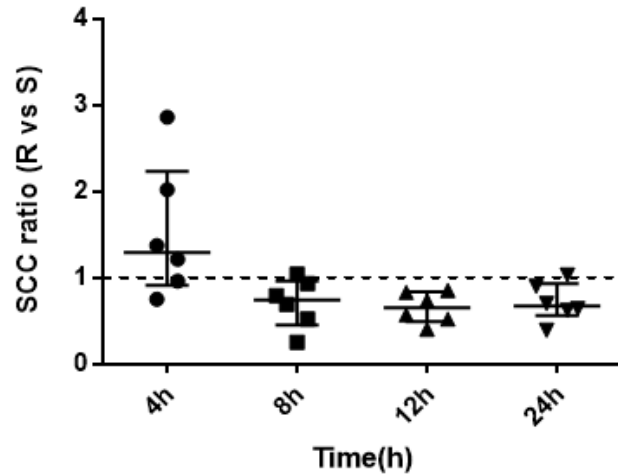
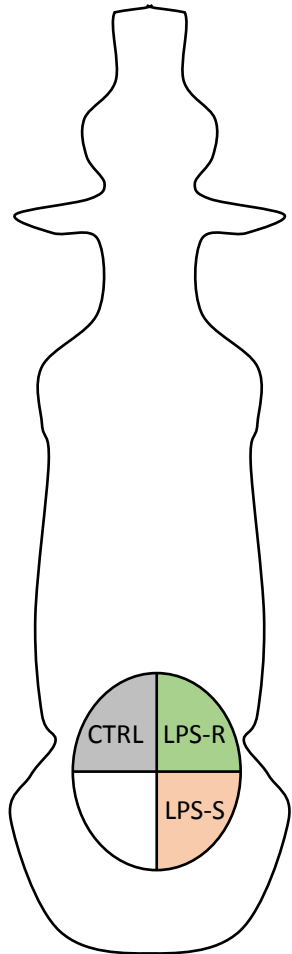


- Infusion de 1 μ g des fractions LPS dans les quartiers de 6 vaches
- comptages cellulaires, suivi de température et dosages cytokines/chimiokines



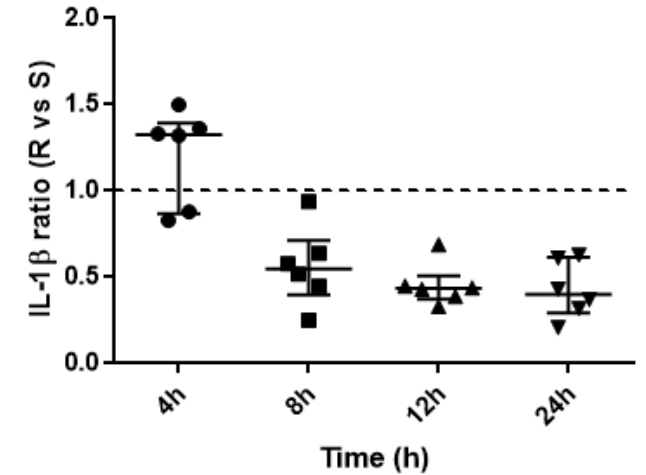
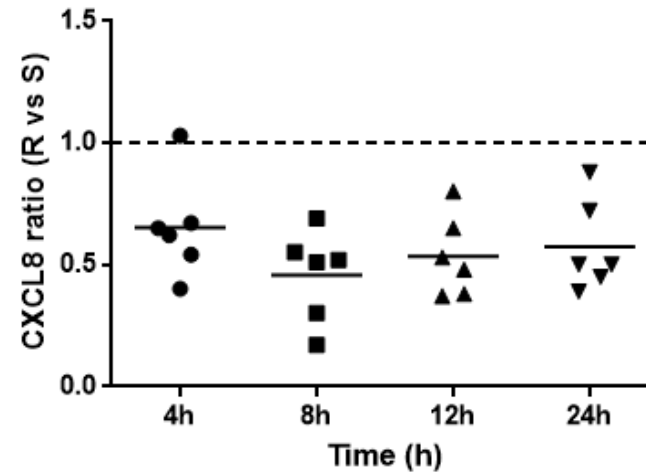
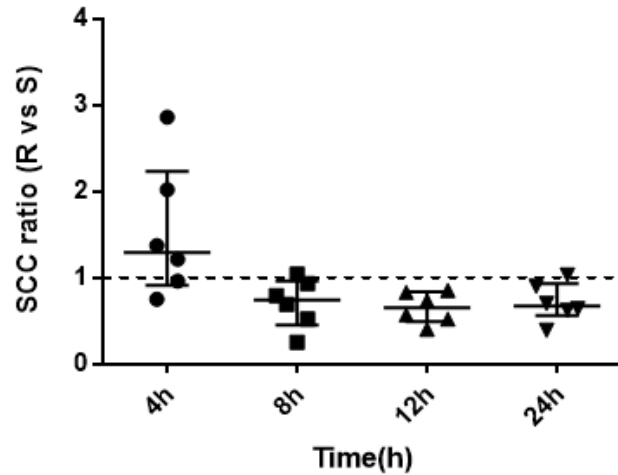
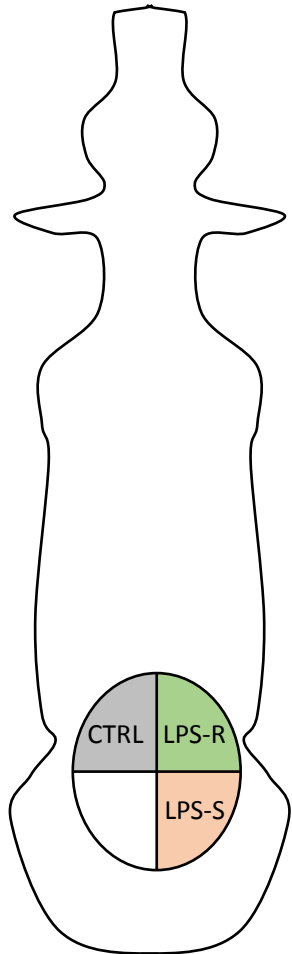
➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo



➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo



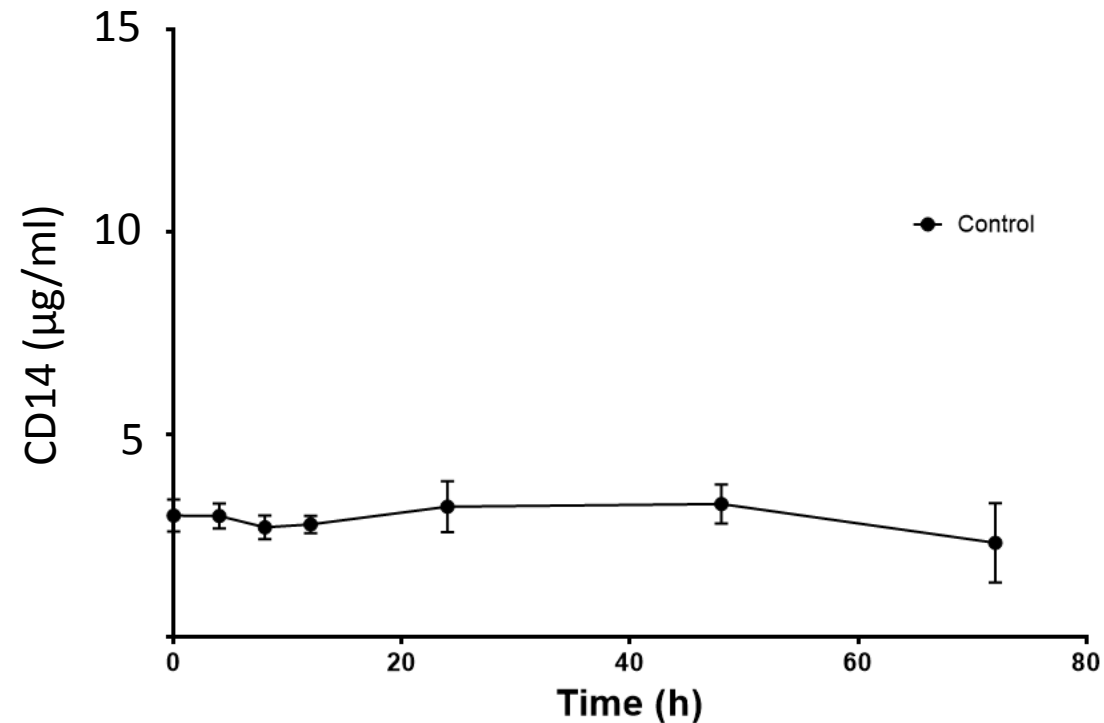
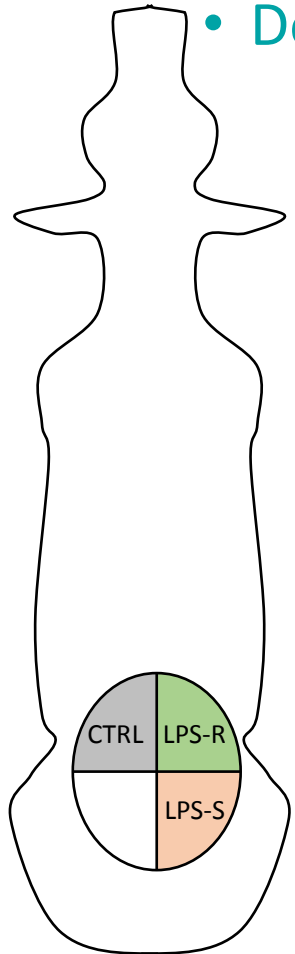
- Paradoxalement, la réponse est plus forte avec le LPS-S
- Elimination/detoxification plus rapide du LPS-R ?
- La présence de l'antigène O a un impact sur la réponse de l'hôte

Vedrine *et al.* 2018

➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo

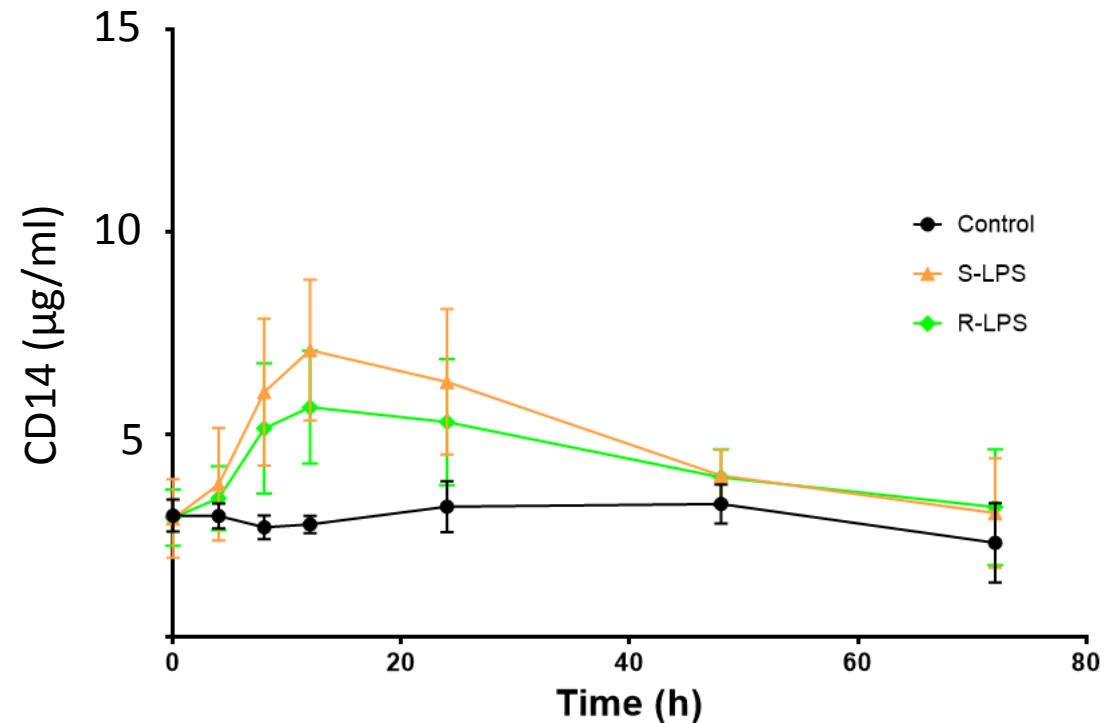
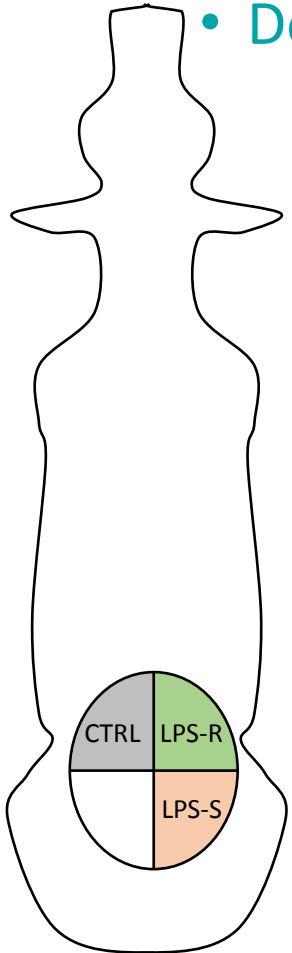
- Dosage de CD14 dans le lait



➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo

- Dosage de CD14 dans le lait



INRAE

Rencontre Op+lait

18/10/2022 – P. Germon

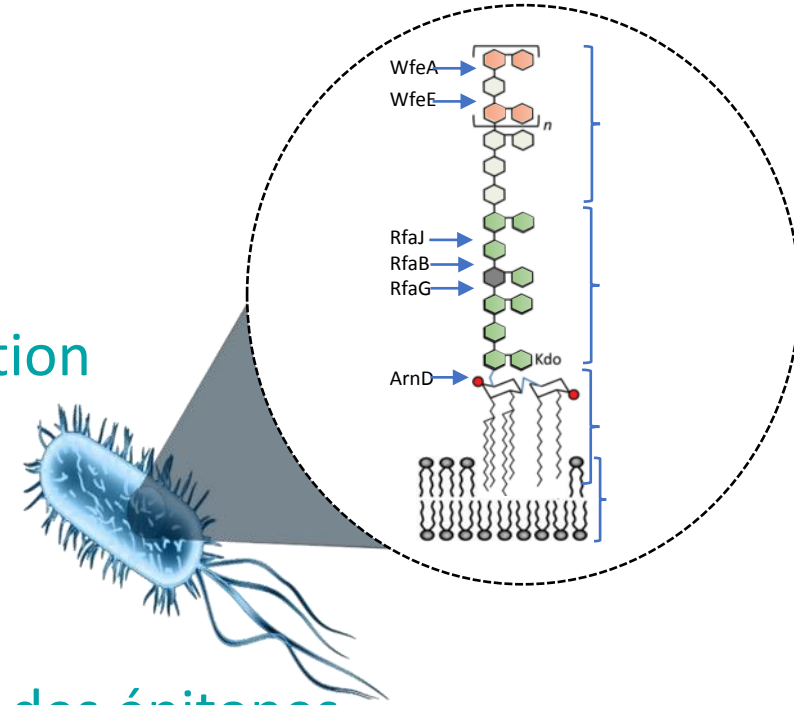


➤ Antigène O et réponse immunitaire innée

- La présence de l'antigène O modifie la réponse immunitaire innée in vitro
- La présence du cofacteur CD14 est déterminante pour une réponse correcte au LPS-S
 - Activation de la voie TRAM-TRIF
 - Induction des gènes de la voie interféron de type 1
 - À mettre en relation avec la littérature:
 - Une injection de CD14 améliore l'élimination de *E. coli* en modèle murin et bovin (travaux de Paape et collègues)
 - Polymorphisme de CD14 pourrait associé à une +/- grande résistance aux mammites (Li et al. 2017)
- Paradoxalement, la réponse est plus forte avec le LPS-S
 - Elimination/detoxification plus rapide du LPS-R ?

➤ Antigène O et immunité adaptative

- Stratégies de lutte contre les mammites
 - Amélioration non-spécifique de l'immunité
 - Vaccination
- Les stratégies vaccinales actuelles reposent sur l'utilisation d'une souche « rough » c-à-d dépourvue d'antigène O



- Hypothèse : les anticorps ainsi générés reconnaîtraient des épitopes conservés chez toutes les souches d'*E. coli* et indépendamment de l'antigène O

➤ Les stratégies vaccinales actuelles

- Quels objectifs ?
 - Prévention de l'infection
 - Si infection:
 - Améliorer la guérison bactériologique
 - Réduire la durée des infections
 - Réduire la sévérité des symptômes
 - Réduire les pertes de production

➤ Les stratégies vaccinales actuelles

• Quels objectifs ?

- Prévention de l'infection
- Si infection:
 - Améliorer la guérison bactériologique
 - Réduire la durée des infections
 - Réduire la sévérité des symptômes
 - Réduire les pertes de production



• Vaccins bactéries inactivées : souche J5

• Vaccins sous-unitaire

- Récepteur du fer: FepA, FecA
- Mélanges de protéines de membrane externe et sidérophores
- YidR (ATP/GTP binding – métabolisme du galacturonate)

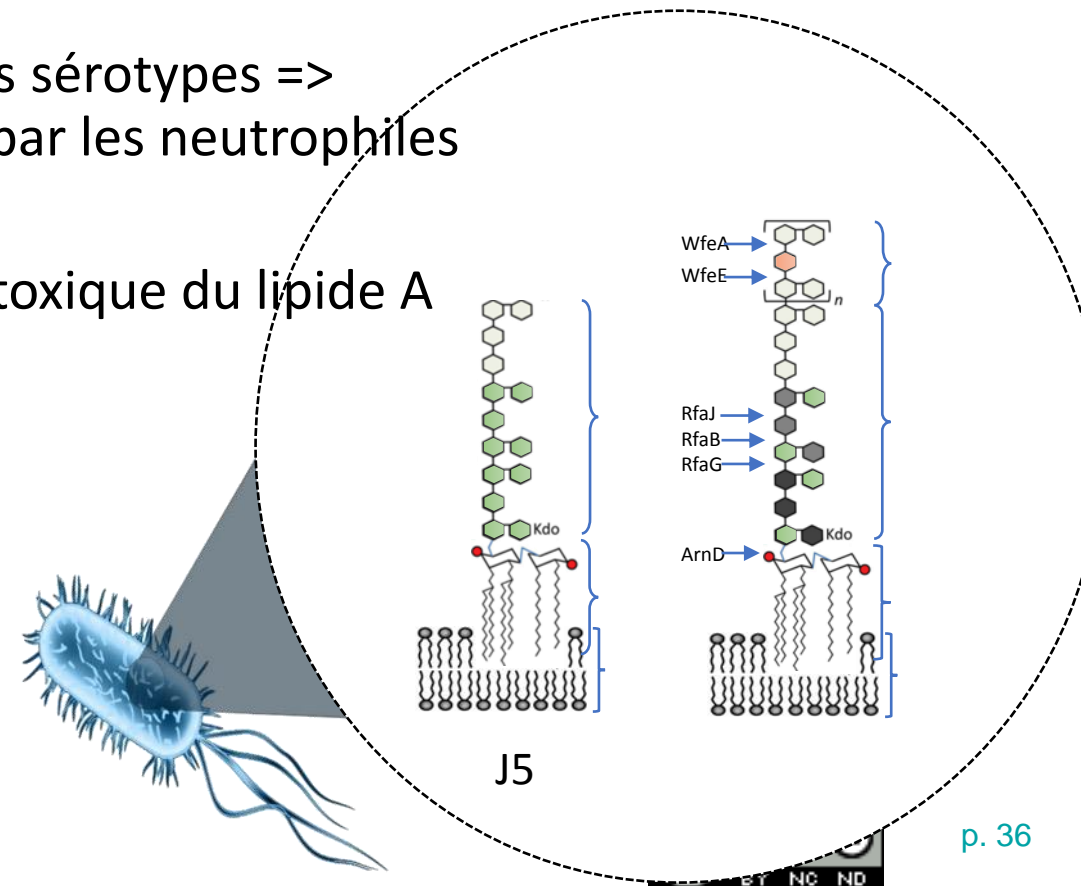
Table 1. Brief summary of key features of illustrative mastitis coliform vaccine trials

Vaccine antigen	Targeted or putative effect	Efficacy	Pitfall or knowledge gap	Salient reference
<i>Escherichia coli</i> J5 bacterins	Antibodies to LPS core antigen	Decreased coliform mastitis severity in field experiments	Variable effect on incidence of cases Unknown mechanism	González et al., 1989; Cullor, 1991; Hogan et al., 1992a
<i>Salmonella</i> Re-17 bacterin toxoid	Antibodies to LPS core antigen	Decreased coliform mastitis severity in field experiment	Unknown mechanism	McClure et al., 1994
<i>E. coli</i> J5 bacterin	Antibodies to LPS core antigens	Discrepant results: reduction or not of severity in experimental infection	Unknown mechanism	Hogan et al., 1992e; Hill, 1991
<i>E. coli</i> J5 bacterin, hyperimmunization	Antibodies to coliform outer membrane antigens in the IgG ₂ isotype	Decreased occurrence of severe mastitis compared with usual schedule	Variable among herds Unknown mechanism	Erskine et al., 2007
<i>E. coli</i> J5 bacterin with killed <i>Staphylococcus aureus</i> (StartVac, Hipra)	Antibodies to coliform outer membrane antigens	Decreased mastitis severity in a field study	No reduction in incidence of case, unknown mechanism	Bradley et al., 2015
Enterobactin FepA	Iron acquisition	Growth reduction in dry mammary secretion	Likely not active in lactation, not tested in vivo	Lin et al., 1999
Siderophore receptor FecA	Iron acquisition	None in experimental infection	Antibody titer insufficient in milk	Takemura et al., 2002; Wolf et al., 2004
Whole <i>E. coli</i> (P4), intramammary booster with bacterial extract	Antibody and cell-mediated responses	Reduction in severity, likely independent of antibodies, related to Th17 response	Heterologous protection not tested	Herry et al., 2017
<i>Klebsiella</i> siderophore receptors and porin proteins (KlebVax)	Iron acquisition and multiple bacterial functions With antibodies	Effective in 1 small-scale study, ineffective in a large-scale study		Gorden et al., 2018; Tomazi et al., 2021
<i>Klebsiella</i> recombinant YidR	Unknown bacterial functions With antibodies	Reduced incidence of <i>Klebsiella</i> clinical mastitis	No effect on risk of death if clinical, little antibody response to whole bacteria and activity unknown	Tomazi et al., 2021

Rainard et al. 2021

➤ Vaccins J5

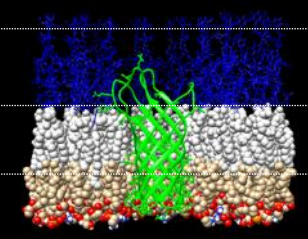
- Utiliser une souche vaccinale inactivée et sans antigène O: souche J5
- Mécanismes d'action potentiels = stimuler la production d'anticorps
 - Qui réagissent avec des souches de différents sérotypes => augmenter l'opsonisation et la phagocytose par les neutrophiles
 - Neutraliser l'activité proinflammatoire/endotoxique du lipide A





100 Å

OmpA



LPS rough
(*rfaL* mutant)



LPS smooth
(O32 – 15 subunits)

O-antigen

Core region

Lipide A

- Un des critères d'évaluation est la production d'anticorps...

Figure 3. Antibody titers in serum-ELISA IgG titers

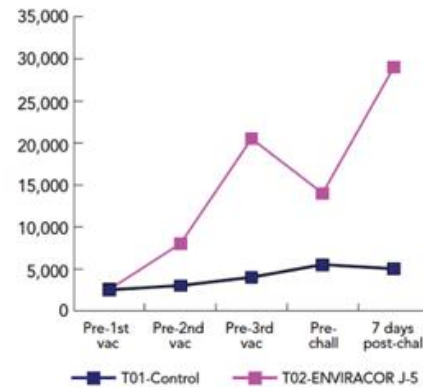
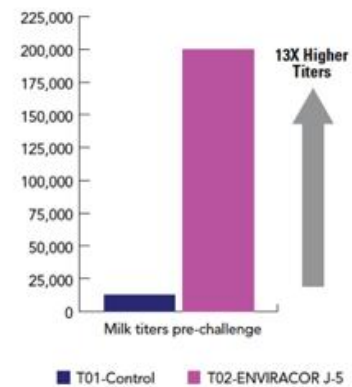


Figure 4. Antibody titers in milk



- Question : est-ce que ces anticorps sont effectivement efficaces pour opsoniser les bactéries et ainsi améliorer l'élimination des bactéries par les neutrophiles

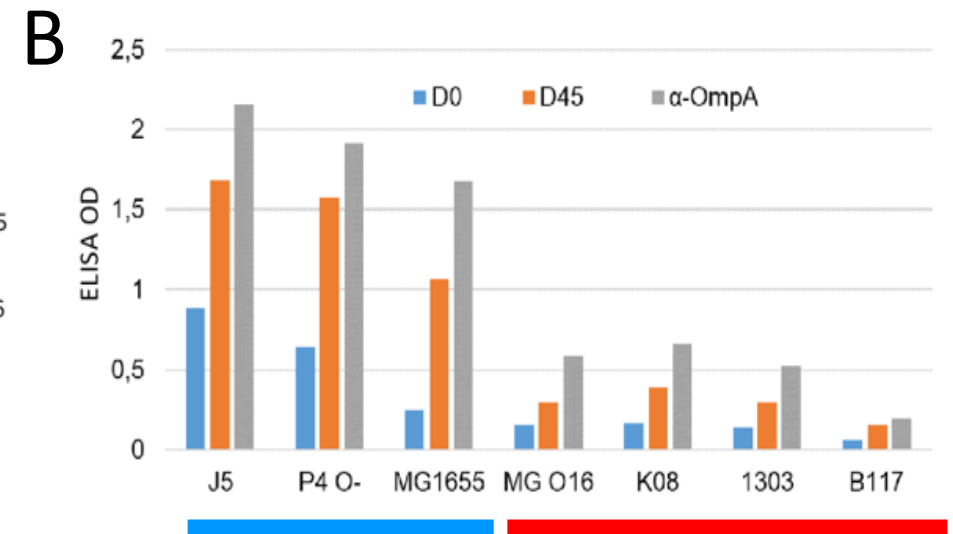
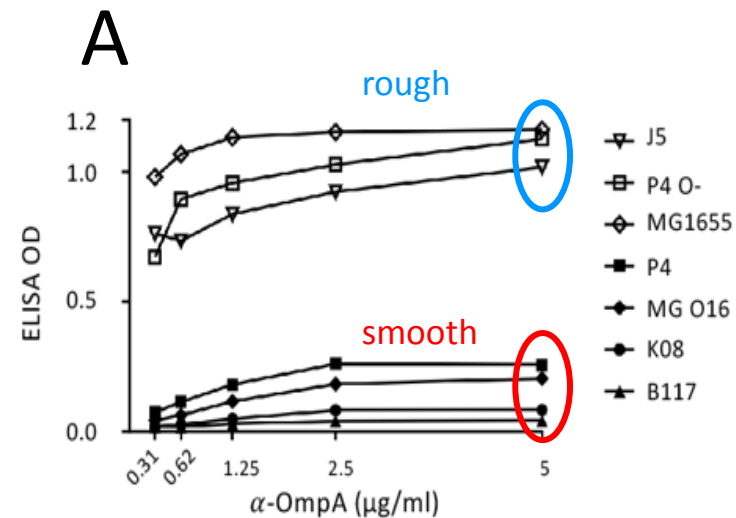
➤ Les anticorps générés par vaccination J5 reconnaissent-ils effectivement *E. coli* ? L'antigène O empêche-t-il la reconnaissance ?

- Source d'anticorps
 - Serum de vaches vaccinées avec *E. coli* J5
- Panel souches d'*E. coli* :
 - Paires de souches isogéniques smooth-rough
 - P4 / P4 Δrfb
 - K-12 O16 / K-12
 - Ainsi que:
 - B117
 - J5
- Explorer la fixation des anticorps

➤ Etude par ELISA

A – sérum anti-OmpA

B- sérums anti-OmpA et anti-J5



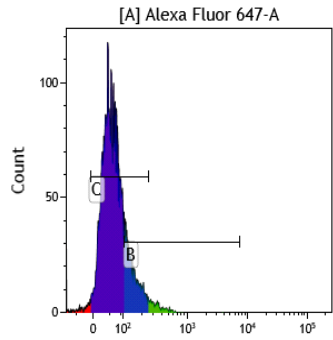
➤ La présence d'un antigène O empêcherait la reconnaissance d'*E. coli* par les anticorps générés par vaccination anti-J5 ou anti-OmpA

L'approche implique une « fixation » des bactéries... dénaturation d'antigènes de surface ?

=> Analyse par cytométrie sur bactéries vivantes

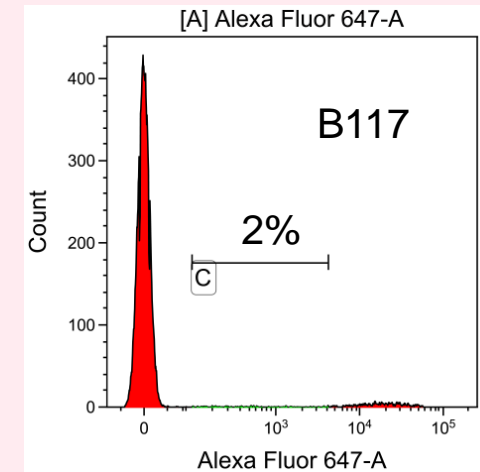
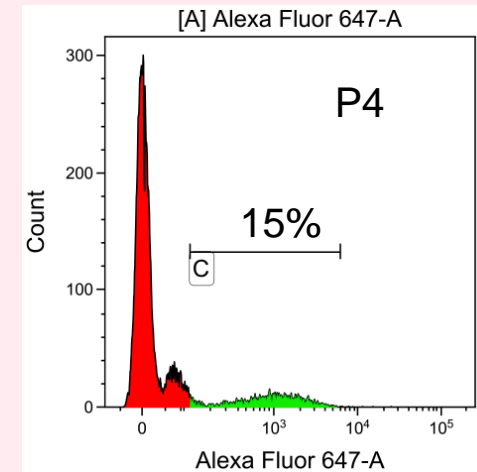
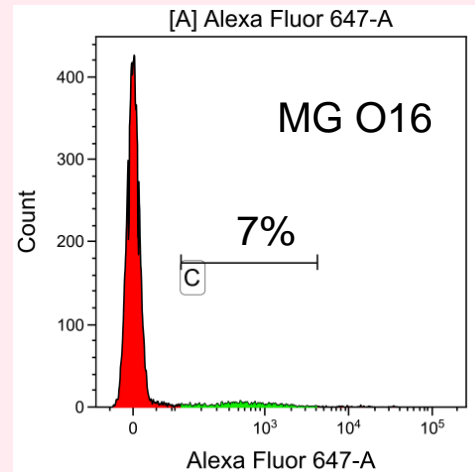
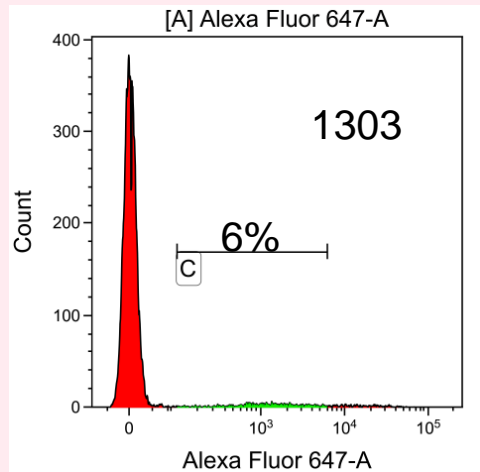
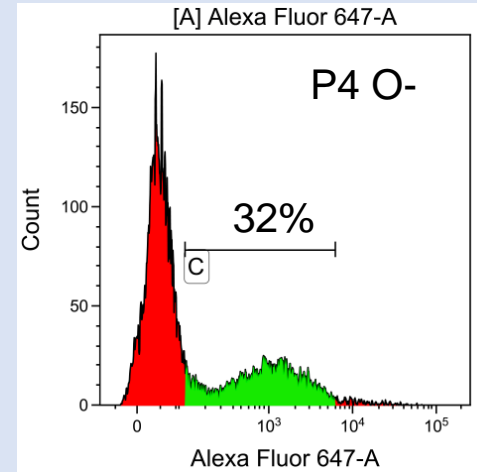
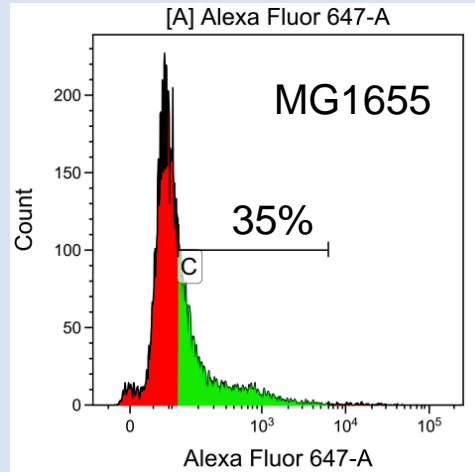
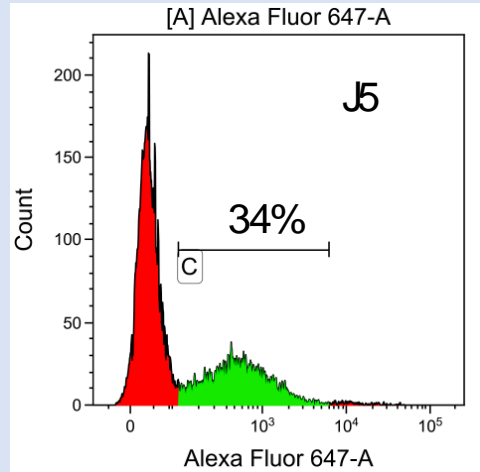
Pre-immune serum

J5



Alexa Fluor 647-A				
Gate	Number	%Total	%Gated	X-Med
All	9 448	94	100	62
B	1 823	18	19	151
C	8 993	90	95	61

Souches Rough



Souches Smooth



INRAE

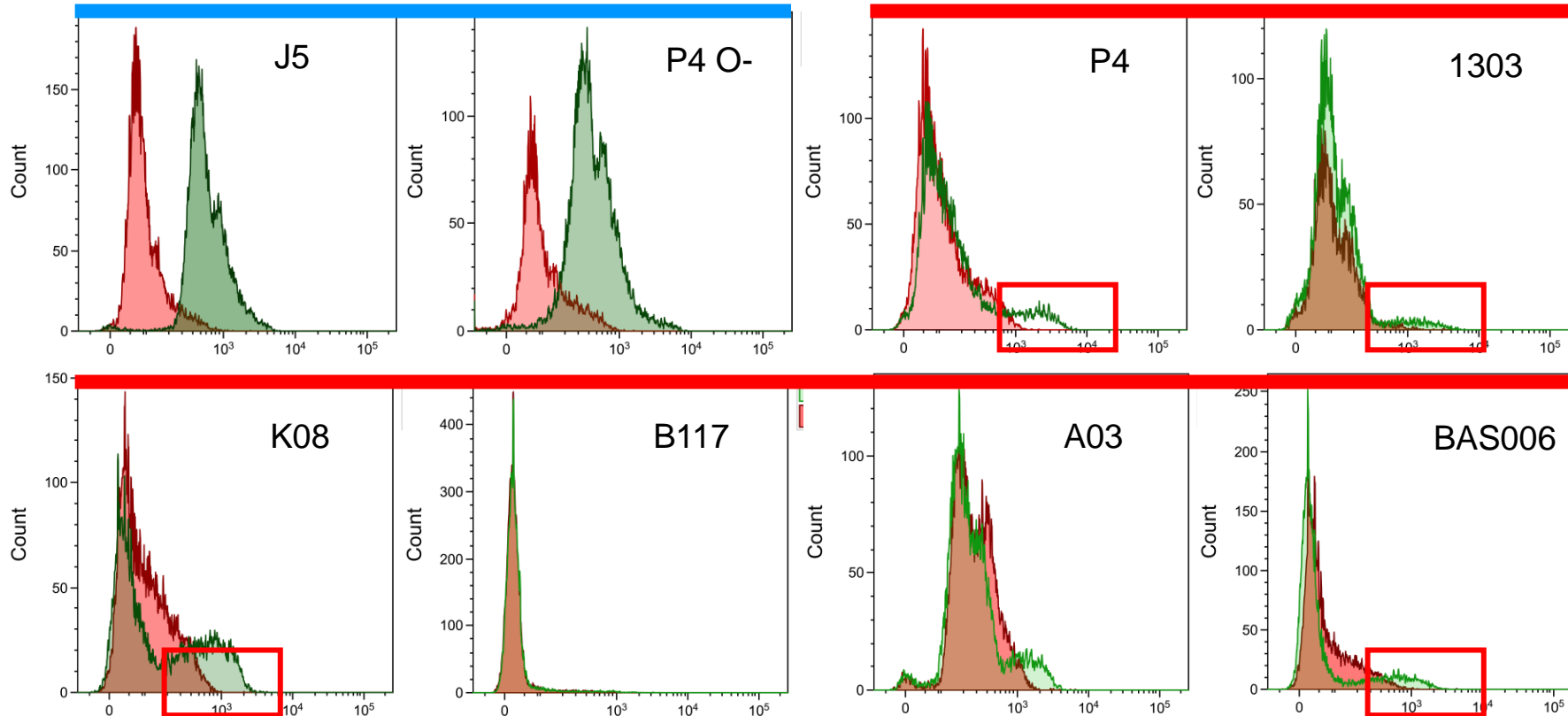
Rencontre Op+lait

18/10/2022 - P. C

- Bonne reconnaissance des souches « rough » dépourvues d'antigènes O
- Reconnaissance réduite des souches « smooth »



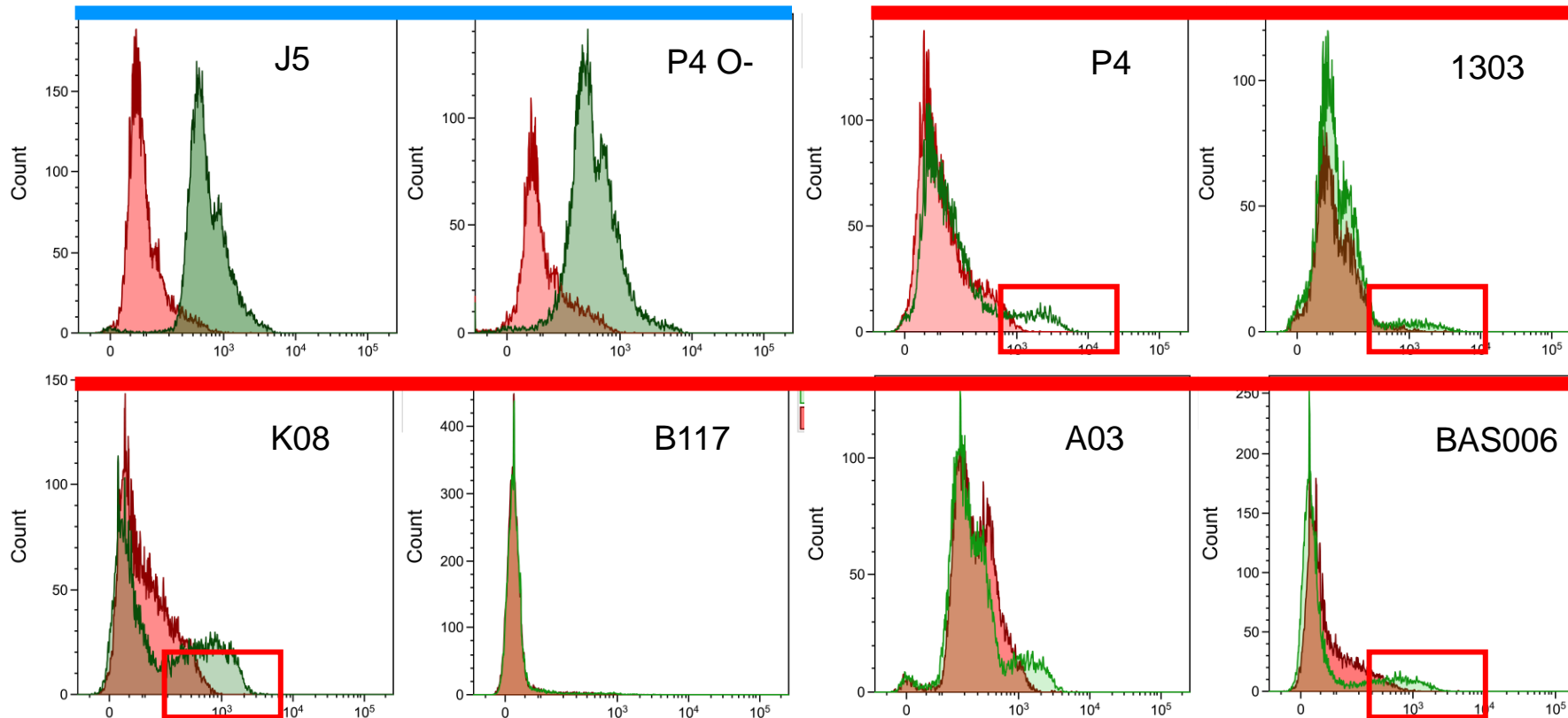
➤ Toutefois une fraction des bactéries semblent reconnues...



- Bonne reconnaissance des souches « rough » dépourvues d'antigènes O
- Reconnaissance réduite des souches « smooth »
- avec marquage d'une fraction des souches « smooth » avec antigène O



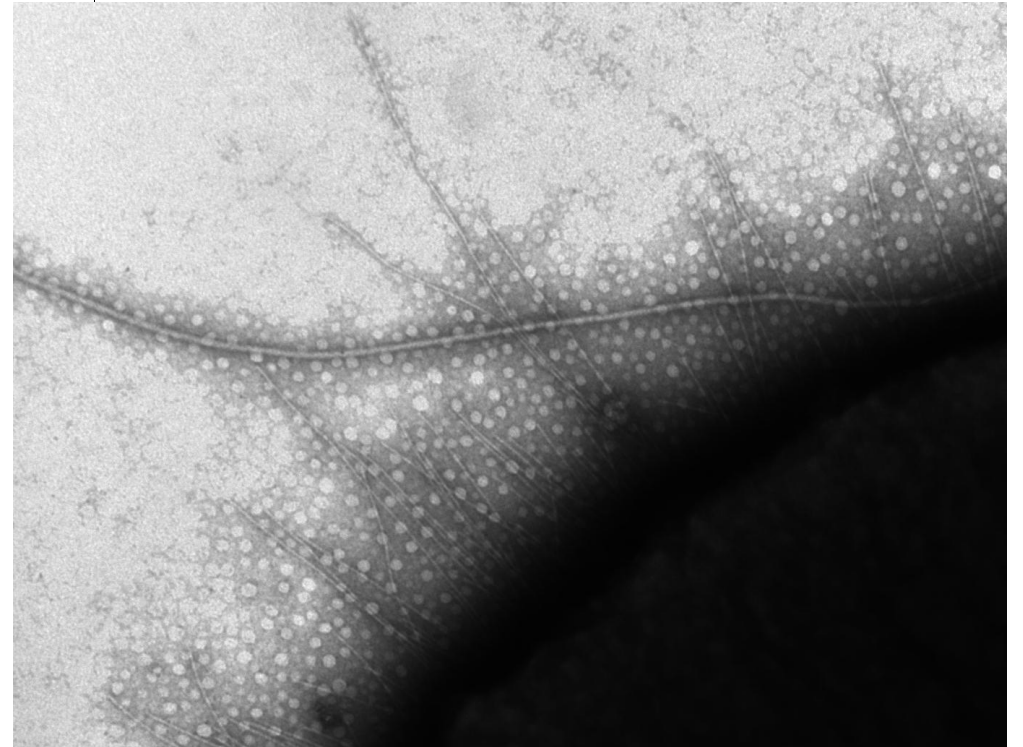
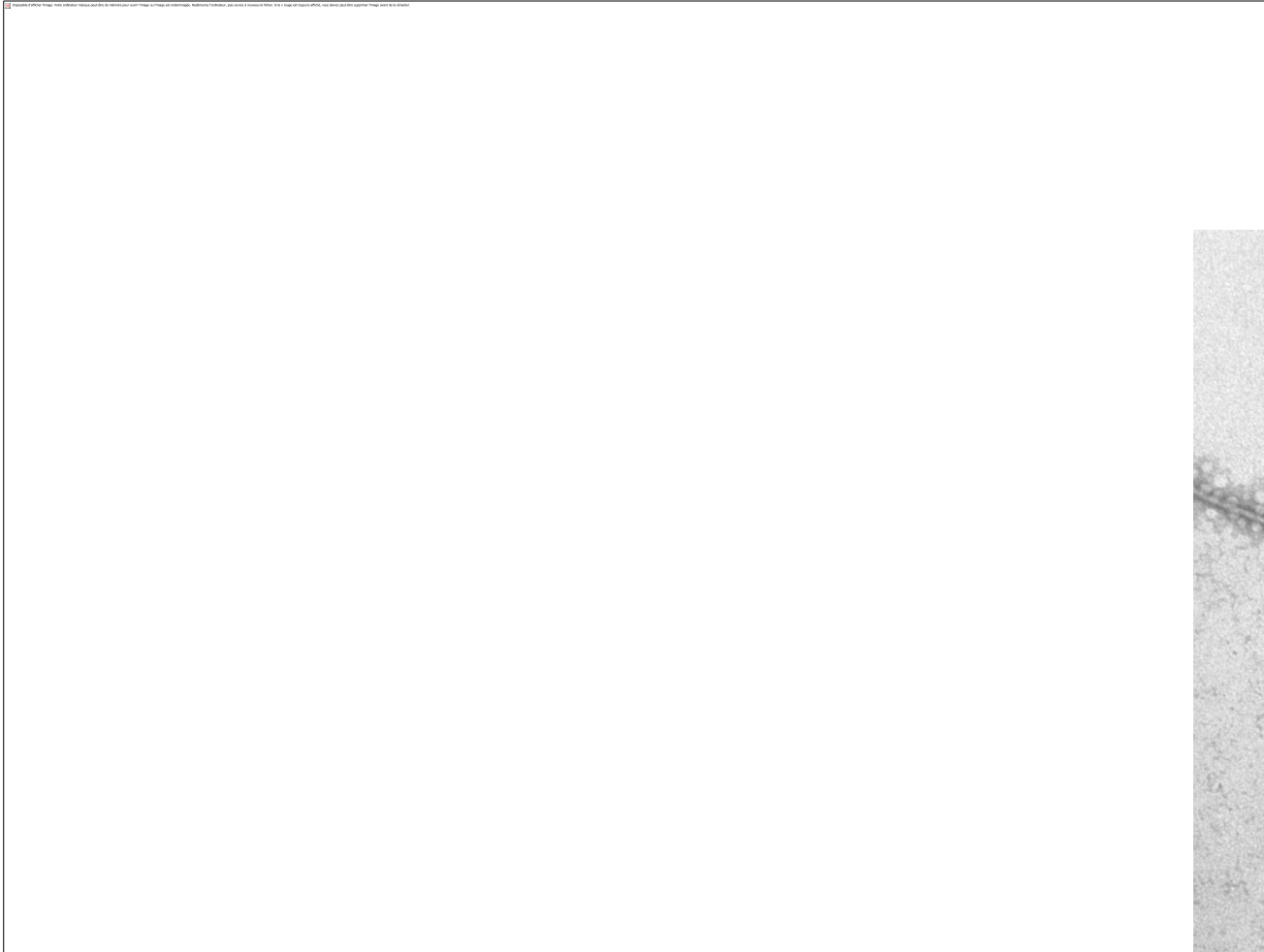
➤ Toutefois une fraction des bactéries semblent reconnues...



Hyp: marquage lié à l'expression d'une structure exprimée par une fraction des souches et émergeant de la surface des bactéries

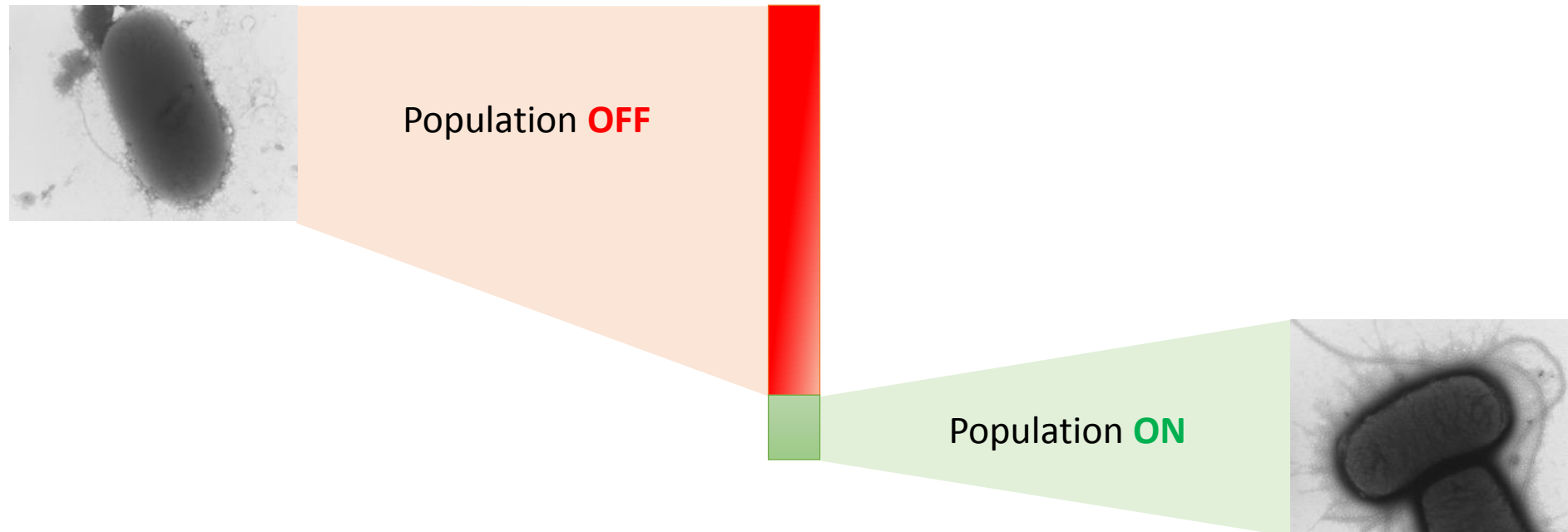
Fimbriae de type 1 ?

➤ Les fimbriae de type 1

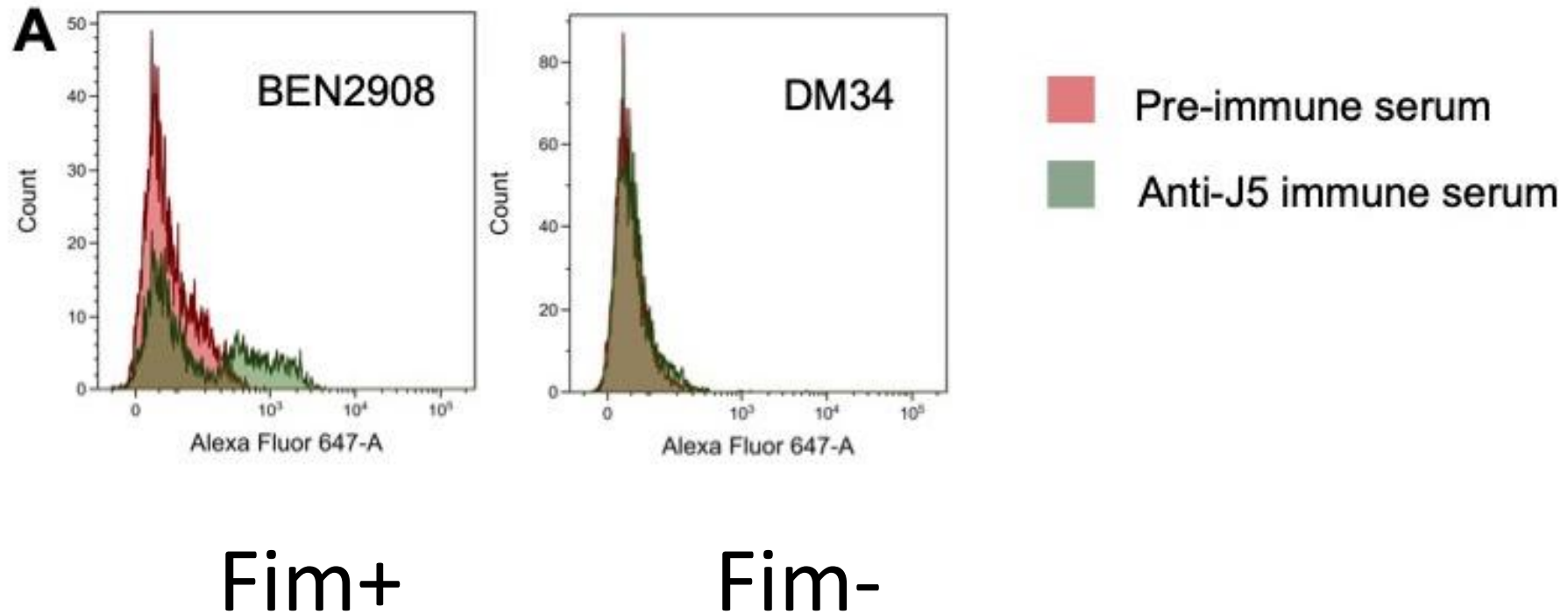


➤ Particularités des fimbriae de type 1

- Ils sont exprimés par une fraction seulement des bactéries au sein d'une culture

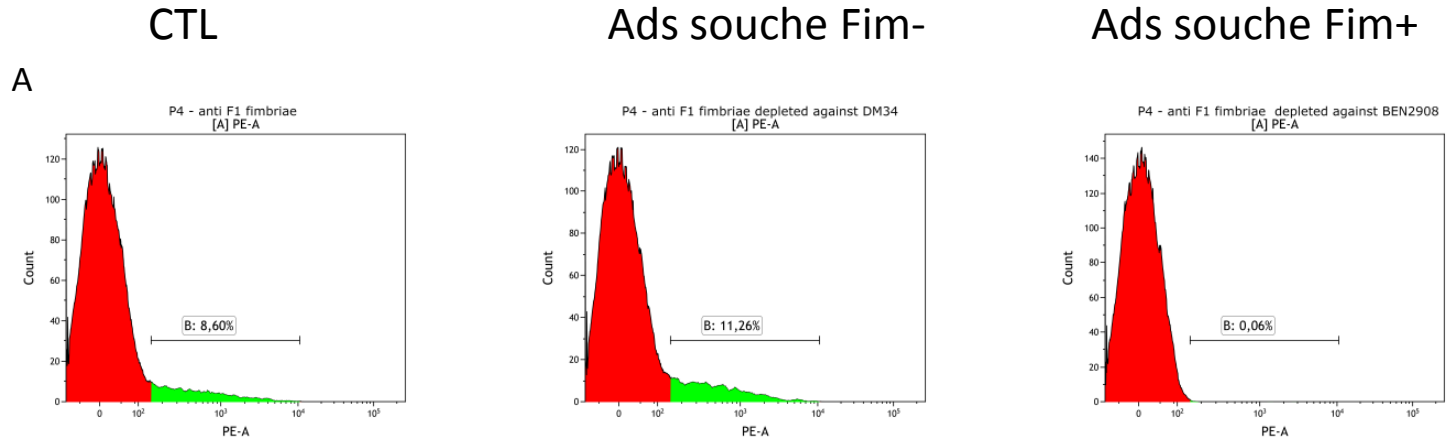


➤ Le serum anti-J5 contient-il des anticorps anti-F1 ?



➤ Oui, le serum anti-J5 contient des anticorps anti-fimbriae de type 1

➤ Confirmation: marquage de la souche P4 par des anticorps anti-J5 ou anti-fimbriae type 1 adsorbés avec une souche Fim + ou Fim -



Souche P4 « smooth »
Serum anti-F1 adsorbé

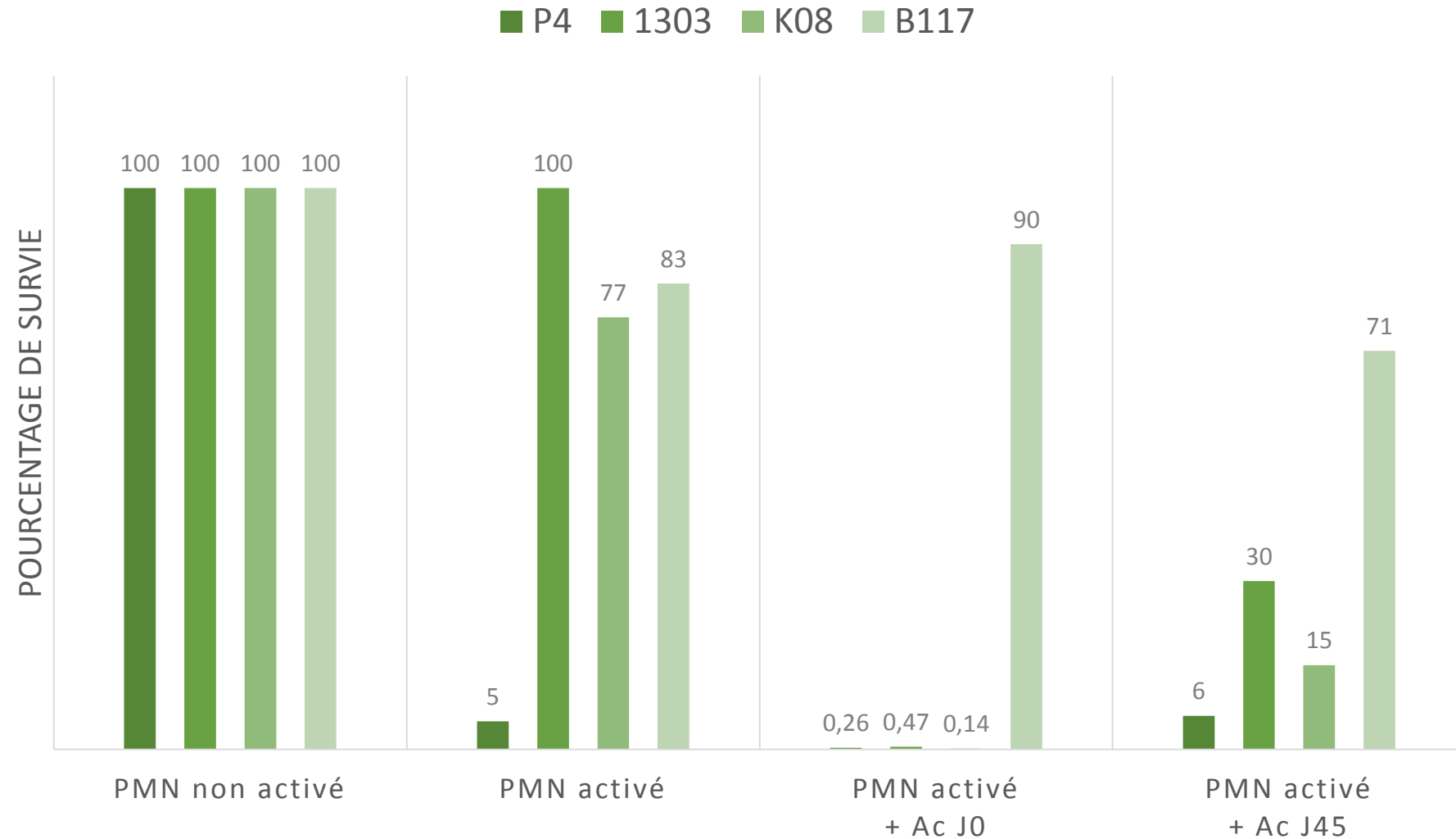
➤ Perte du marquage si adsorption avec souche Fim+ mais pas Fim -

- Un sérum anti-J5 reconnaît les souches « rough » dépourvues d'antigène O
- Mais reconnaissance réduite des souches « smooth »
 - avec marquage d'une fraction des souches « smooth » avec antigène O
- La fraction des bactéries « smooth » reconnues par le sérum anti-J5 sont celles qui expriment des fimbriae de type 1
 - Le sérum anti-J5 contient des anticorps anti-fimbriae de type 1 mais ne marque pas une souche Fim-
 - Perte du marquage d'une souche « smooth » si adsorption avec souche Fim+ mais pas Fim –
- Les anticorps induits par la vaccination anti-J5 ne permettent de reconnaître que les bactéries Fim+ des souches smooth

➤ Est-ce que ces anticorps améliorent l'élimination des bactéries ?

Test de phagocytose

- Bactéries
- PMN
- serum pre-colostral (source de complément – activation des neutrophiles)
- serum anti-J5 (D0 ou D45)



INRAE

Rencontre Op+lait

18/10/2022 – P. Germon

Rainard, P., M. Reperant-Ferter, C. Gitton and P. Germon (2021). *mSphere* 6(1)



- Un sérum anti-J5 reconnaît les souches « rough » dépourvues d'antigène O
- Mais reconnaissance réduite des souches « smooth »
- Les antigènes de surface des souches « rough » reconnus par le sérum anti-J5 ne sont pas accessibles dans une souche « smooth »
- La fraction des bactéries « smooth » reconnues par le sérum anti-J5 sont celles qui expriment des fimbriae de type 1
- Les anticorps induits par la vaccination anti-J5 ne permettent de reconnaître que les bactéries Fim+ des souches smooth
- **Les anticorps induits par la vaccination J5 n'améliorent pas la bactéricidie par les neutrophiles**



- Les anticorps induits par la vaccination J5 n'améliorent pas la bactéricidie par les neutrophiles
- Les suites :
 - Pour améliorer la vaccination contre les mammites à *E. coli*, cibler la réponse cellulaire
 - notamment la réponse Th17 – Rainard et al. 2022
 - Caractérisation des antigènes : recherche d'épitopes T ?
 - Voie locale ?
 - Validité pour les autres pathogènes ?

➤ Vers une amélioration de la caractérisation des cellules du lait

- Aujourd'hui le suivi du statut de la mamelle
 - SCC= toutes les cellules du lait
 - Amélioration DSCC = pourcentage PMN+Lc
- Peut-on encore affiner en étudiant la **fonctionnalité** des cellules du lait ?



➤ Les macrophages du lait

Problématique: comment récupérer toutes les cellules du lait pour une analyse fiable

Publication	Définition d'une glande mammaire saine	Technique utilisée	% Macrophages	% Lymphocytes	% Neutrophiles	% Cellules épithéliales
Miller et al. 1991	Bactériologie négative	Microscopie	30	24	26	19
Vangroenweghe et al. 2001	Bactériologie négative SCC < 200 000 cellules/mL	Microscopie	34,8 ± 7,3	6,8 ± 1,8	58,7 ± 7,3	ND
Leitner et al. 2000	SCC < 100 000 cellules/mL	Cytométrie en flux	13 ± 2	11 ± 2	28 ± 3	45 ± 25
Dosogne et al. 2003	Bactériologie négative SCC < 200 000 cellules/mL	Cytométrie en flux	9 ± 1	58 ± 3	28 ± 2	ND
Leitner et al. 2003	SCC ≤ 58 000 cellules/mL	Cytométrie en flux	0	7	32 ± 4	61 ± 5
Koess et al. 2007	SCC < 50 000 cellules/mL	Cytométrie en flux	42,5 ± 11,1	25,9 ± 6,8	30,5 ± 11,8	3,1 ± 1,2
Lozada et al. 2020	Bactériologie négative	Qscout	23	23	55	ND

Rambault *et al.* Bulletin des GTV. 2021

➤ Comparaison de deux méthodes de récupération



Choix 2
quartiers par
vache (A et B)
5 répétitions

Lait
A = Faible en cellules
20 000 à 90 000C/mL
B = Concentré en
cellules
130 000 à 3 200 000C/mL



Cellules
centrifugées

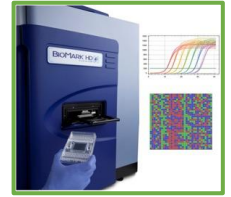


Cellules triées

Cytométrie



RT-qPCR



CD45+ CD3+
CD45+ CD14+
CD45+ G1+

Lc T
MP
PMN



➤ Identification et purification des cellules du lait par cytométrie

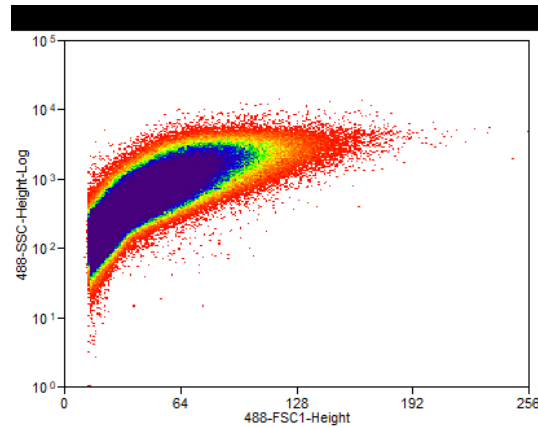
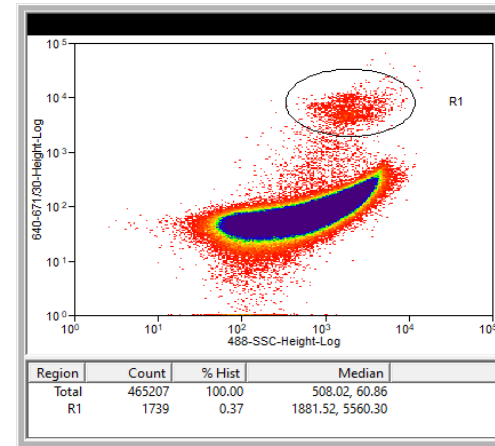
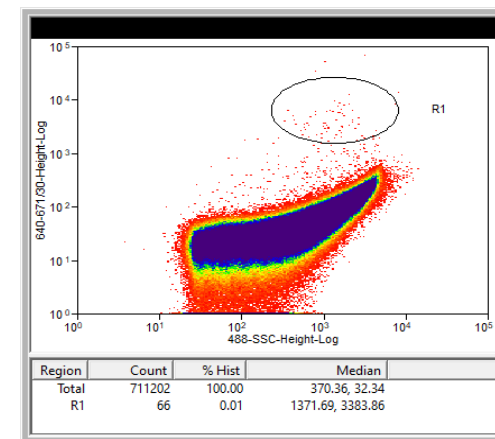
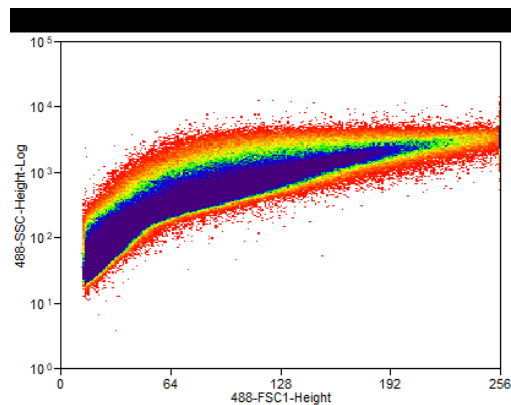


Diagramme FSC-SSC



Quartier riche en cellules

Diagramme FSC- fluorescence rouge Vybrant Ruby

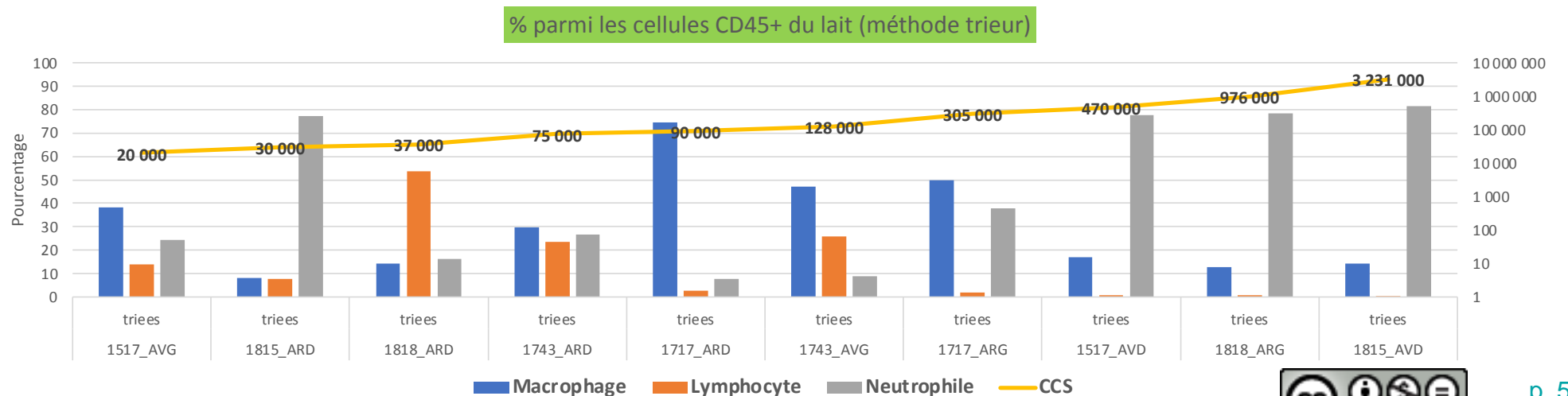
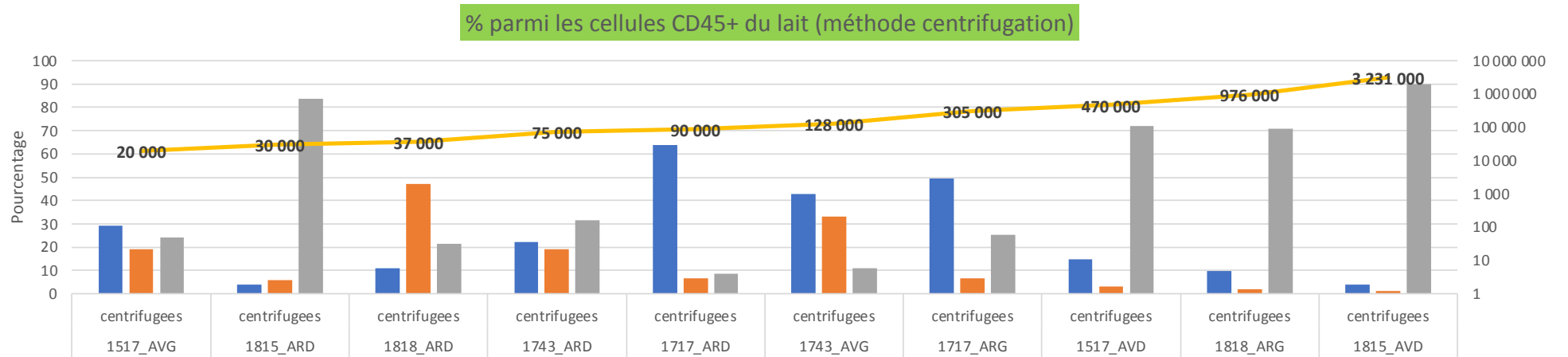


Quartier pauvre en cellules

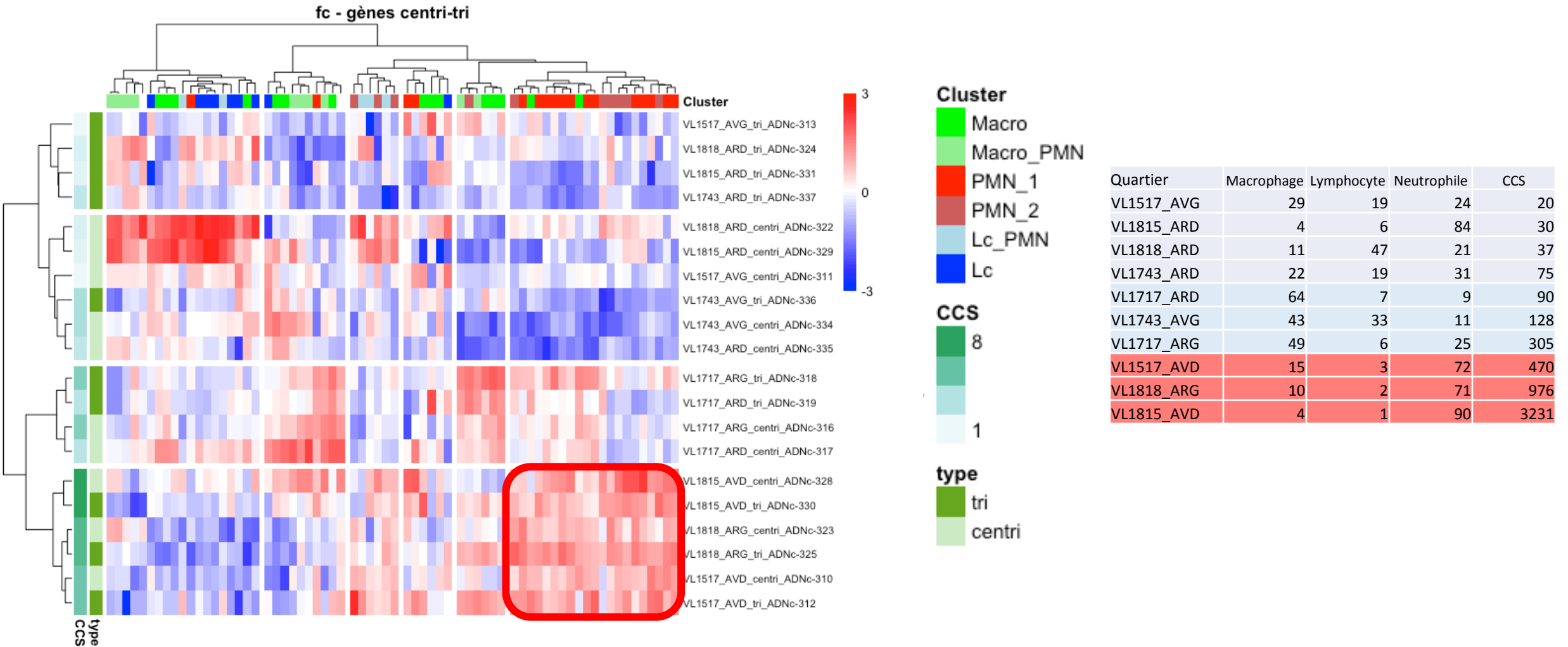


➤ Impact de la méthode de récupération des cellules du lait

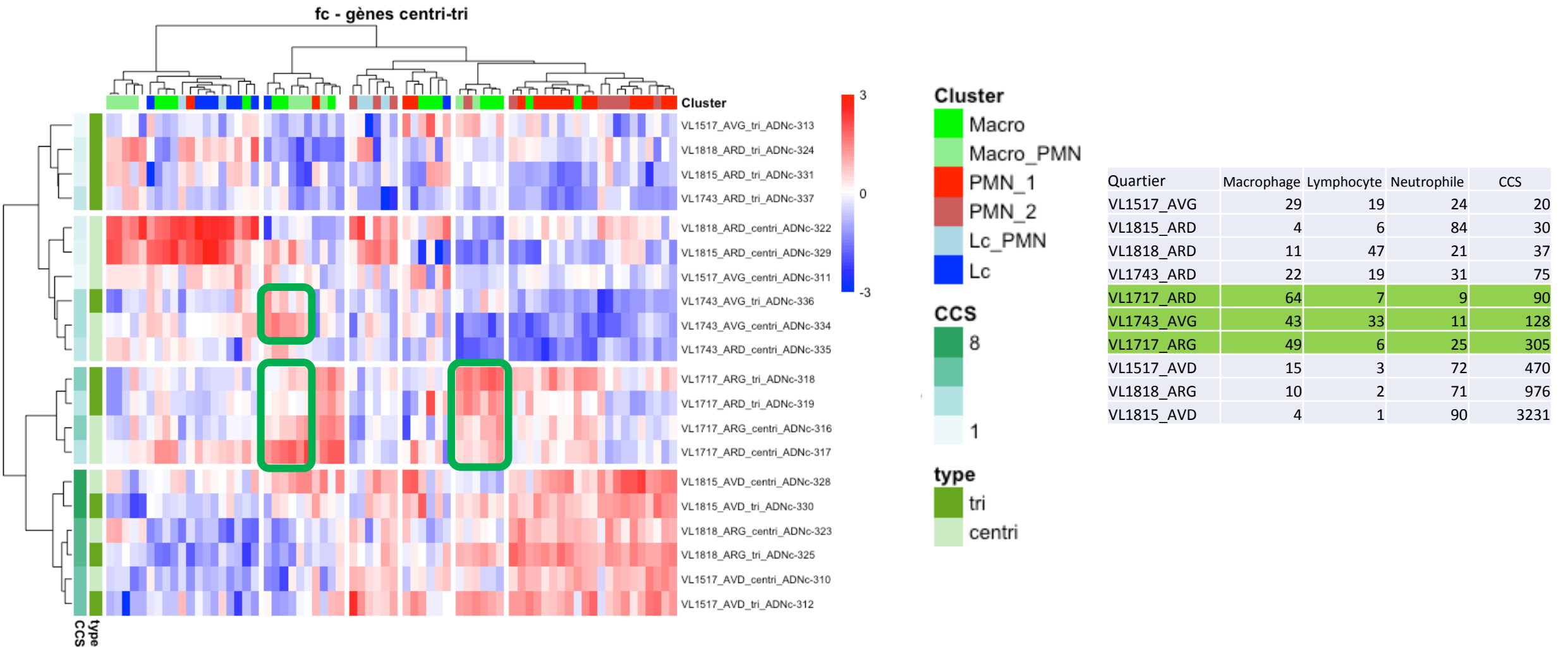
- Proportion des différentes populations cellulaires récupérées



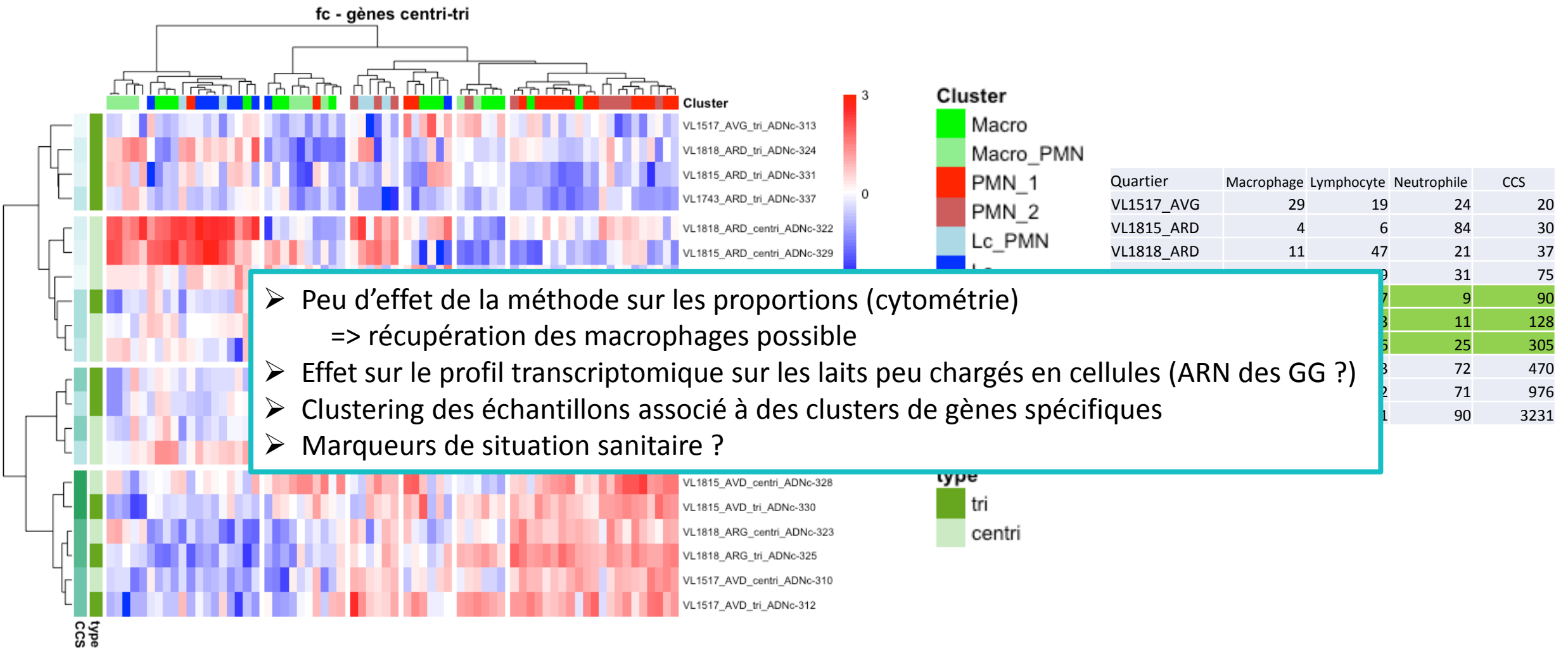
➤ Mise en évidence de profils caractéristiques de statuts inflammatoires



➤ Mise en évidence de profils caractéristiques de statuts inflammatoires



➤ Mise en évidence de profils caractéristiques de statuts inflammatoires



- Peu d'effet de la méthode sur les proportions (cytométrie)
=> récupération des macrophages possible
- Effet sur le profil transcriptomique sur les laits peu chargés en cellules (ARN des GG ?)
- Clustering des échantillons associé à des clusters de gènes spécifiques
- Marqueurs de situation sanitaire ?

> Remerciements



Equipe IBIR

Pascal Rainard
Mégane Védrine
Florence Gilbert
Maryline Ferter
Perrine Roussel
Christophe Gitton
Emilie Doz-Deblauwe
Rodrigo Prado Martins
Marion Rambault
Camille Berthault
Cindy Leroux
Patricia Cunha
Aude Remot
Nathalie Winter

INRAE – PGBA

Sébastien Leclercq

INRAE - CIRM

Florent Kempf
Cindy Slugocki
Emmanuelle Helloin

INRAE - Domaine
expérimental du Pin au Haras

Sarah Barbey
Frédéric Launay

INRAE - Plateforme
d'Infectiologie
Expérimentale

Vanaïque Guillory
Corinne Beaugé
Rémi Delaunay
Arnaud Faurie
Guillaume Martin
Anne Pinard

INRAE - « Mathématiques et
Informatique Appliquées de
Toulouse »

Christophe Klopp
Sarah Maman-Haddad

Institut Pasteur

Jean-Marc Chigi



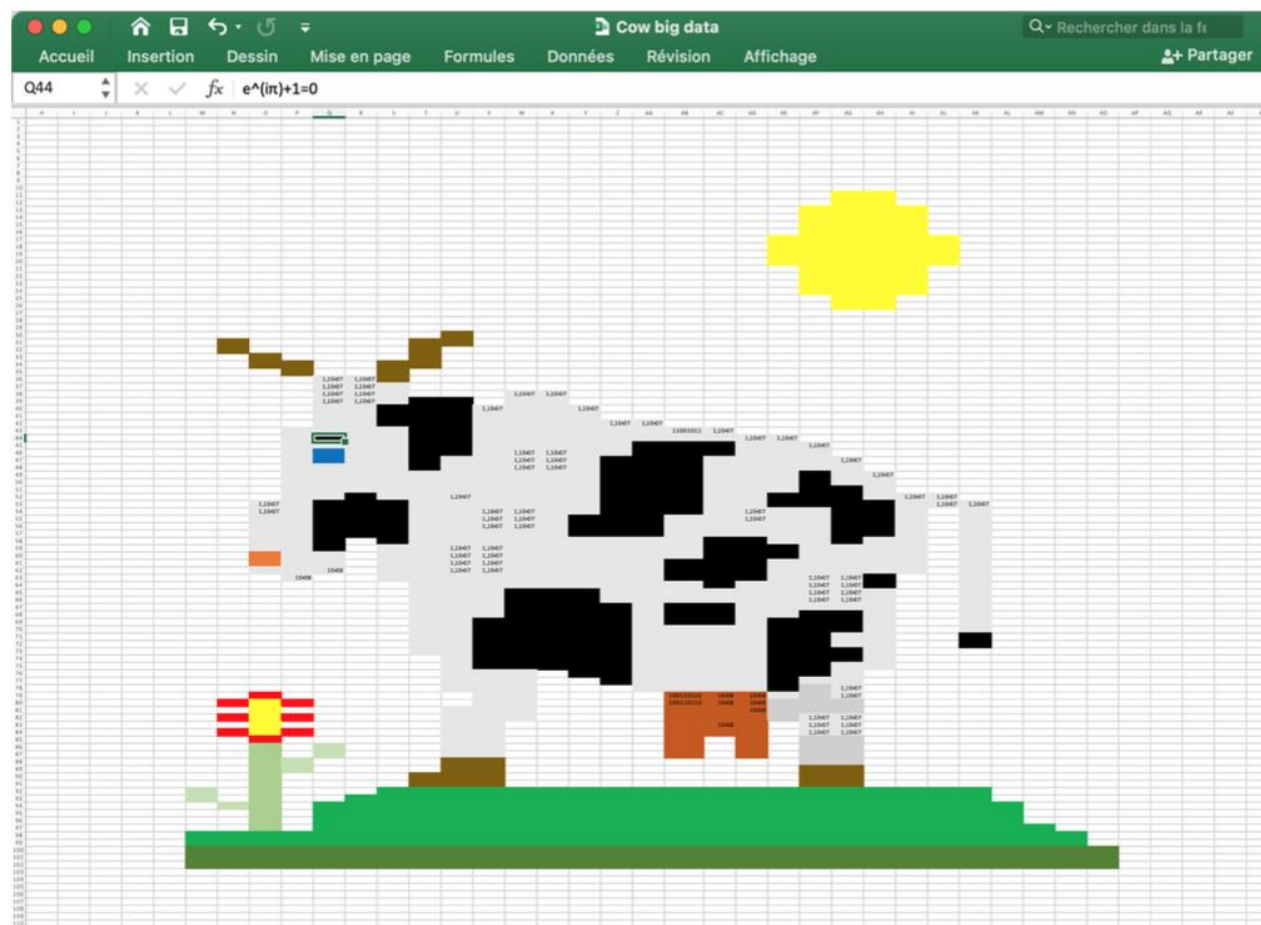
INRAE

Rencontre Op+lait

18/10/2022 – P. Germon

"Glande mammaire lait" / Galactinnov

7-8 novembre 2022
Institut Agro Rennes-Angers
Campus de Rennes



INRAE

Rencontre Op+lait

18/10/2022 – P. Germon

