



**HAL**  
open science

## Mammites bovines à *Escherichia coli* et *Streptococcus uberis*: quels rôles pour les cellules épithéliales et les macrophages dans le contrôle de l'infection?

Emilie Doz-Deblauwe, Rodrigo Prado Martins, Florence Gilbert, Maryline Ferter, Christophe Gitton, Dorian de Moura-Rodrigues, Pascal Rainard, Nathalie Winter, Pierre Germon

### ► To cite this version:

Emilie Doz-Deblauwe, Rodrigo Prado Martins, Florence Gilbert, Maryline Ferter, Christophe Gitton, et al.. Mammites bovines à *Escherichia coli* et *Streptococcus uberis*: quels rôles pour les cellules épithéliales et les macrophages dans le contrôle de l'infection?. Rencontre Galactinnov - Glандe mammaire, lait, Nov 2022, Rennes, France. hal-04181985

**HAL Id: hal-04181985**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04181985>**

Submitted on 16 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

## ➤ Mammmites bovines à *Escherichia coli* et *Streptococcus uberis* : quels rôles pour les cellules épithéliales et les macrophages dans le contrôle de l'infection?



Pierre Germon

UMR Infectiologie et Santé Publique

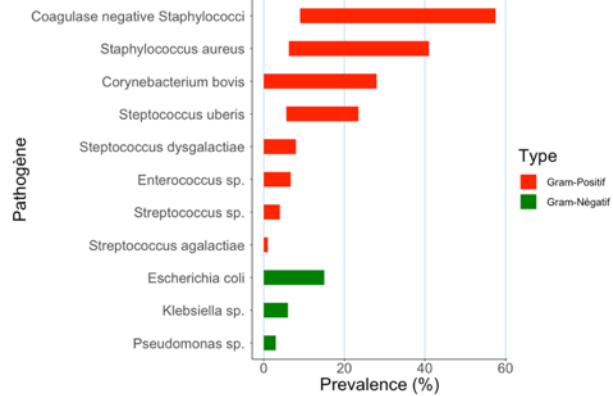
Equipe « Infections Bactériennes et Immunité des Ruminants



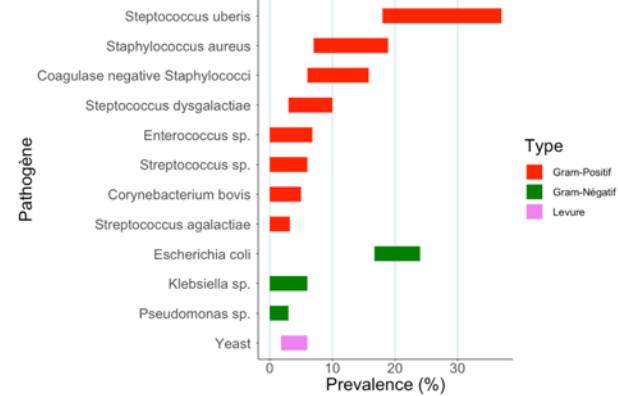
# ➤ Prévalence des pathogènes de mammites en France

Prévalence par catégorie de mammite (Poutrel 2019)

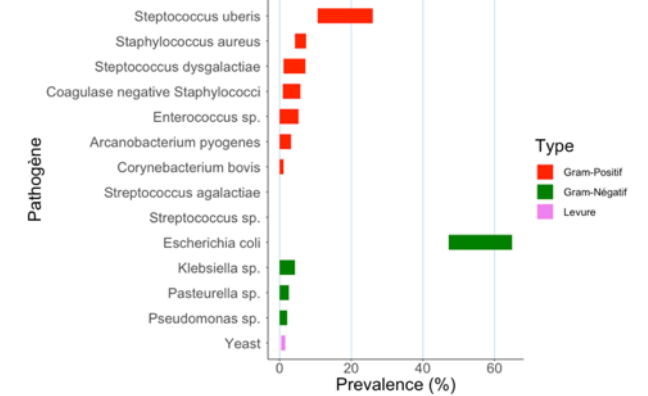
## Mammites subcliniques



## Mammites cliniques



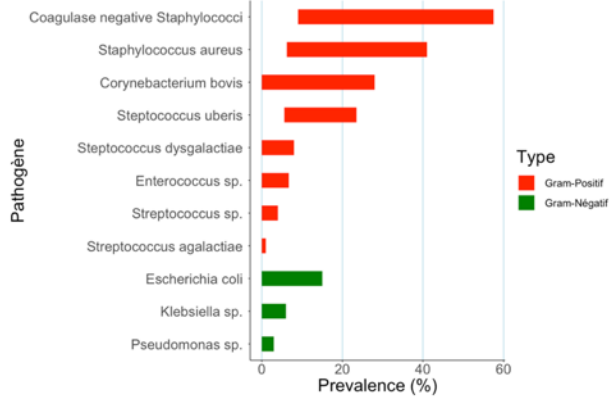
## Mammites cliniques aiguës



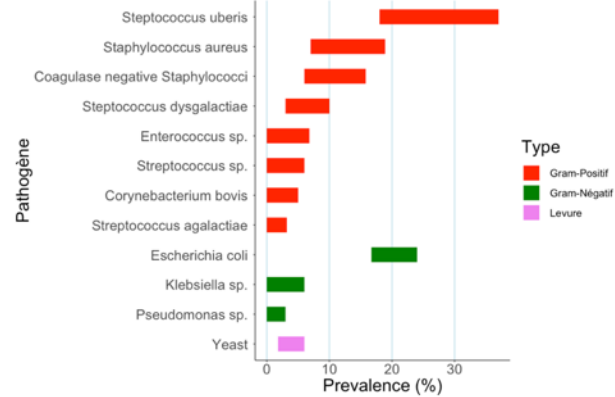
# ➤ Prévalence des pathogènes de mammites en France

Prévalence par catégorie de mammite (Poutrel 2019)

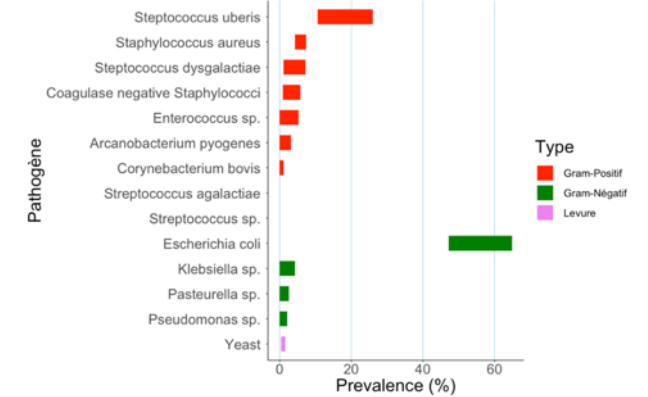
Mammites subcliniques



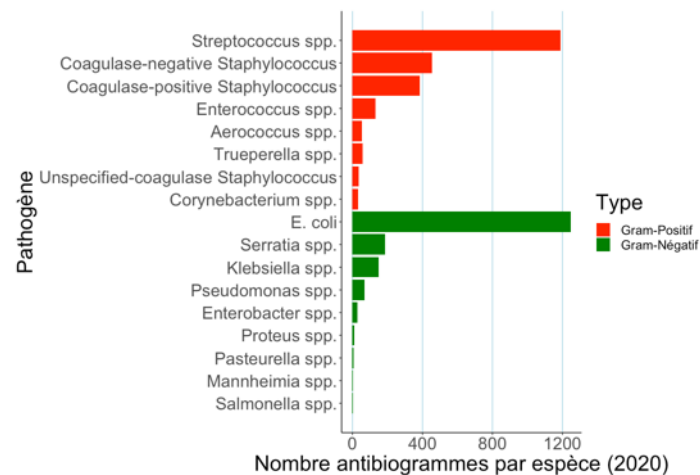
Mammites cliniques



Mammites cliniques aiguës



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

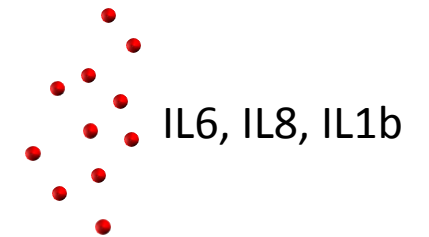
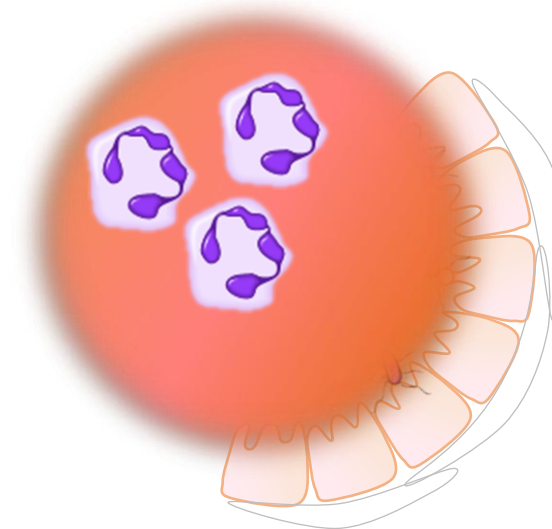
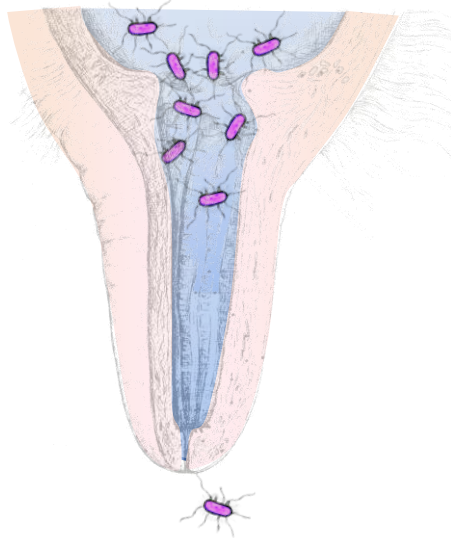
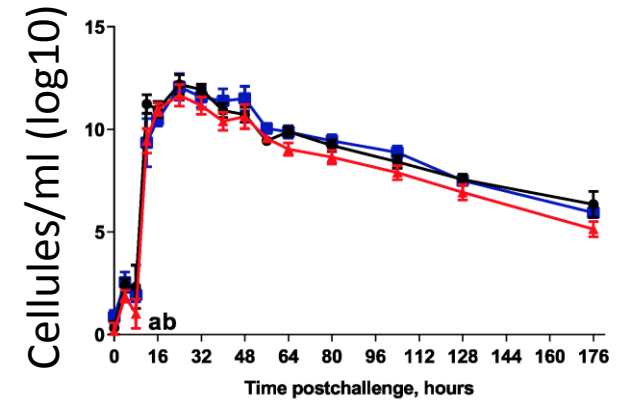
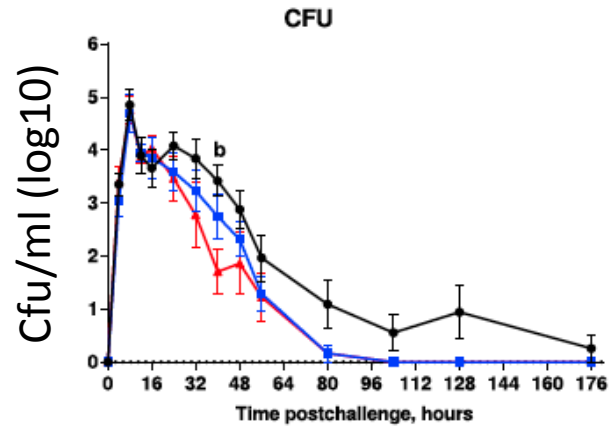


INRAE

08/11/2022 – P. Germon

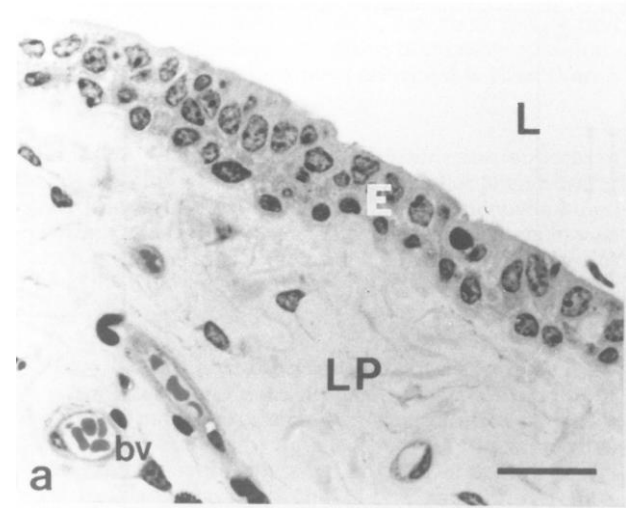
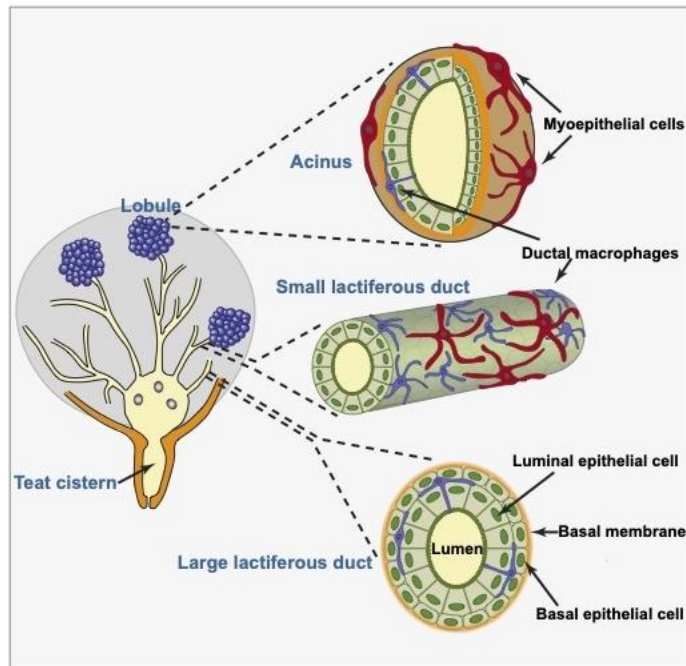


# ➤ Mammite = inflammation de la glande mammaire, en général d'origine bactérienne



## ➤ Les CEM dans l'initiation de la réponse de l'hôte

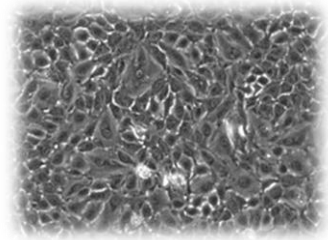
- Positionnement idéal pour initier une réponse rapide



Persson K. et al. (1992)  
Am J Vet Res 53:2235-  
2240

# ➤ Répertoire des motifs bactériens reconnus par les CEMs

In vitro : incubation de CEMs (cultures primaires) avec différents motifs bactériens (MAMPs)



Cellules épithéliales  
mammaires

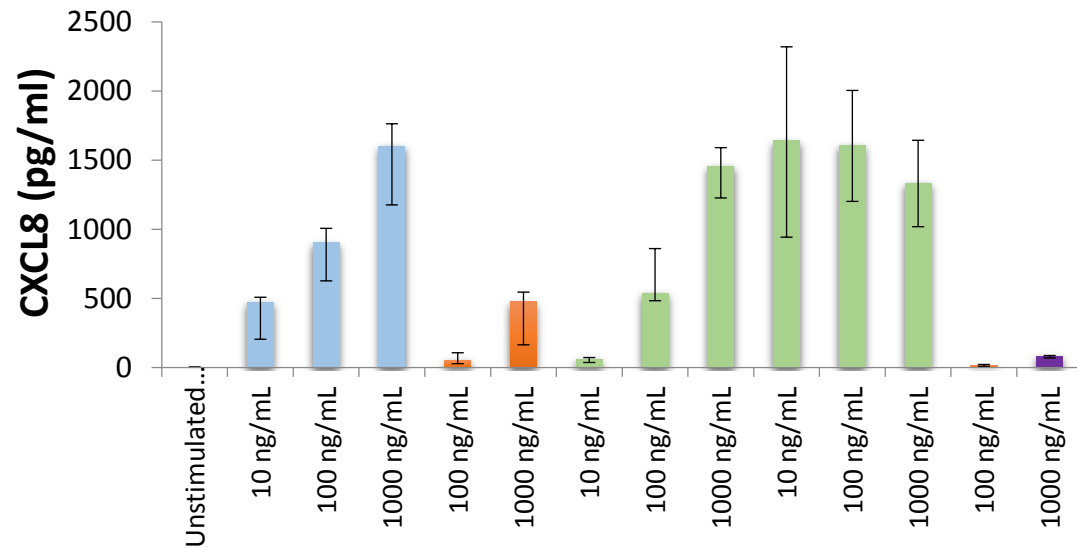
+ MAMPs purifiés

LPS

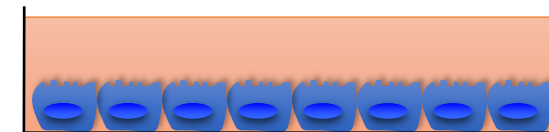
peptidoglycane

lipoprotéines

flagelline



5h



Dosage ELISA CXCL8

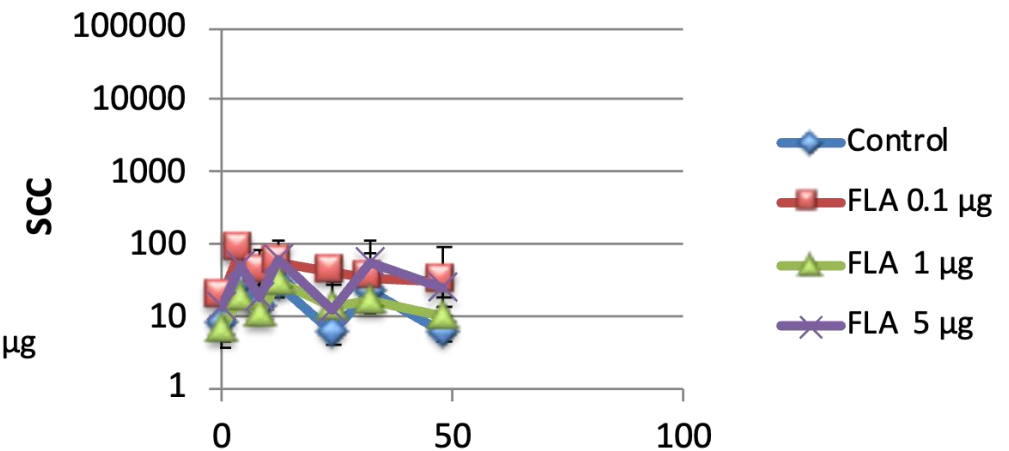
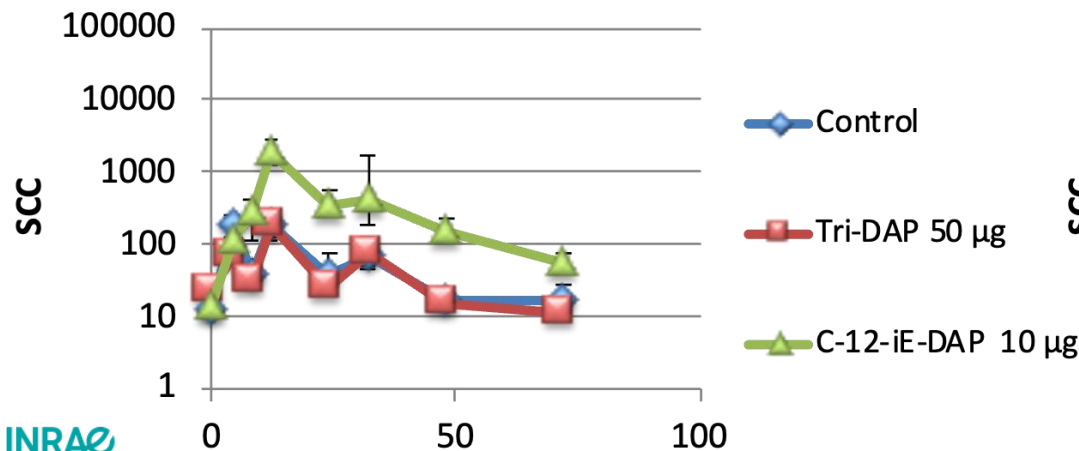
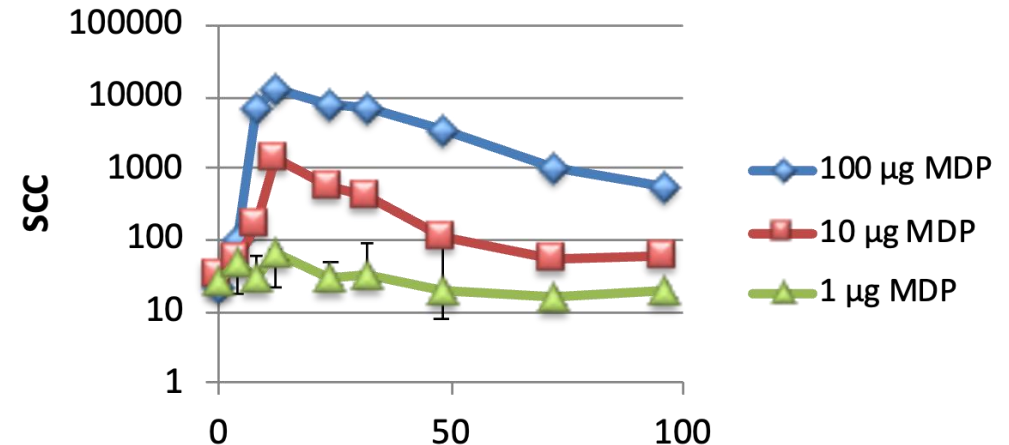
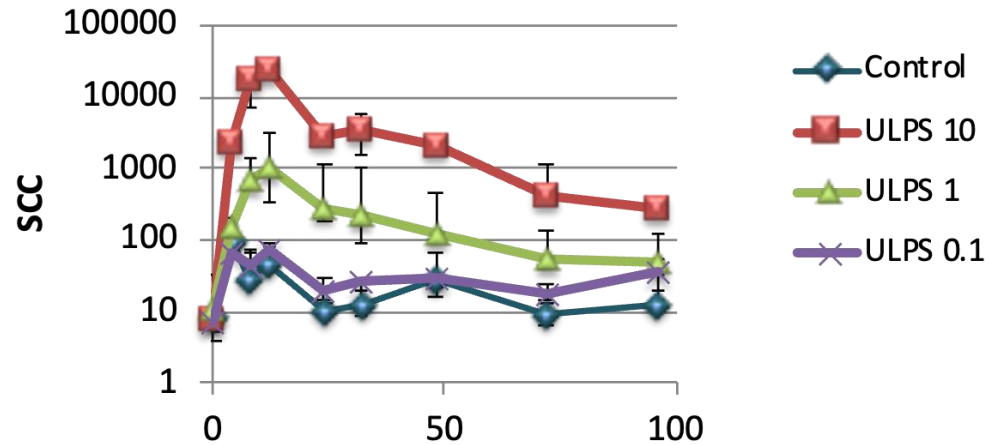
Agoniste	uLPS	C12-iE-DAP	Pam3CSK4	Pam2CSK4	MDP	Fla
Recepteur	TLR4	NOD1	TLR1/2	TLR2/6	NOD2	TLR5

Porcherie et al., Vet. Research, 2012, 43:14



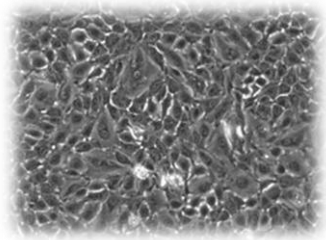
# ➤ Répertoire des MAMPs reconnus par la glande mammaire

In ubero : infusion de MAMPs dans la glande mammaire



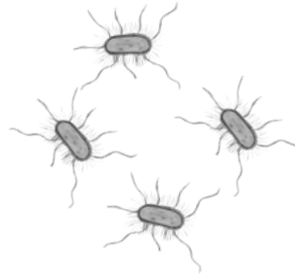


# ➤ Les CEMs répondent à une stimulation par E. coli

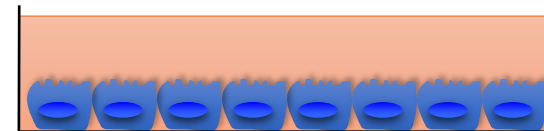


Lignée PS  
(cellules épithéliales  
mammaires)

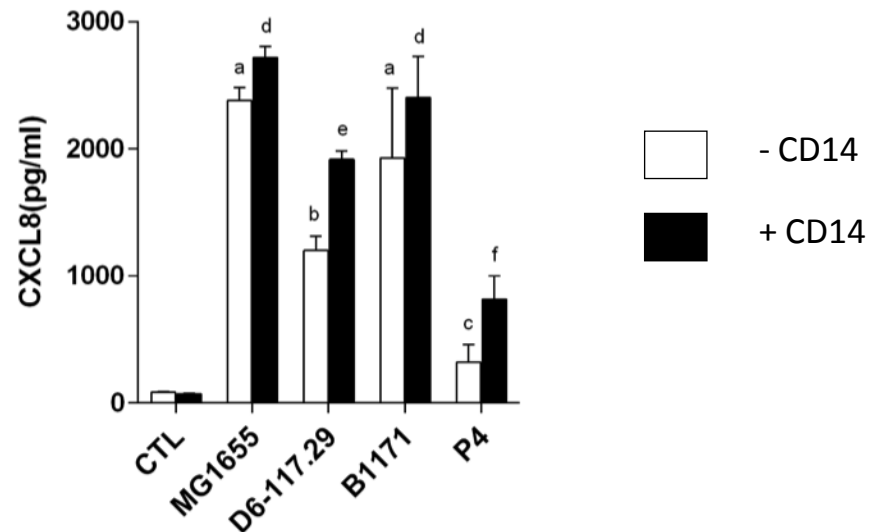
+



3h puis  
gentamycine  
21h

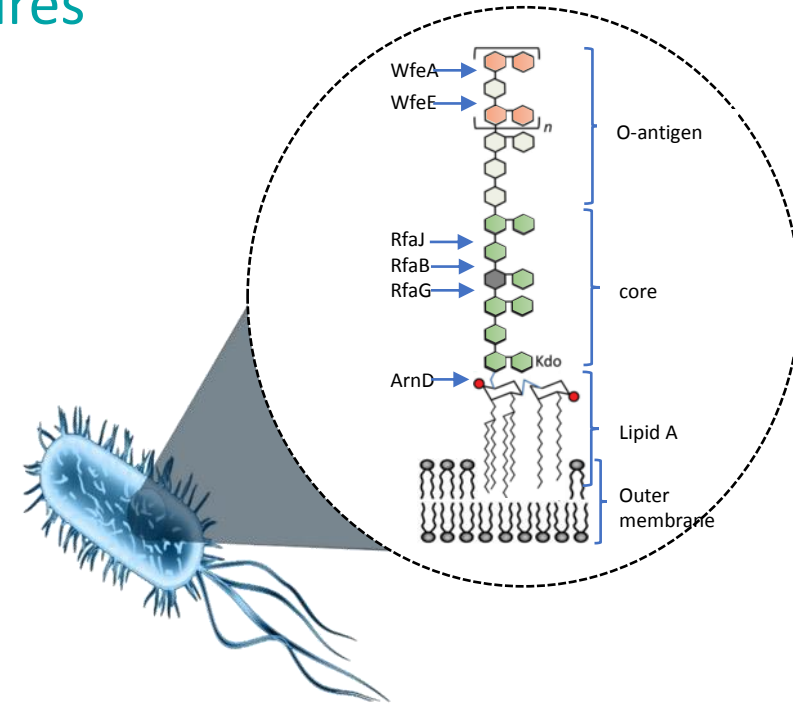
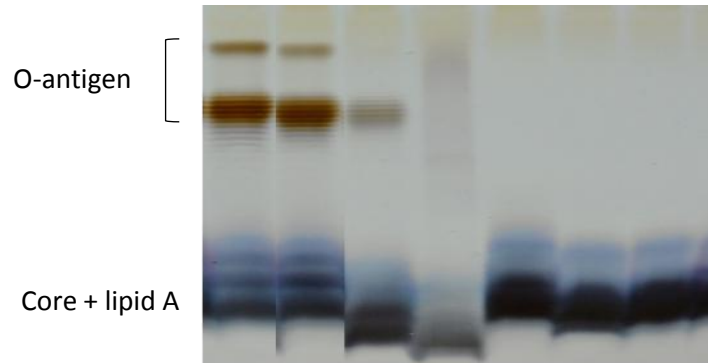
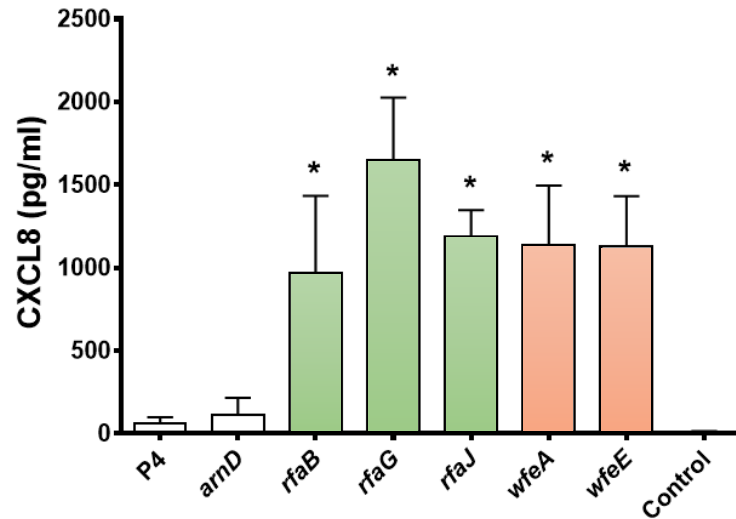


Dosage ELISA CXCL-8



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

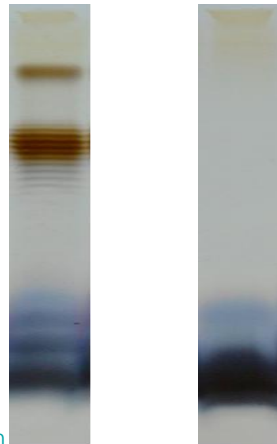
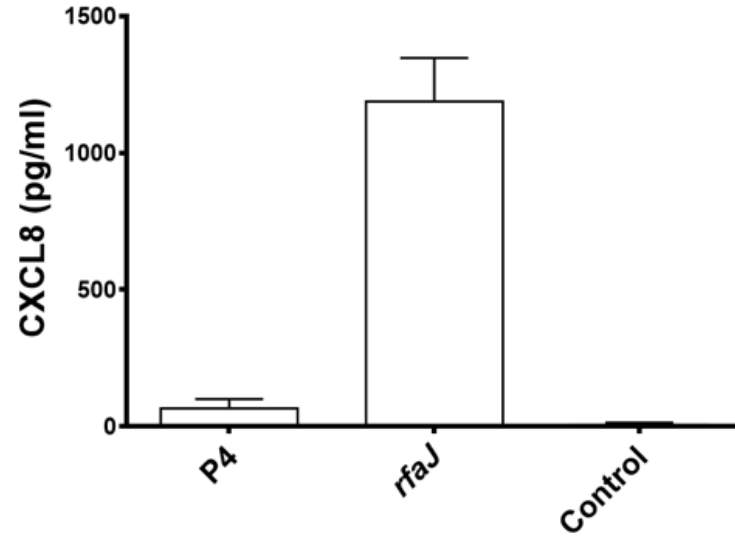
- Criblage d'une banque de mutants aléatoires



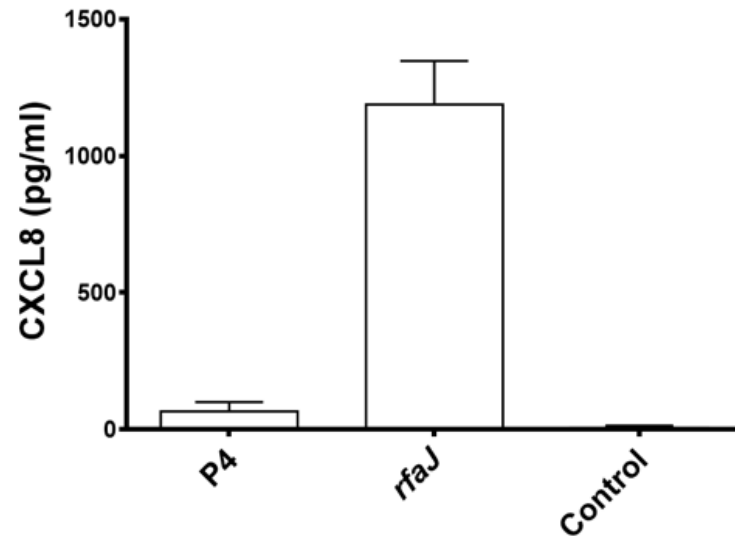
-> la plupart des mutants sont affectés dans la synthèse de l'antigène O

Vedrine *et al.* 2018

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



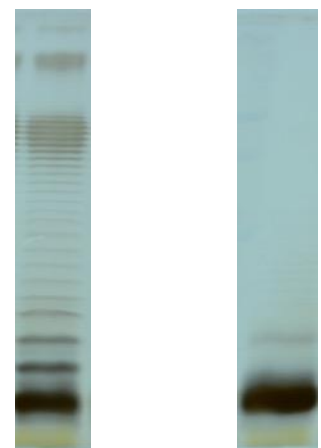
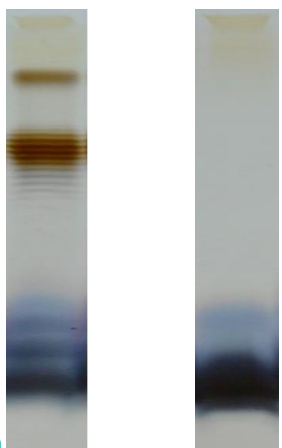
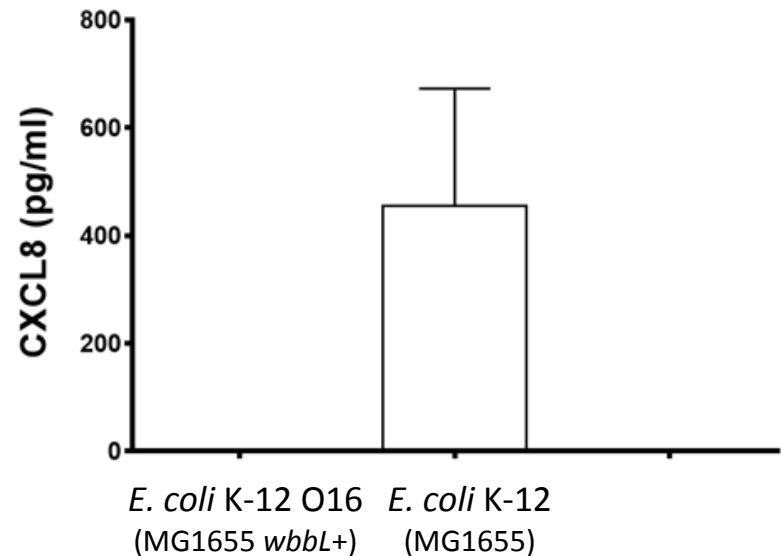
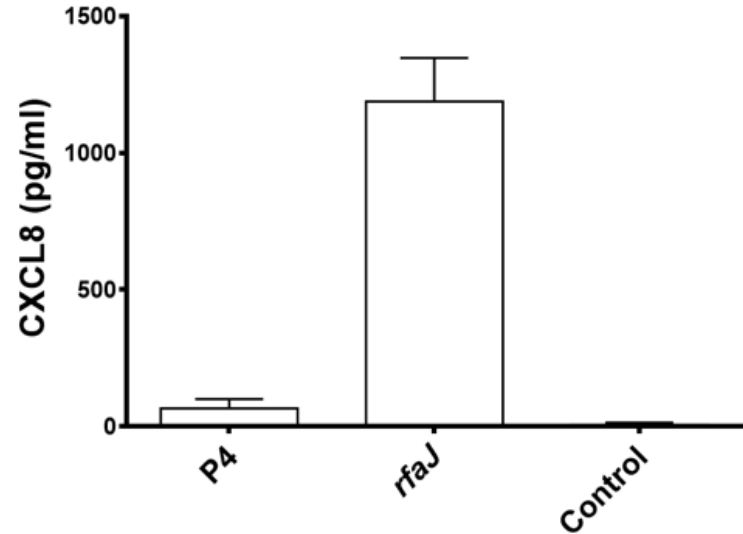
## ➤ La présence d'un antigène O réduit la réponse des CEM



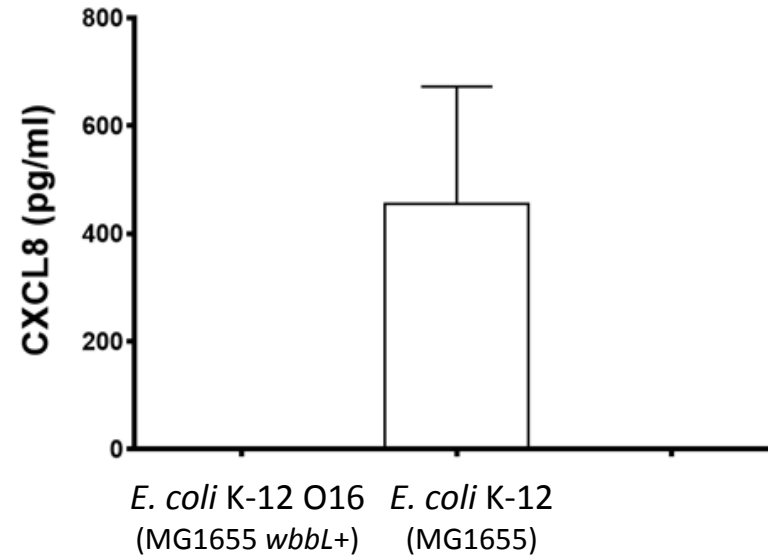
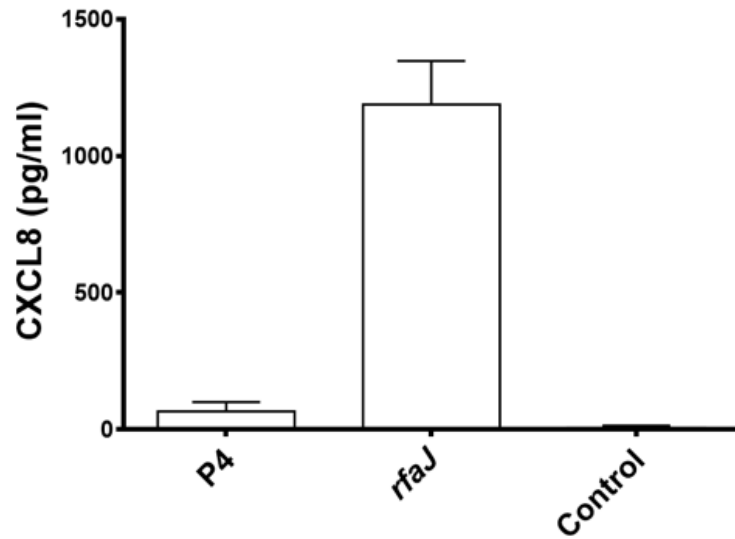
*E. coli* K-12 O16 (MG1655 *wbbL*+)    *E. coli* K-12 (MG1655)



## ➤ 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 in vitro



## ➤ Les CEM et la reconnaissance d'*E. coli*

- Les CEM sont capables de reconnaître différents motifs exprimés par *E. coli*, à l'exception notable de la flagelline
- La présence de l'antigène O altère la reconnaissance d'*E. coli* in vitro

# ➤ Les CEMs et la reconnaissance de *S. uberis*

Günther et al. *Vet Res* (2016) 47:13  
DOI 10.1186/s13567-015-0287-8

Veterinary Research

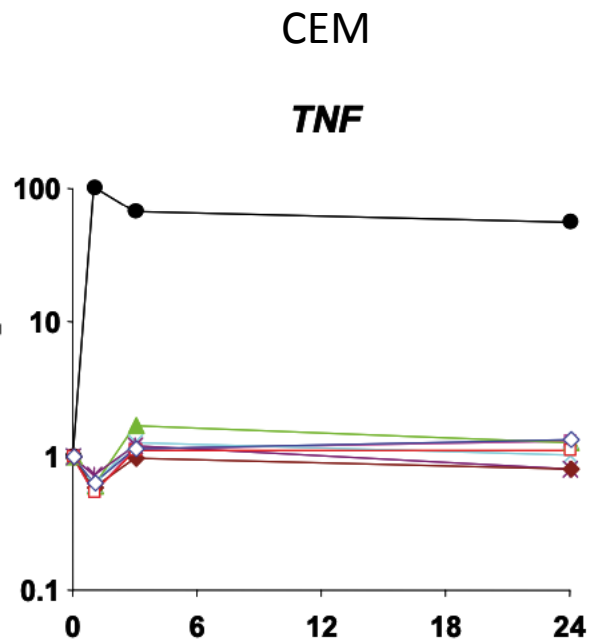
RESEARCH ARTICLE

Open Access



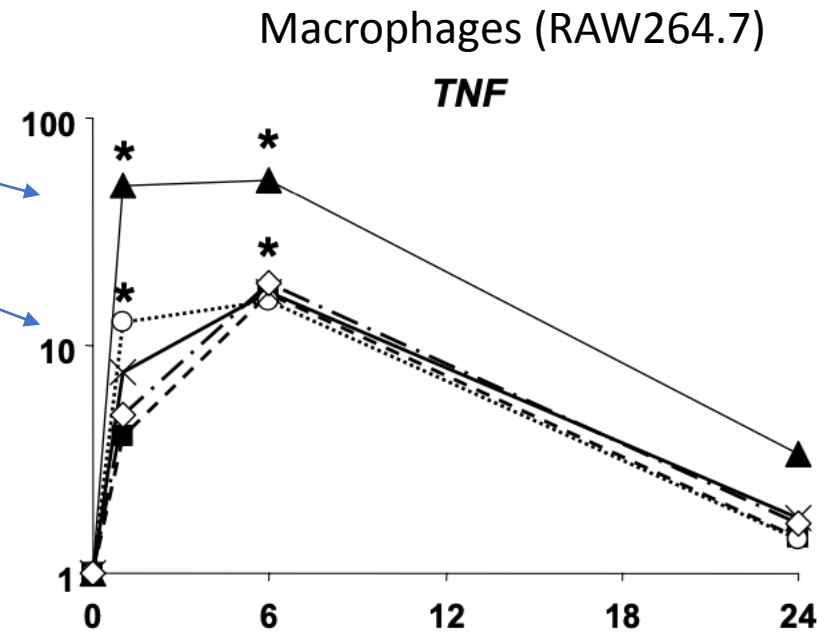
## *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages

Juliane Günther<sup>1</sup>, Anna Czabanska<sup>2</sup>, Isabel Bauer<sup>1</sup>, James A. Leigh<sup>3</sup>, Otto Holst<sup>2</sup> and Hans-Martin Seyfert<sup>1\*</sup>



*E. coli*

*S. uberis*



1





# ➤ Les CEMs et la reconnaissance de *S. uberis*

Günther et al. *Vet Res* (2016) 47:13  
DOI 10.1186/s13567-015-0287-8

Veterinary Research

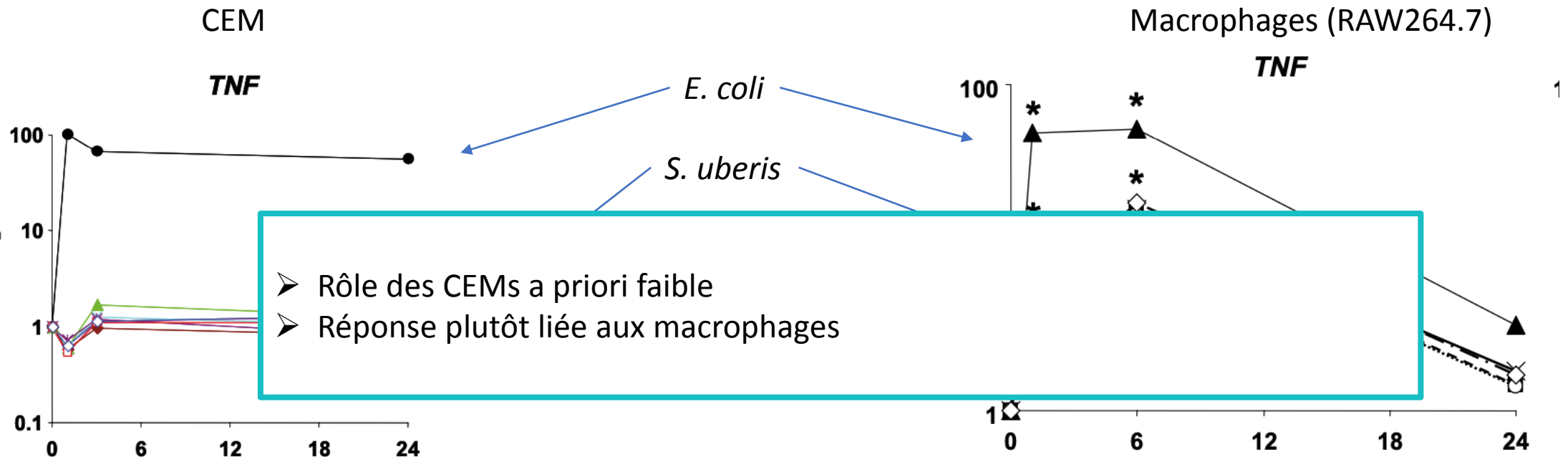
RESEARCH ARTICLE

Open Access



## *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages

Juliane Günther<sup>1</sup>, Anna Czabanska<sup>2</sup>, Isabel Bauer<sup>1</sup>, James A. Leigh<sup>3</sup>, Otto Holst<sup>2</sup> and Hans-Martin Seyfert<sup>1\*</sup>



## ➤ Modèle de mammite murine à *S. uberis*

### Souris C57BL/6

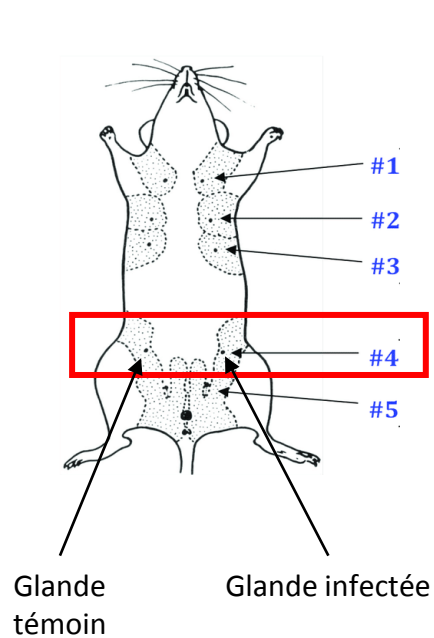
Infection: 7 jours post naissance

4h après retraits petits



Pour chaque animal, soit 50µL

- Glande droite : HBSS
- Glande gauche : *S.uberis* MC1 (10 000 CFU)



# ➤ Modèle de mammite murine à *S. uberis*

## Souris C57BL/6

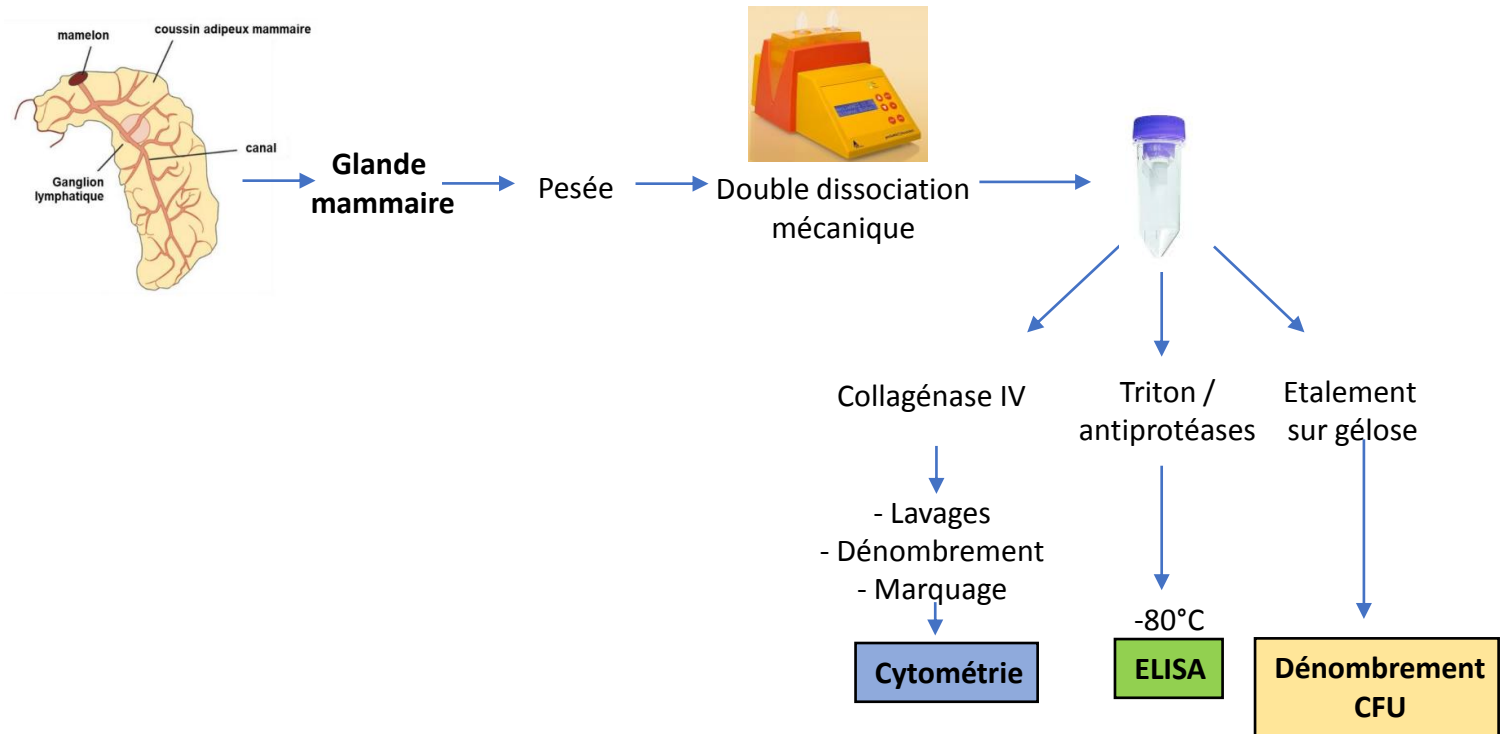
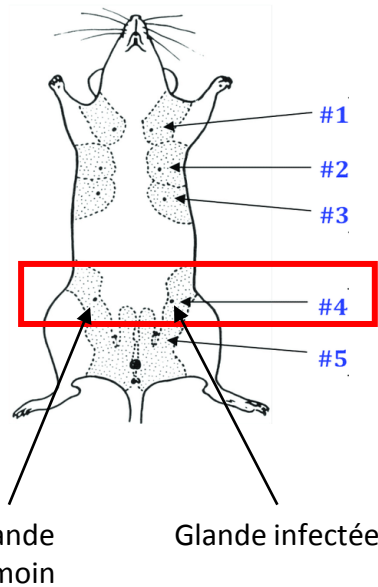
Infection: 7 jours post naissance

4h après retraits petits



Pour chaque animal, soit 50µL

- Glande droite : HBSS
- Glande gauche : *S.uberis* MC1 (10 000 CFU)



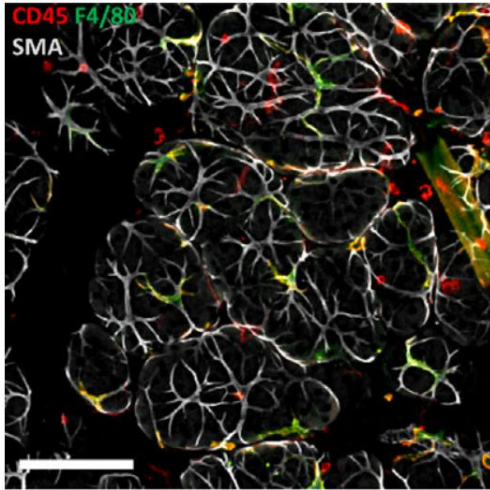
# ➤ Définition macrophages ductaux

D'après Hassel et al, 2021, Front Immunol

*Macrophages ductaux* = CD11c+/F4/80+/ CD11b low/MHCII+

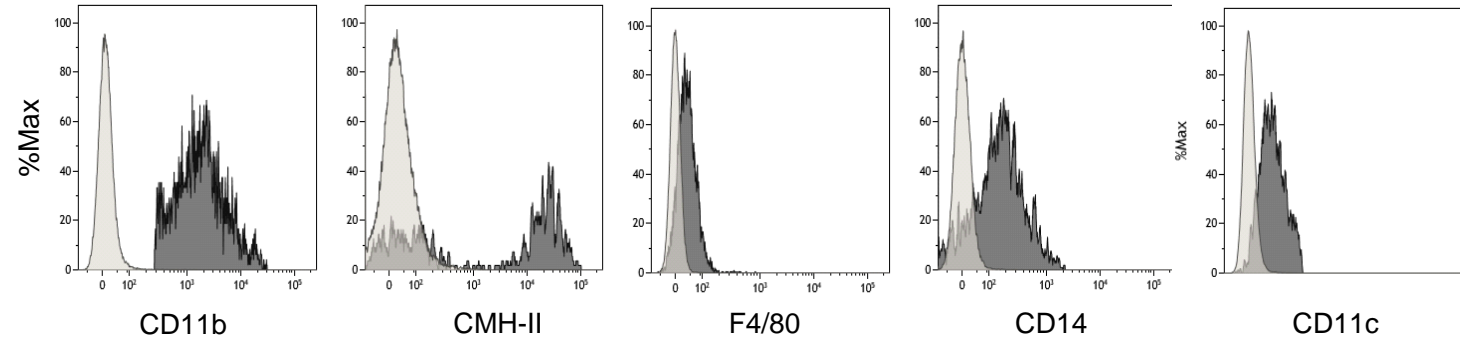
D'après Liegeois et al, 2018, Cell Immunol

*Macrophages recrutés* = CD11c low/F4/80 low/ CD11b +/MHCII++

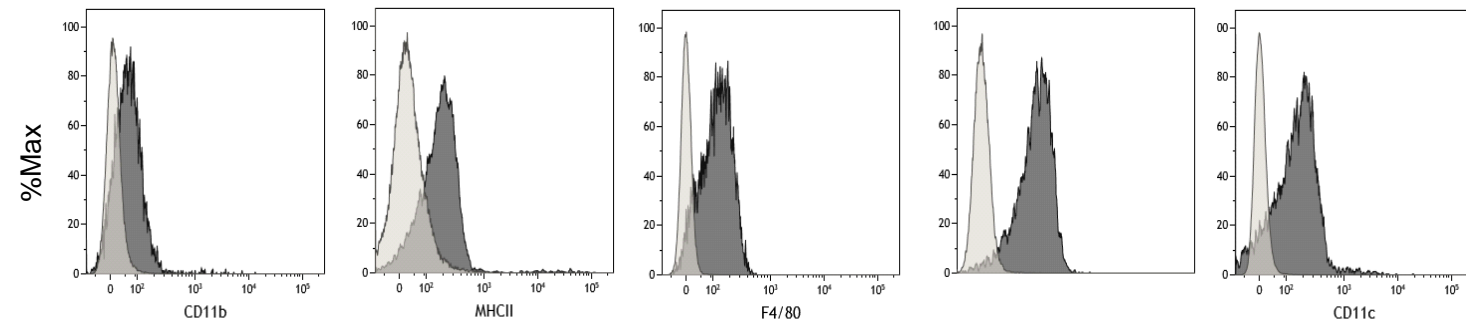


Hassel et al, 2021, Front Immunol

## Macrophages recrutés

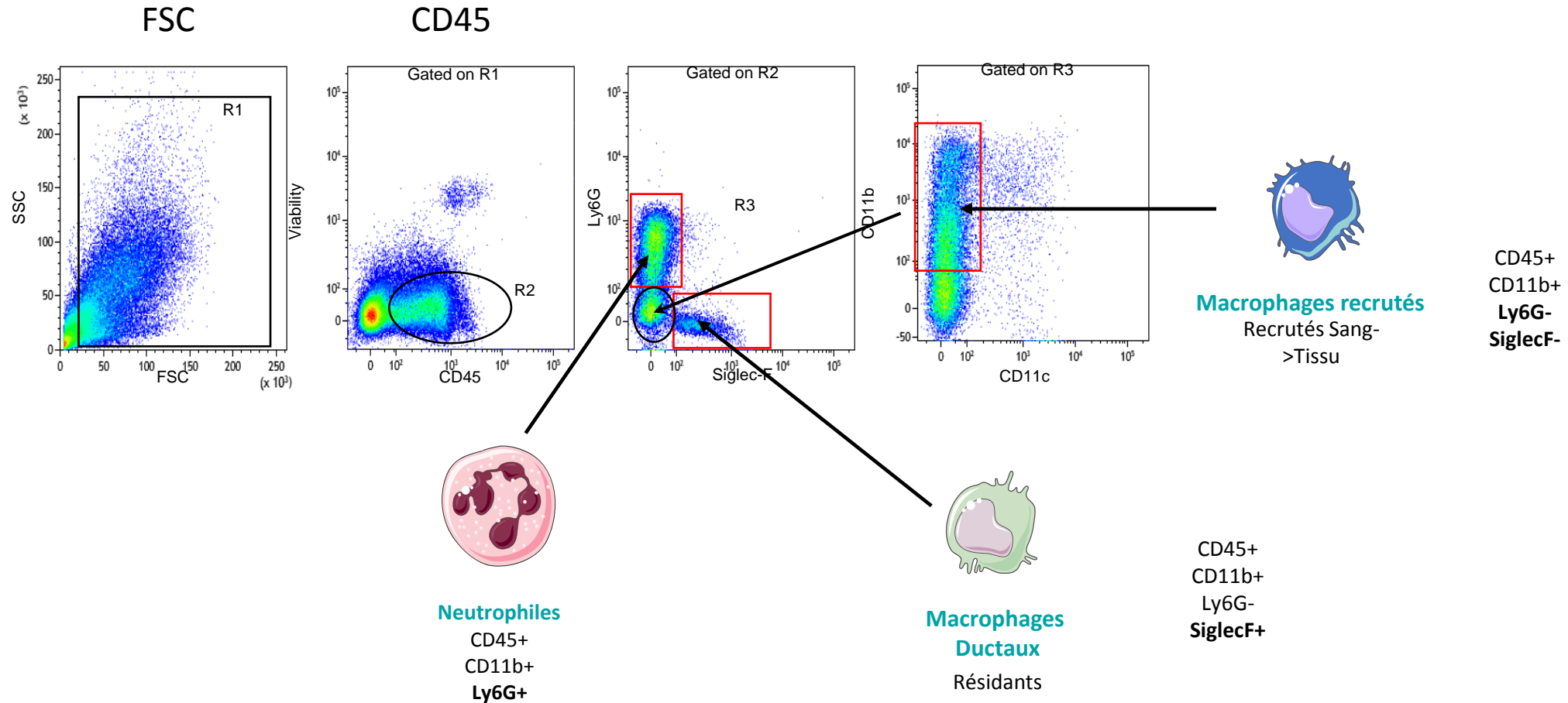


## Macrophages ductaux

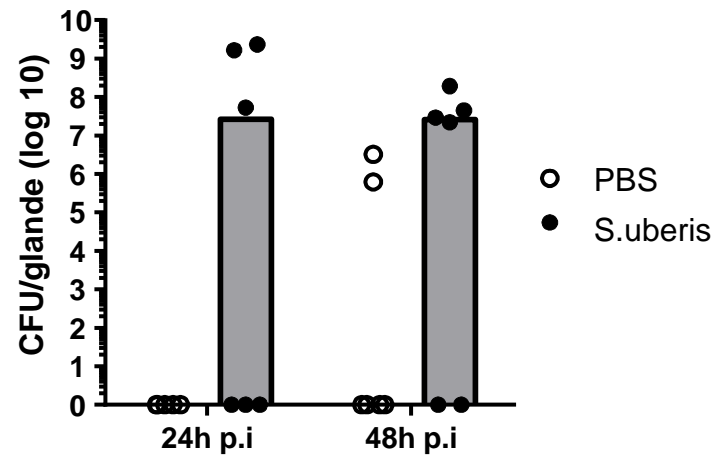


# ➤ Stratégie d'analyse des populations leucocytaires dans la glande mammaire

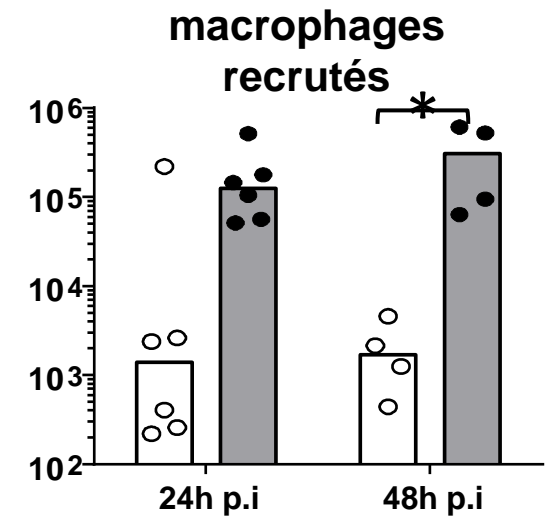
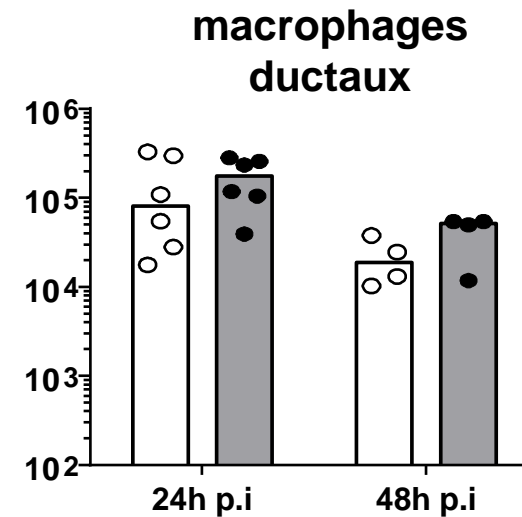
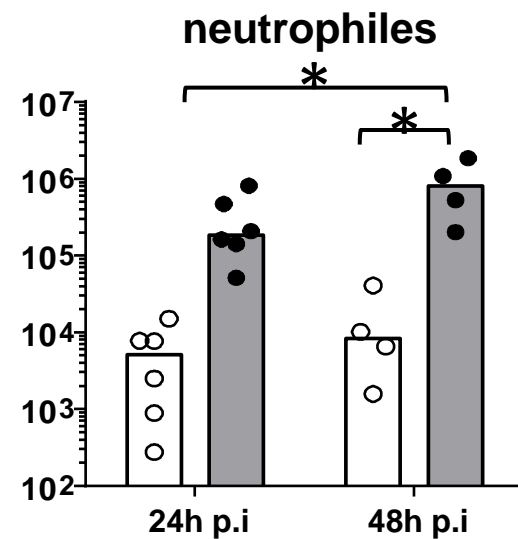
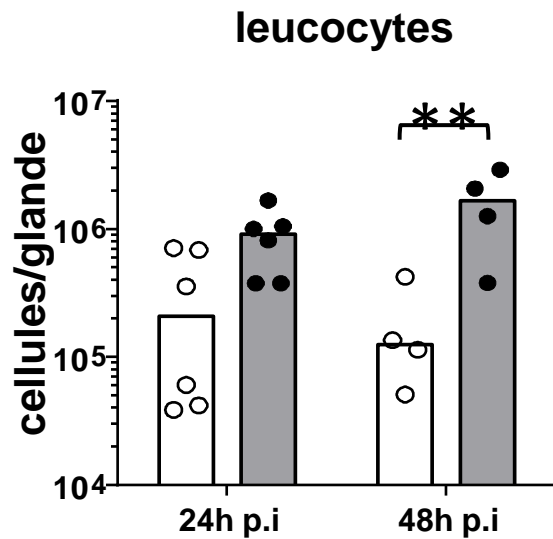
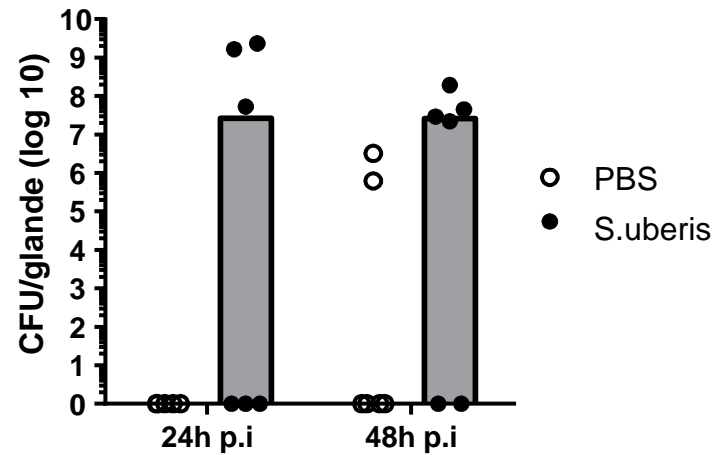
## Glande mammaire infectée



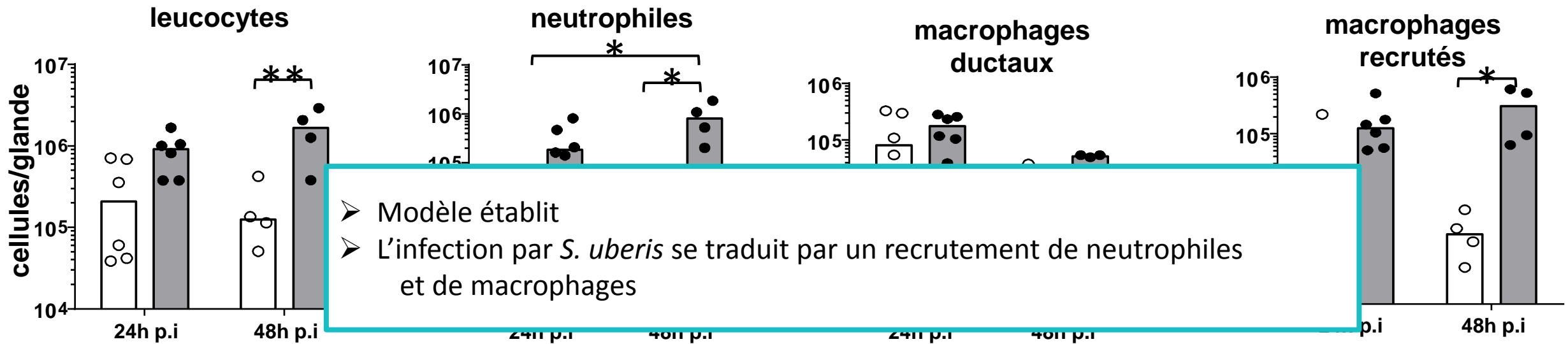
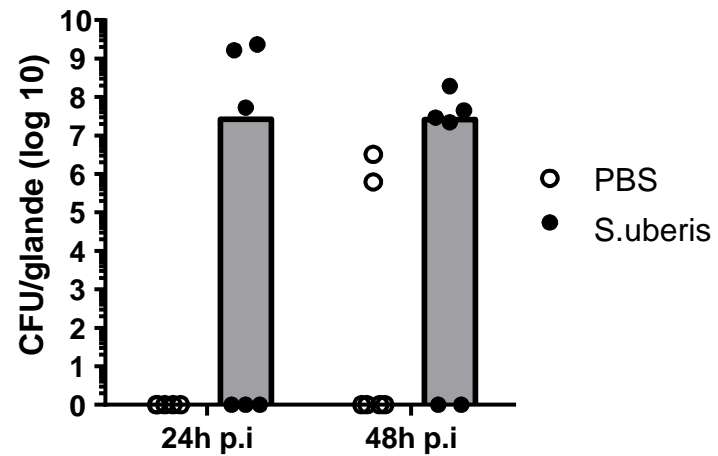
## ➤ Colonisation bactérienne et recrutements cellulaires



# ➤ Colonisation bactérienne et recrutements cellulaires



## ➤ Colonisation bactérienne et recrutements cellulaires



- Modèle établi
- L'infection par *S. uberis* se traduit par un recrutement de neutrophiles et de macrophages



## ➤ Quid des macrophages dans la glande mammaire et le 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



Lait, dilution  
puis  
centri

Cellules  
centrifugées

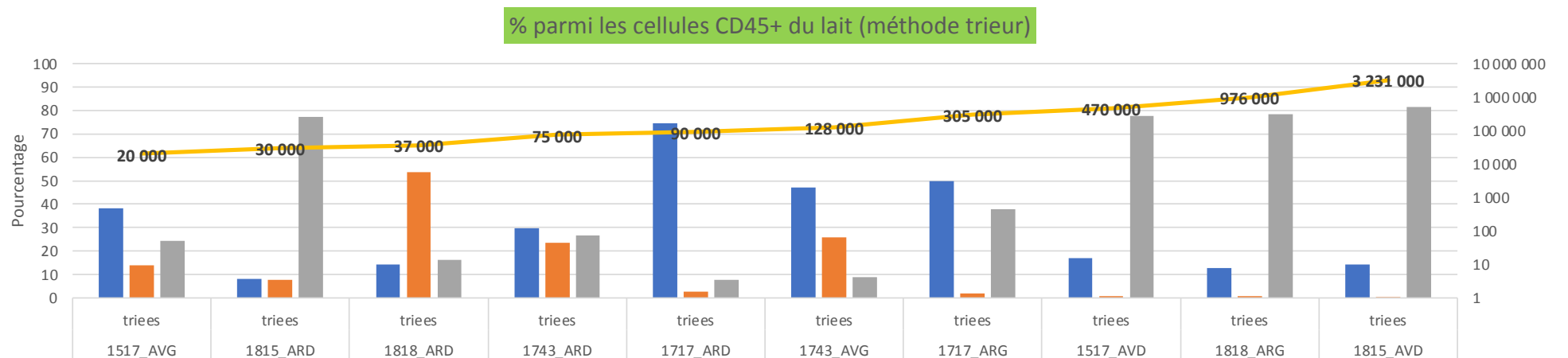
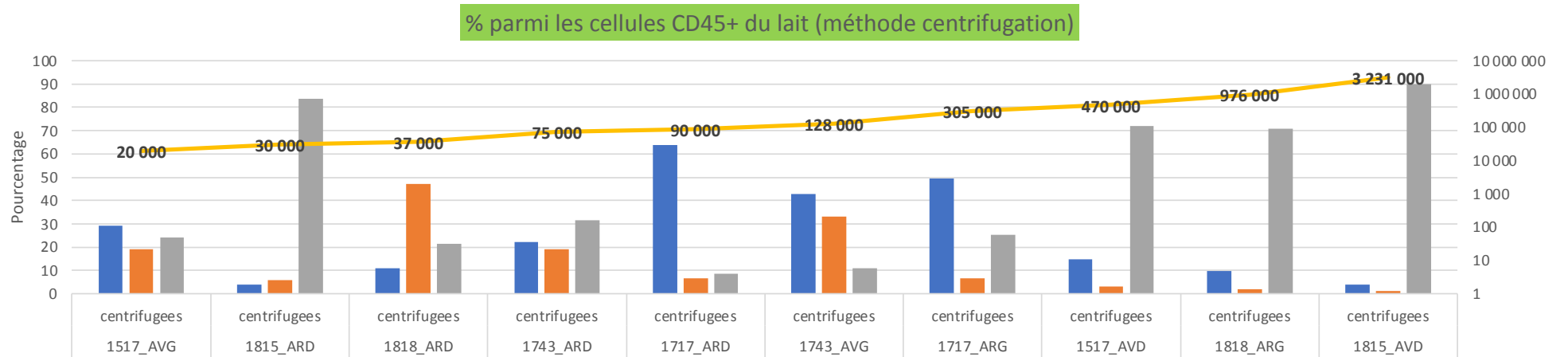


Lait + Vybrant Dye Cycle  
puis  
Tri

Cellules triées

# ➤ Impact de la méthode de récupération des cellules du lait

- Proportion des différentes populations cellulaires récupérées

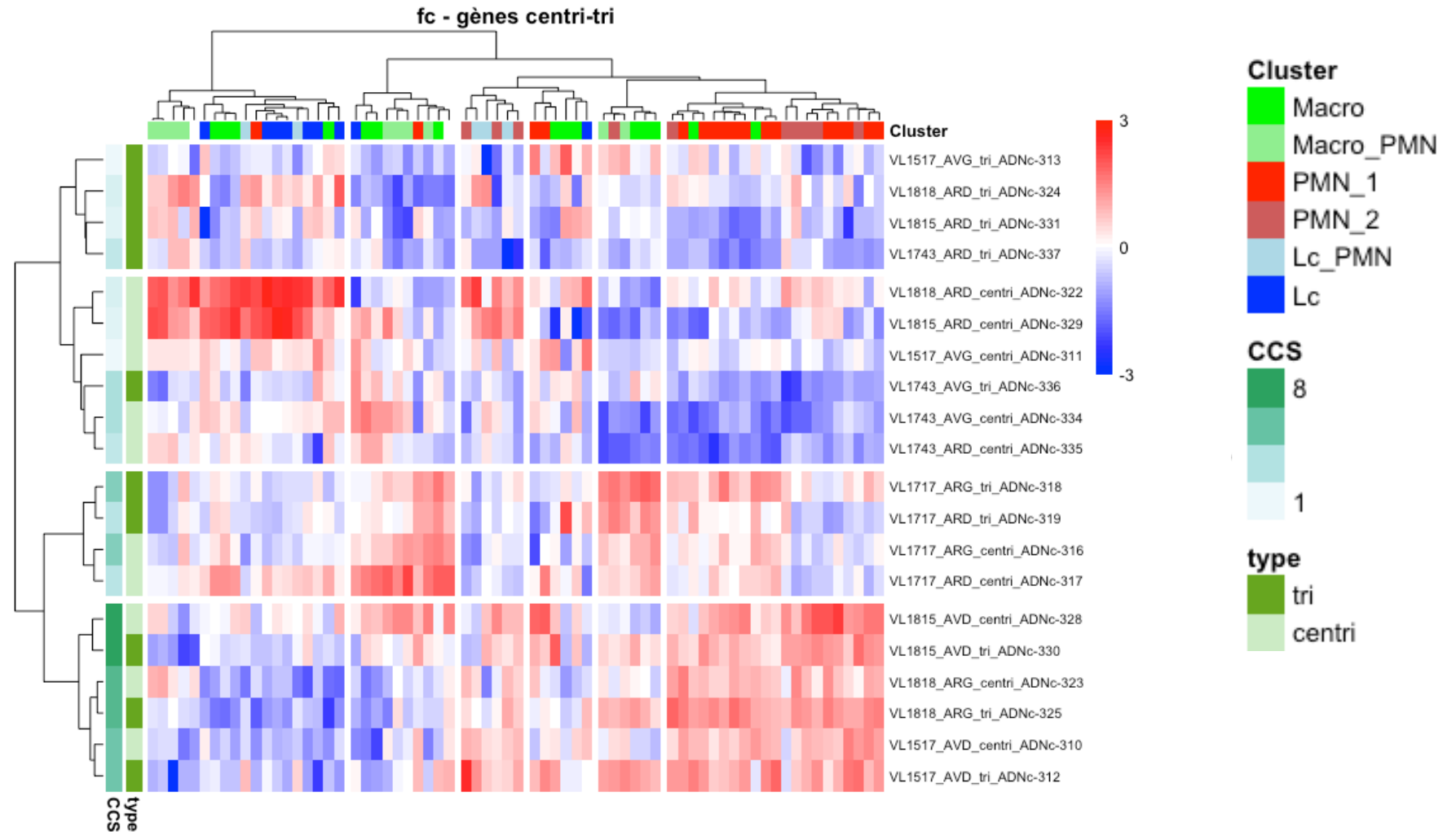


■ Macrophage ■ Lymphocyte ■ Neutrophile — CCS



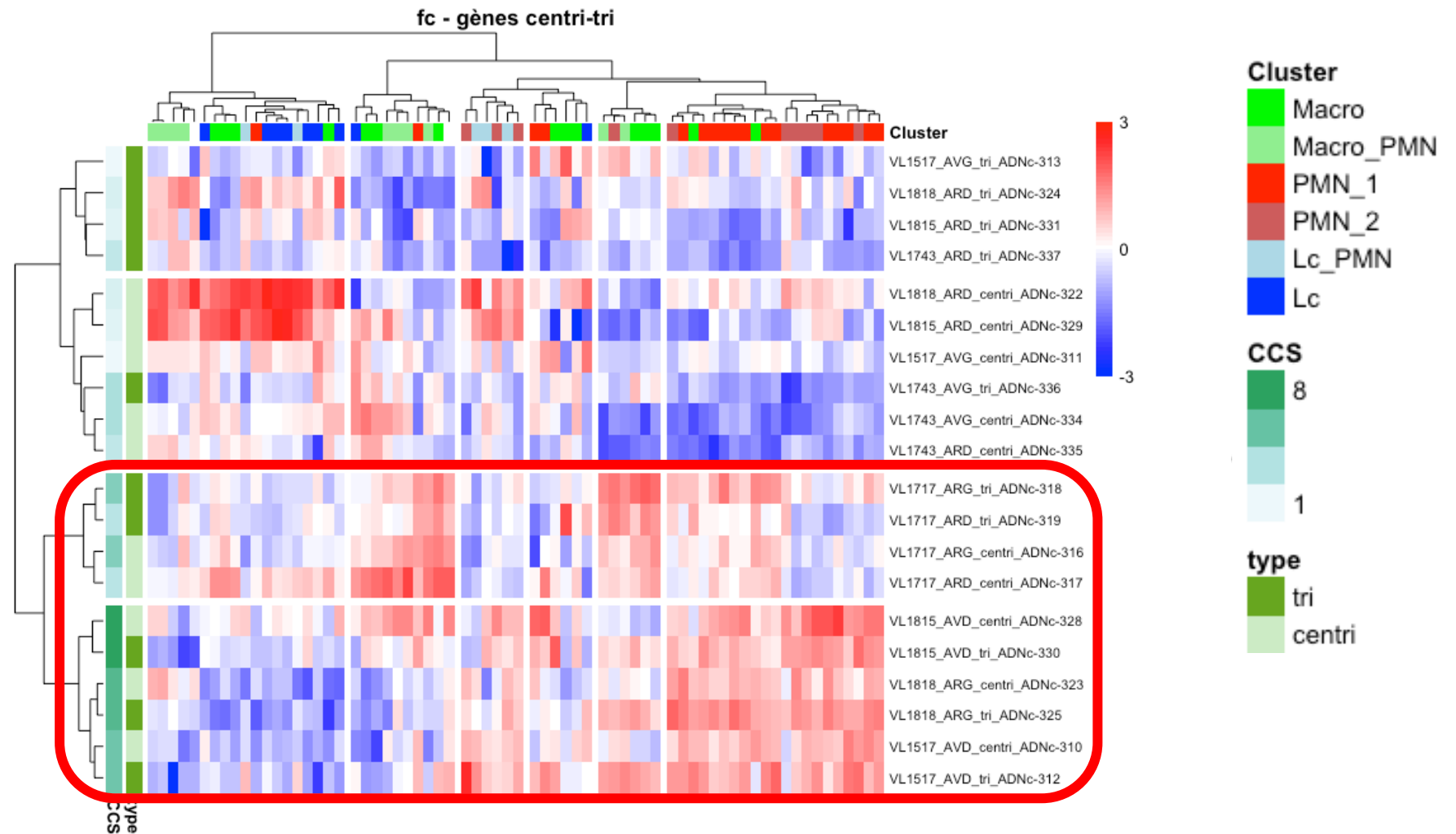
# ➤ Impact de la méthode de récupération des cellules du lait

Profil transcriptomique des cellules centrifugées / cellules triées



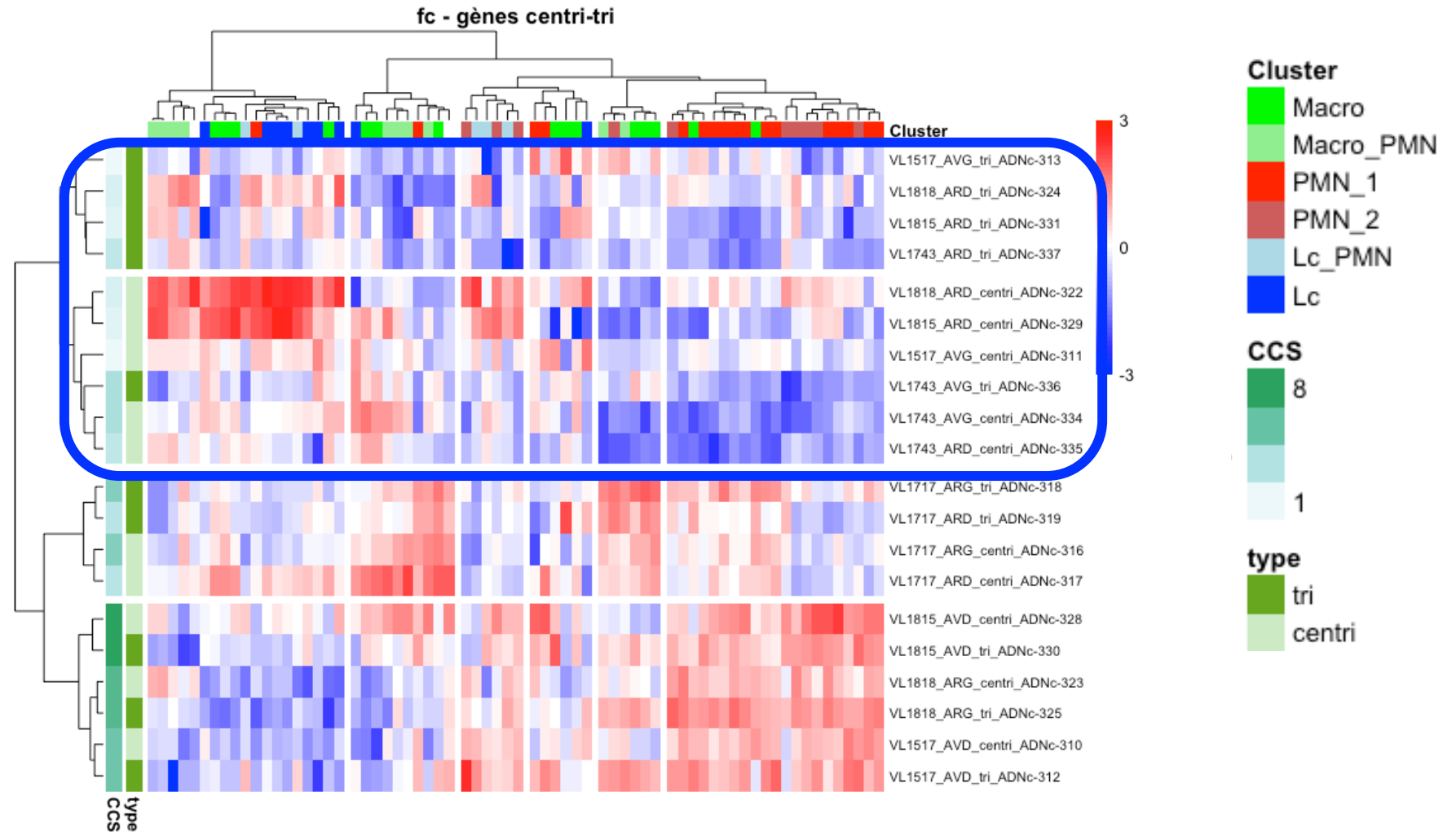
# ➤ Impact de la méthode de récupération des cellules du lait

Profil transcriptomique des cellules centrifugées / cellules triées

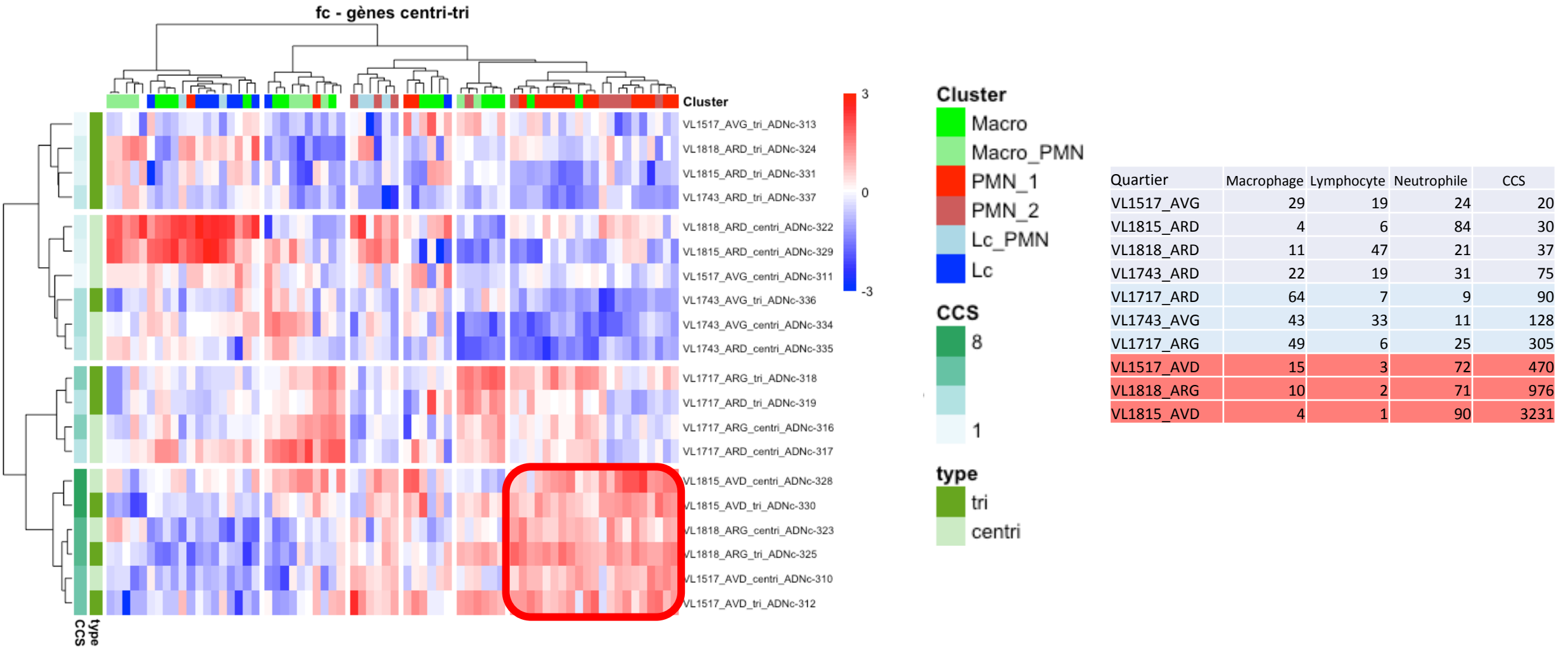


# ➤ Impact de la méthode de récupération des cellules du lait

Profil transcriptomique des cellules centrifugées / cellules triées

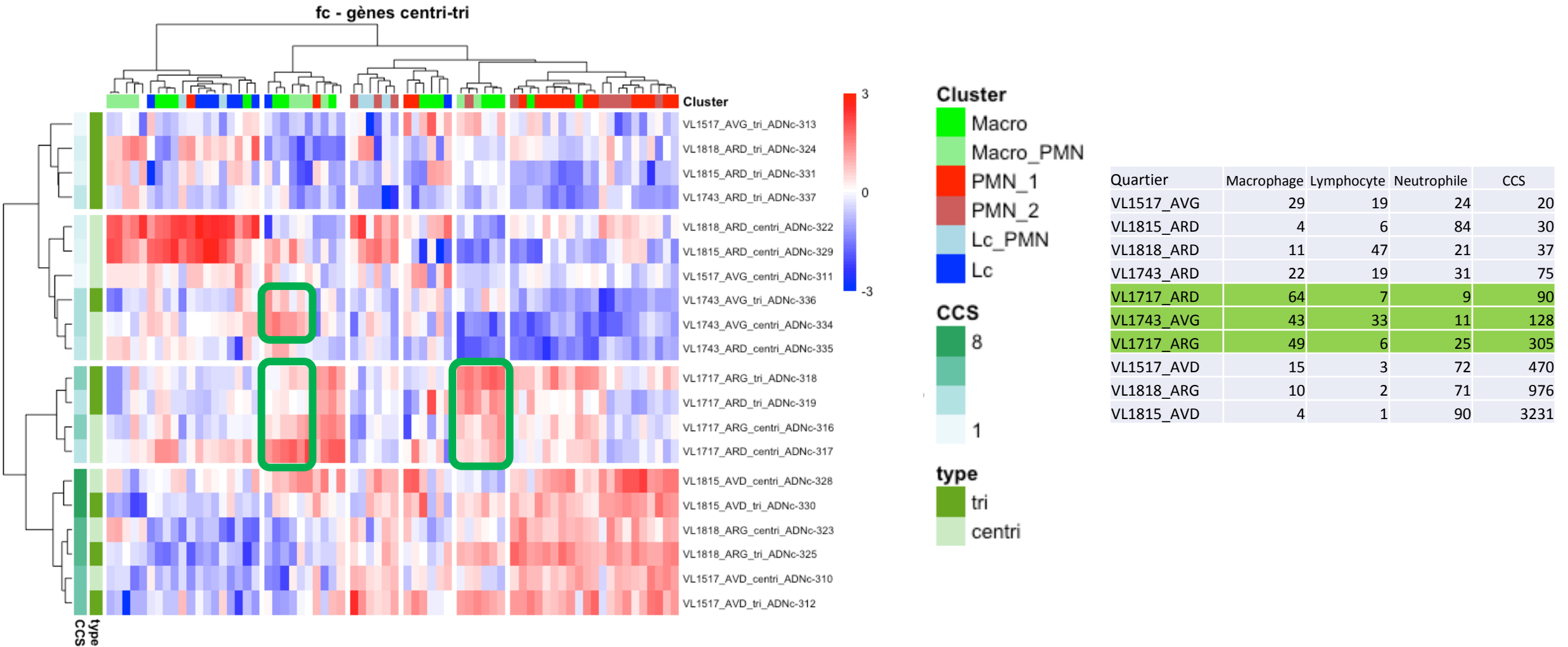


# ➤ Mise en évidence de profils caractéristiques de statuts inflammatoires

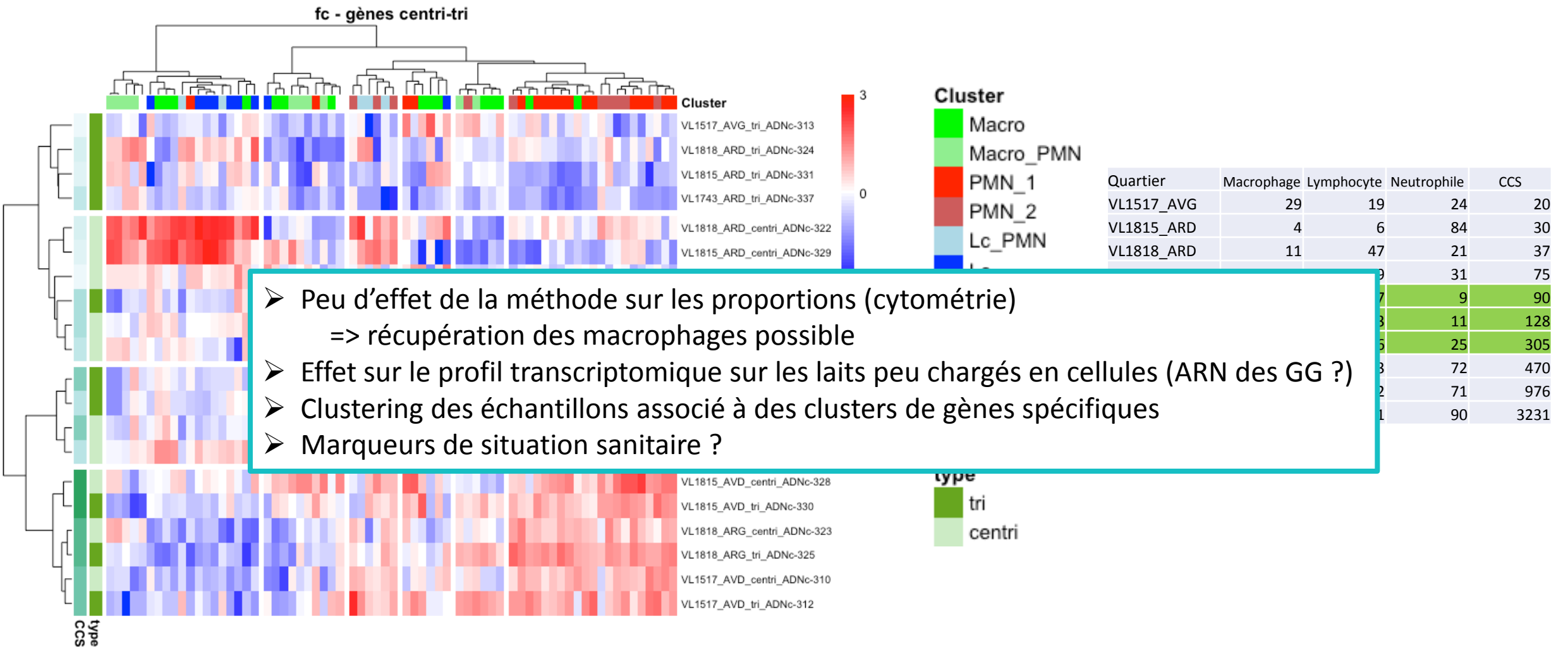




## ➤ Mise en évidence de profils caractéristiques de statuts inflammatoires



## ➤ Mise en évidence de profils caractéristiques de statuts inflammatoires



## ➤ Conclusions

- Les CEMs ont un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes
  - Les CEMs ont la capacité de reconnaître un grand nombre de motifs bactériens: LPS, fragments de peptidoglycanes, lipoprotéines,...
  - Pour la reconnaissance d'*E. coli*, l'antigène O a un impact significatif sur la réponse de l'hôte
- Une infection par *S. uberis* induit le recrutement dans la glande mammaire de macrophages spécifiques dans le lait
- La présence des macrophages du lait est caractérisée par un profil transcriptomique des cellules du lait spécifique : profil marqueur d'infection ?

## > Remerciements



Equipe IBIR

Pascal Rainard

Adeline Porcherie

Mégane Védrine

Florence Gilbert

Christophe Gitton

Maryline Ferter

Emilie Doz-Deblauwe

Rodrigo Prado Martins

Marion Rambault

Camille Berthault

Cindy Leroux

Patricia Cunha

Aude Remot

Nathalie Winter

INRAE - Domaine  
expérimental du Pin au Haras

Sarah Barbey

Frédéric Launay

INRAE - Unité Expérimentale  
de Physiologie Animale de  
l'Orfrasière

Eric Briant

Christophe Staub

INRAE - Plateforme  
d'Infectiologie  
Expérimentale

Vanaïque Guillory

Corinne Beaugé

Rémi Delaunay

Arnaud Faurie

Guillaume Martin

Anne Pinard

Institut Pasteur

Jean-Marc Ghigo



# Kamila Reis Santos, DVM, PhD



- **2022 | MOPGA 4 bourses de séjour de recherche pour jeunes chercheurs, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, équipe IBIR INRAE, Tours**
- **2016-2021 | Doctorat en sciences vétérinaires, Faculté de médecine vétérinaire et des sciences animales, Université de São Paulo - Brésil**
- **2018-2019 | Sandwich Période (Expérience Internationale) September 2018 – Mars/2019 à The Ohio State University, United States of America – Veterinary Epidemiology Unit**
- **2014-2016 | Master en sciences vétérinaires, Faculté de médecine vétérinaire et des sciences animales, Université de São Paulo- Brésil**
- **2008-2012 | Diplômée en médecine vétérinaire**

## COMPÉTENCES

- Immunologie
- culture de cellules
- tests immunobiologiques
- Cytométrie en flux
- Microbiologie

## LANGUES

- Anglais INTERMÉDIAIRE SUPÉRIEUR
- Français DE BASE



# ➤ 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

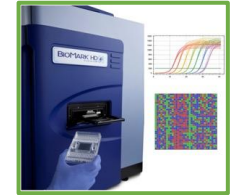


Cellules triées

Cytométrie



RT-qPCR



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

Lc T  
MP  
PMN



# ➤ Identification et purification des cellules du lait par cytométrie

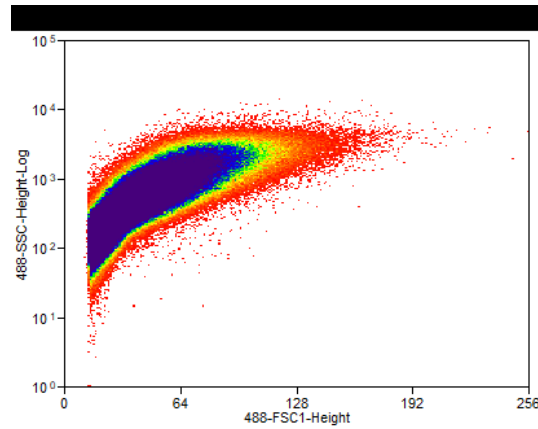
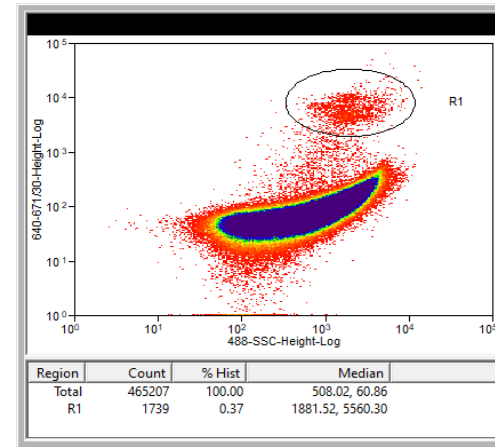
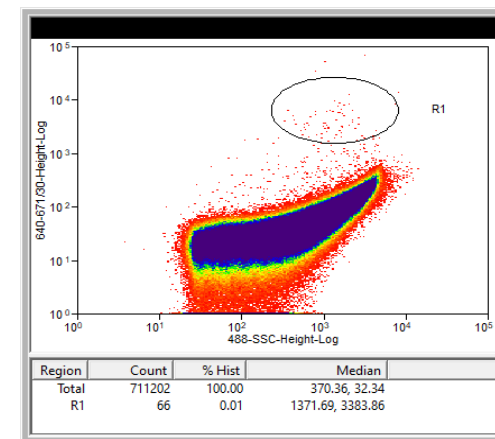
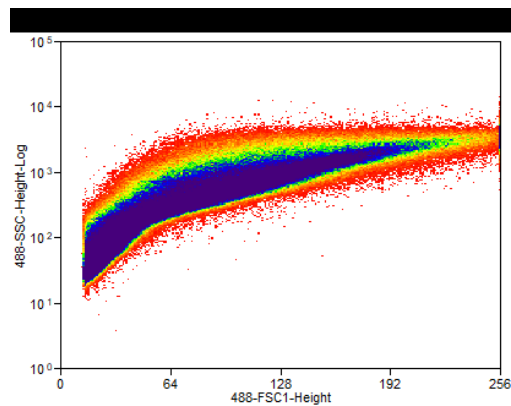


Diagramme FSC-SSC



Quartier riche en cellules

Diagramme FSC- fluorescence rouge Vybrant Ruby



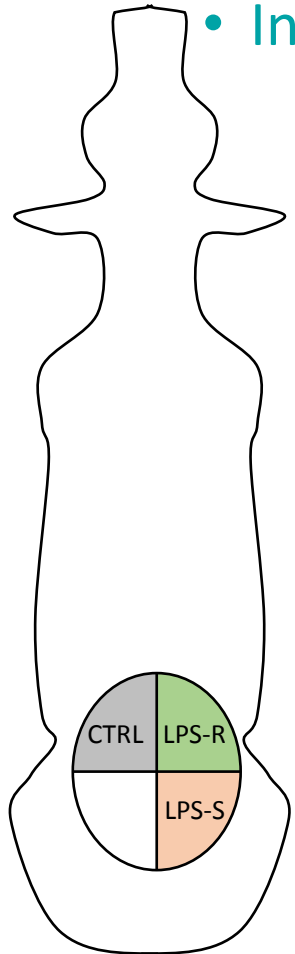
Quartier pauvre en cellules





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

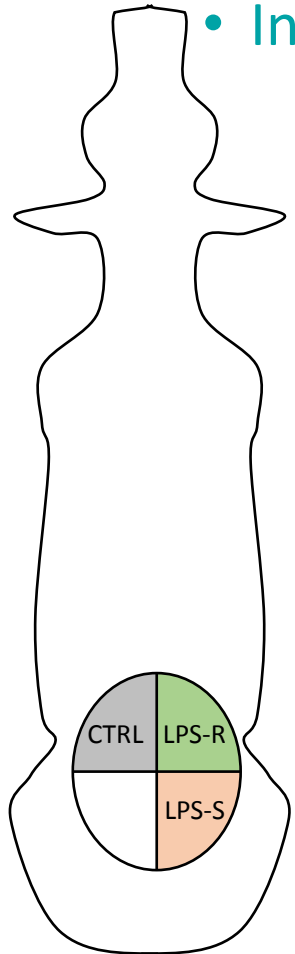
Epreuve inflammatoire in vivo



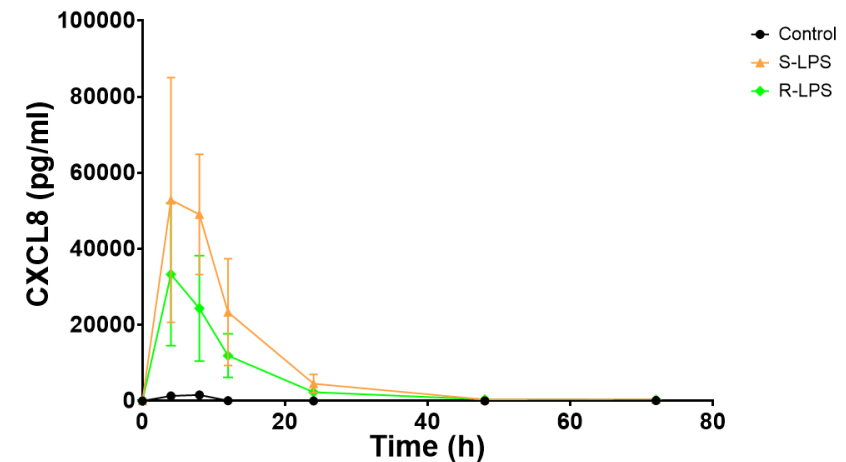
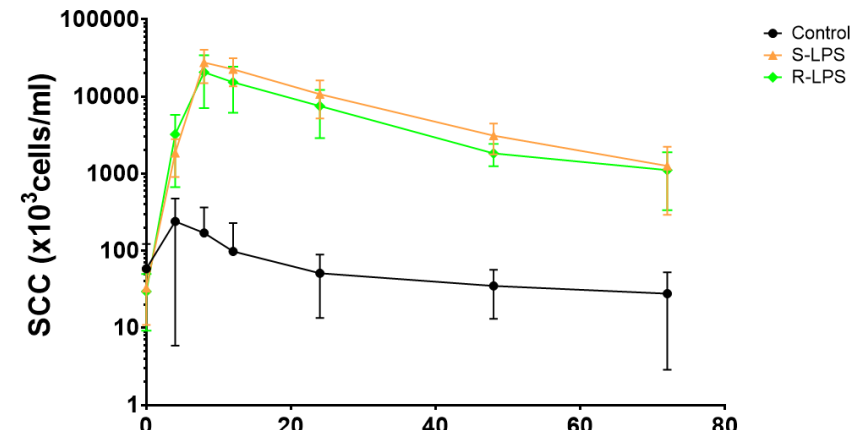
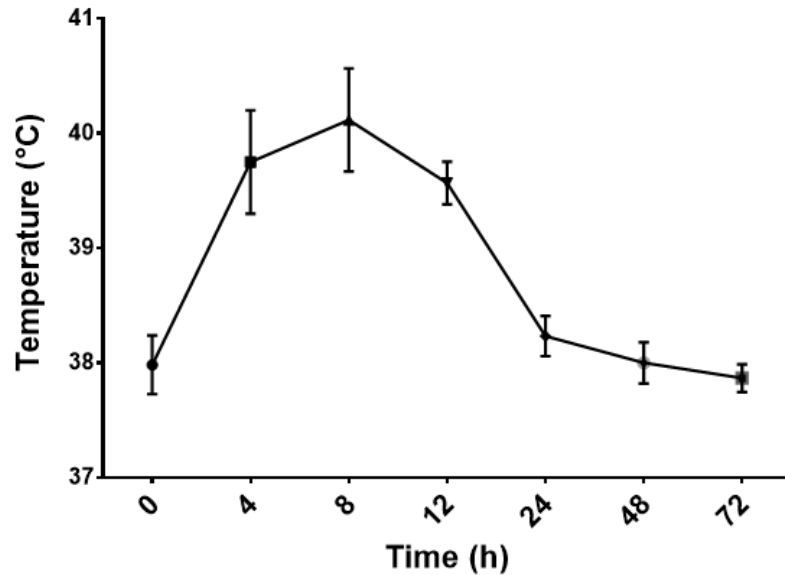
- Infusion de 1 $\mu$ g des fractions LPS-R et LPS-S dans les quartiers de 6 vaches
- comptages cellulaires, suivi de température et dosages cytokines/chimiokines

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

Epreuve inflammatoire in vivo

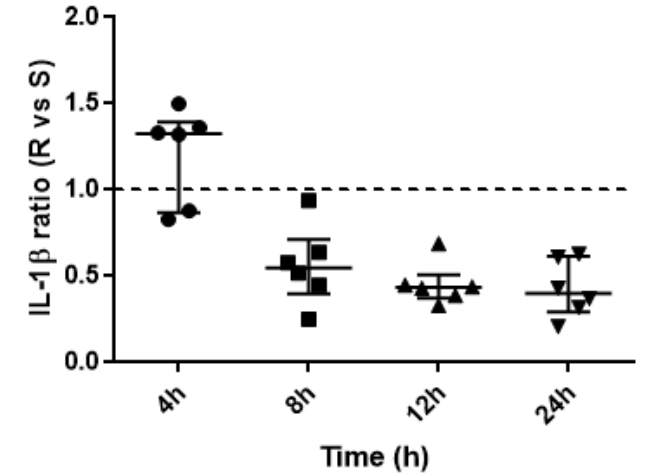
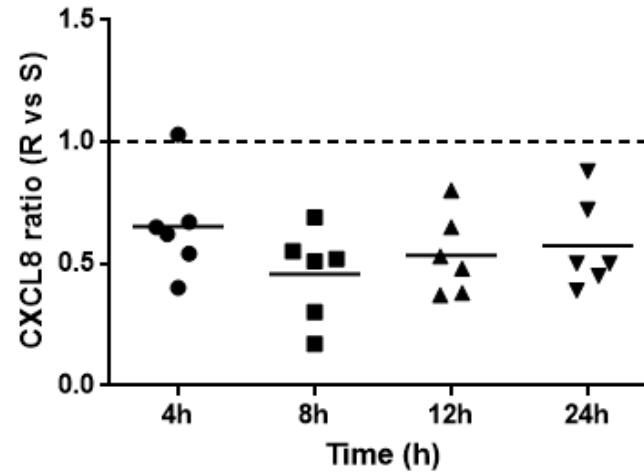
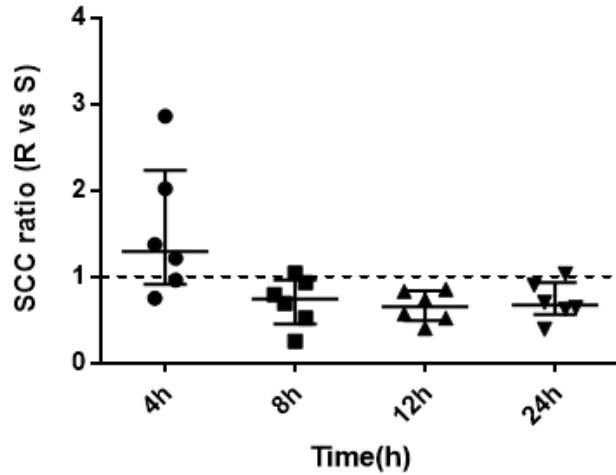
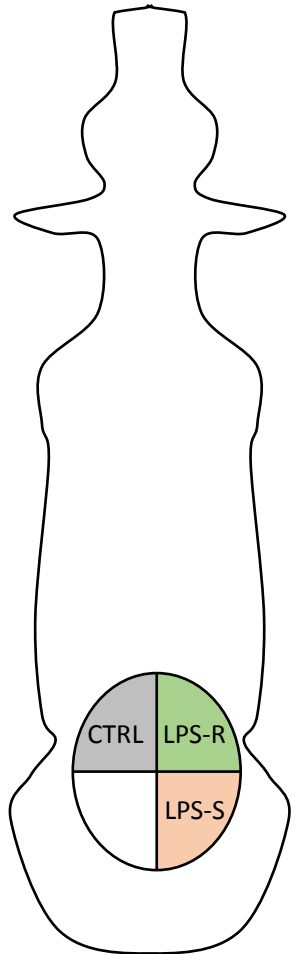


- Infusion de 1 $\mu$ g des fractions LPS-R et LPS-S dans les quartiers de 6 vaches
- comptages cellulaires, suivi de température et dosages cytokines/chimiokines



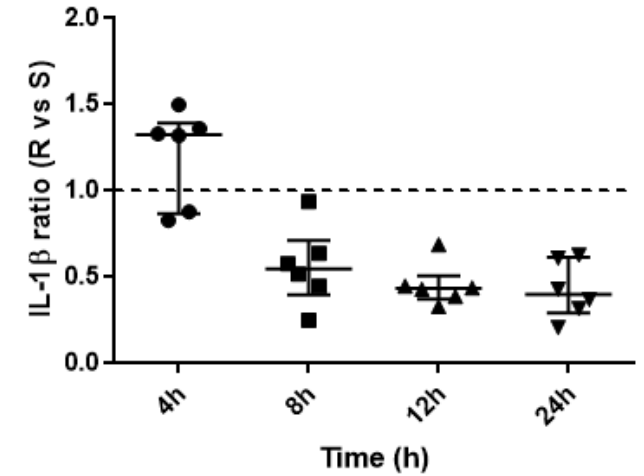
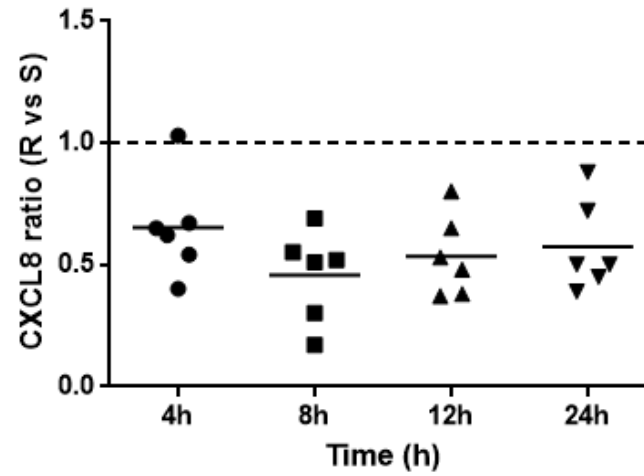
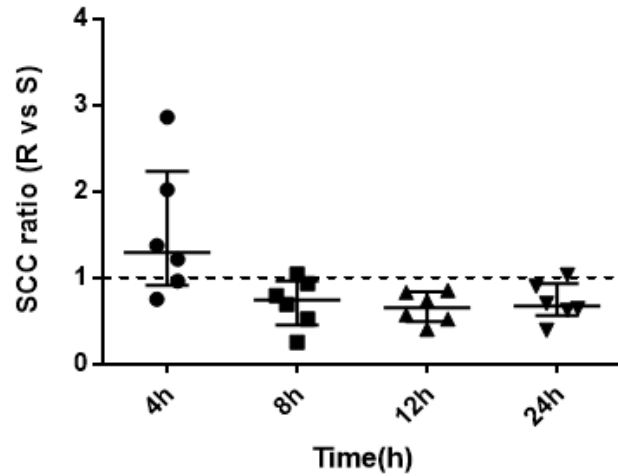
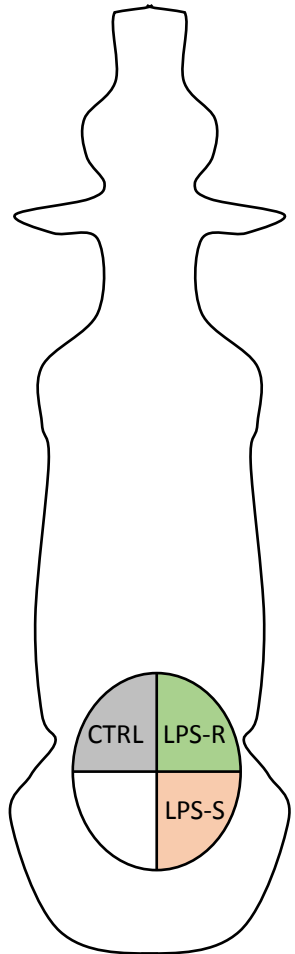
# ➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo



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

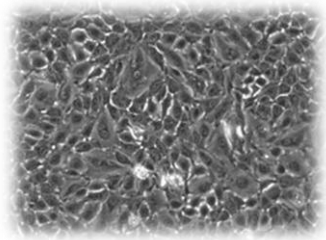
Epreuve inflammatoire in vivo



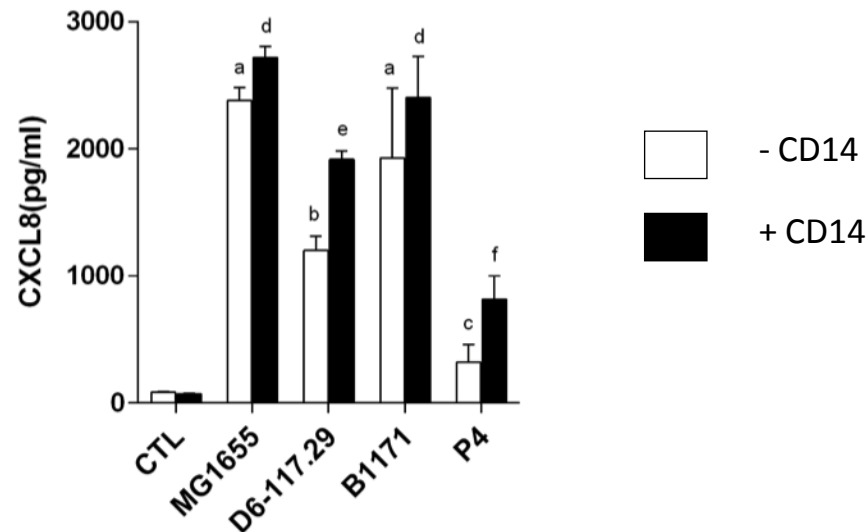
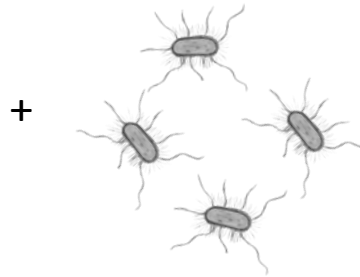
- Paradoxalement, la réponse est plus forte avec le LPS-S
- Elimination/detoxification plus rapide du LPS-R ?

Vedrine *et al.* 2018

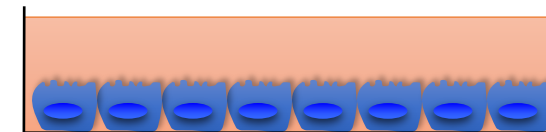
# ➤ Le cofacteur CD14 améliore la réponse des CEMs



Lignée PS  
(cellules épithéliales  
mammaires)



3h puis  
gentamycine  
21h

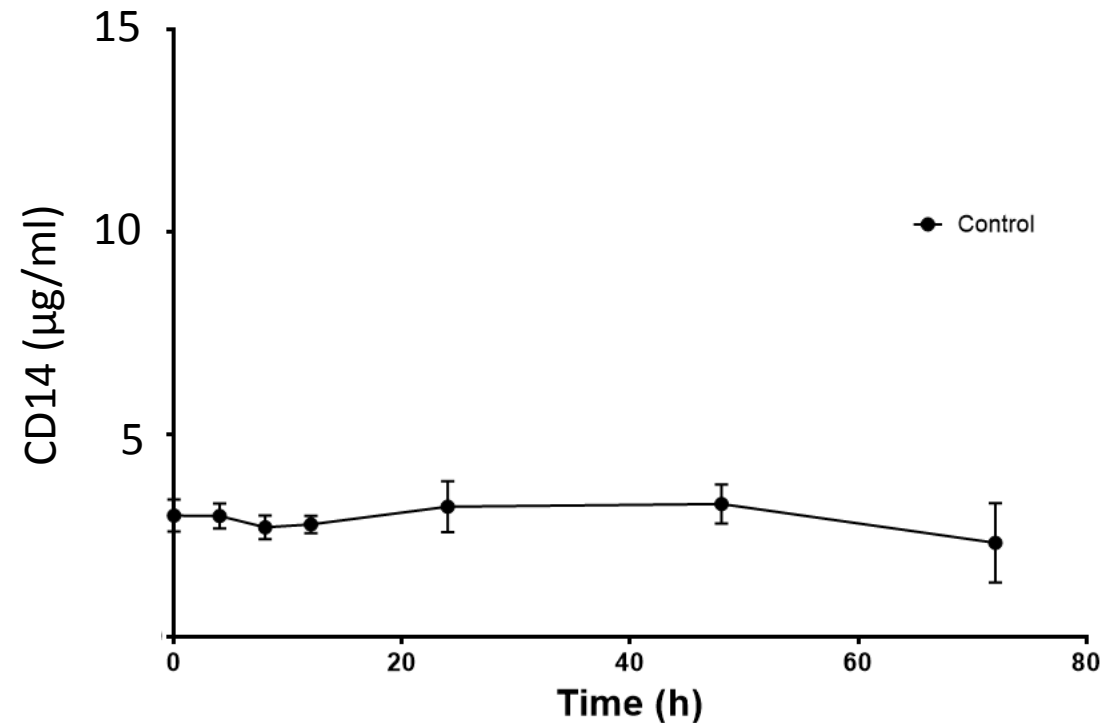
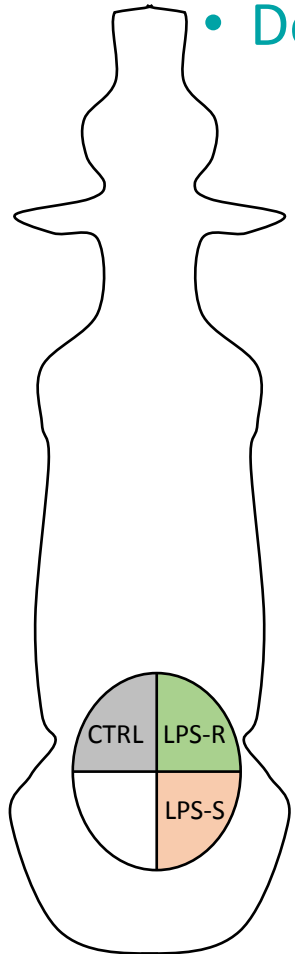


Dosage ELISA CXCL-8

# ➤ Quantification du cofacteur CD14 dans le lait

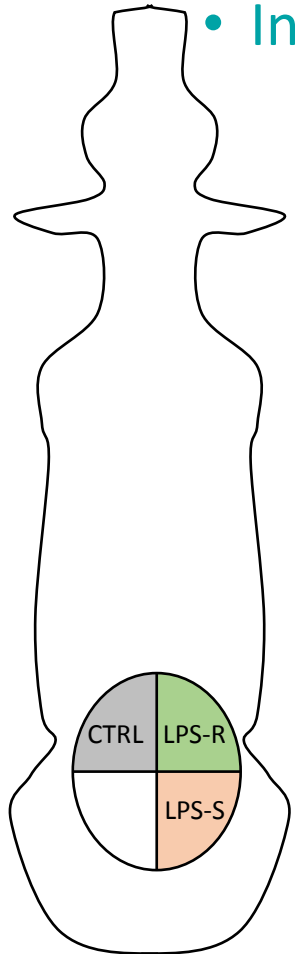
Epreuve inflammatoire in vivo

- Dosage par ELISA lors de l'épreuve inflammatoire LPS

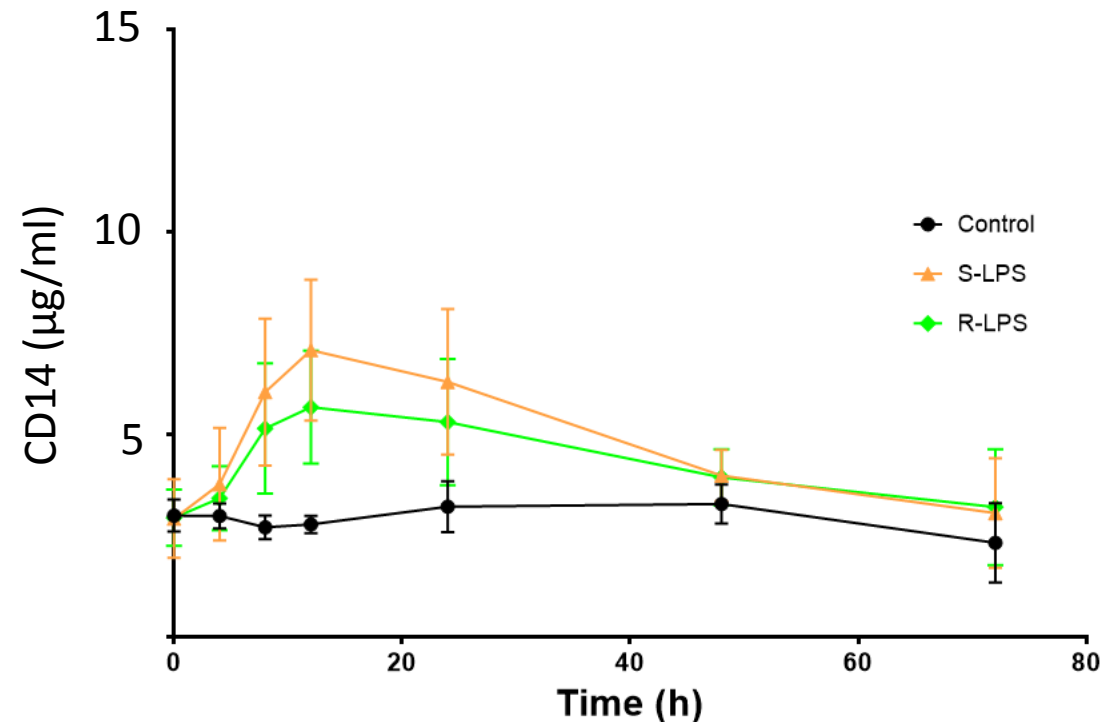


## ➤ Comparaison “LPS-Rough” vs. “LPS-Smooth” in vivo

Epreuve inflammatoire in vivo



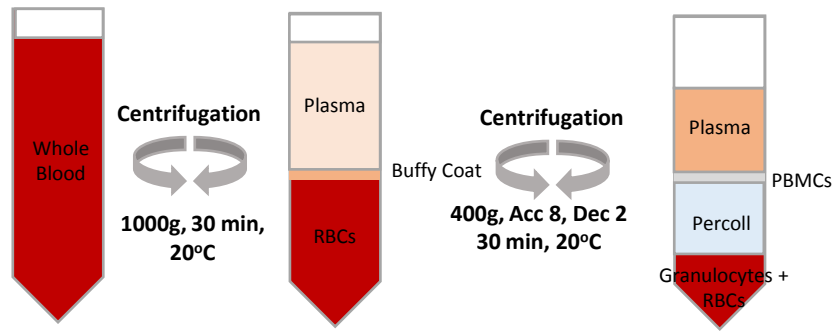
- Infusion de 1 $\mu$ g des fractions LPS dans les quartiers de 6 vaches
- comptages cellulaires, suivi de température et dosages cytokines/chimiokines



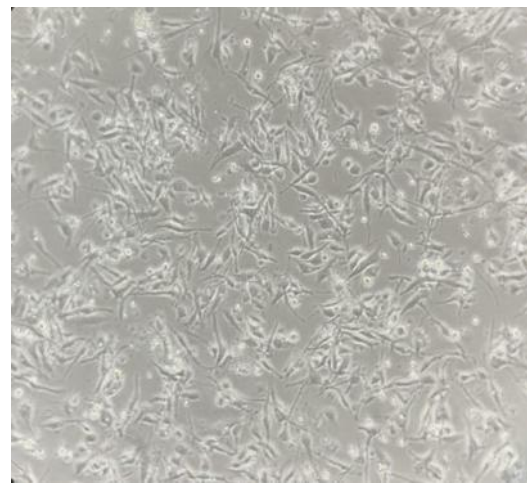
## ➤ Comment étudier la fonctionnalité des macrophages bovins ?

- Les différentes sources de matériel biologique
  - Purification de MP à partir du lait
  - Différenciation de MP à partir de monocytes du sang



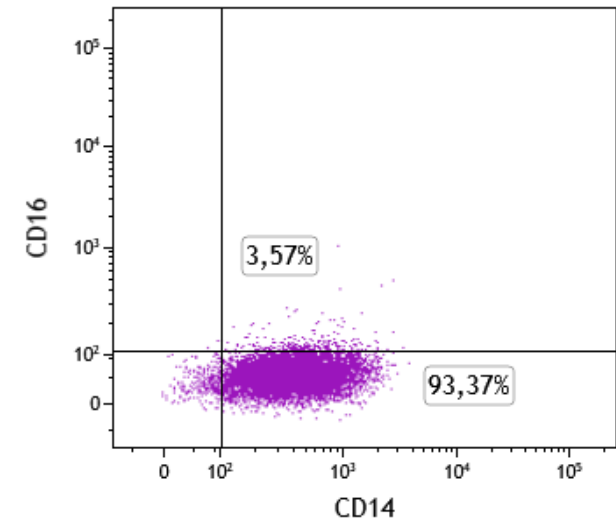
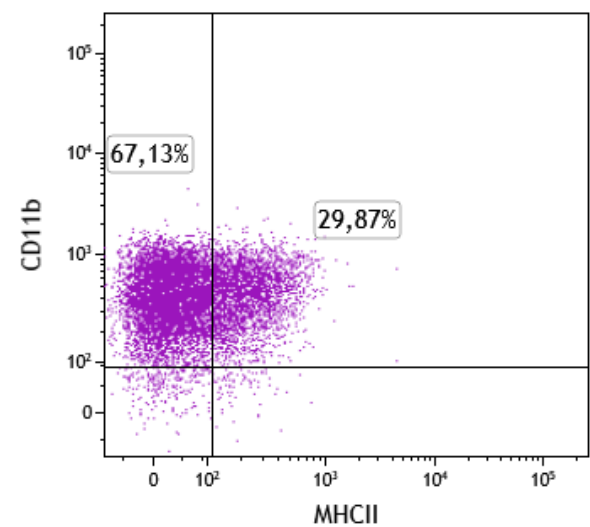


Incubate to adhere for 2 hours at 37°C + 5% CO<sub>2</sub>  
 Supplemented Iscove's medium  
**with no FCS**



J6 après isolement des PBMC et sélection des monocytes par adhésion

### Caractérisation des cellules par cytométrie



INRAE

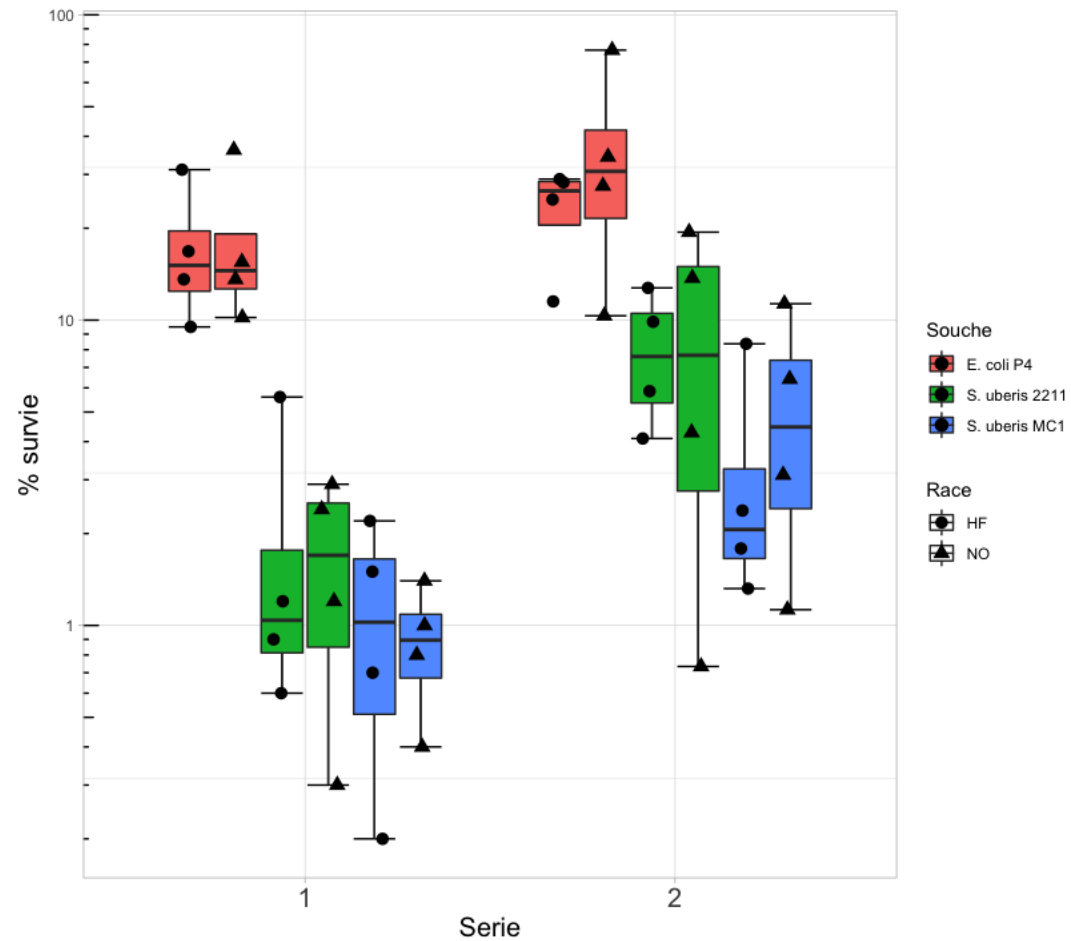
08/11/2022 – P. Germon



## ➤ Fonctionnalité des macrophages bovins

- Différenciation de MP à partir de sang de vaches Holstein et Normande
- Infection des MP avec trois souches bactériennes (MOI=10):
  - *E. coli* P4
  - *S. uberis* MC1
  - *S. uberis* 2211
- Survie bactérienne
- Sécrétion de cytokines/chimiokines
- Réponse transcriptomique

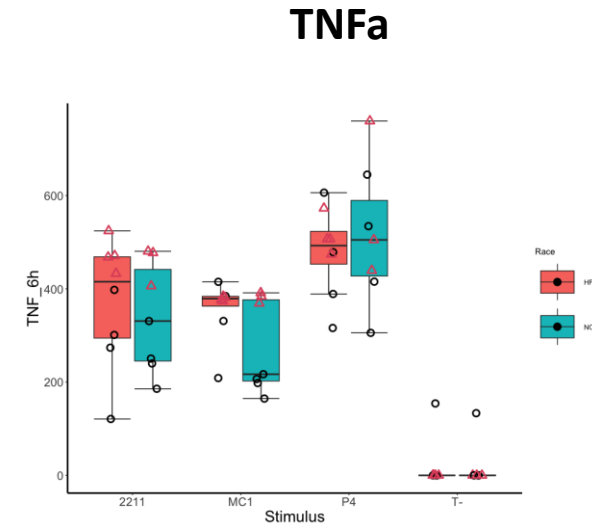
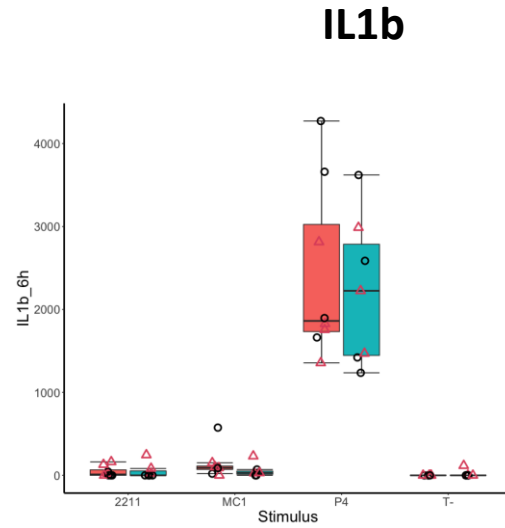
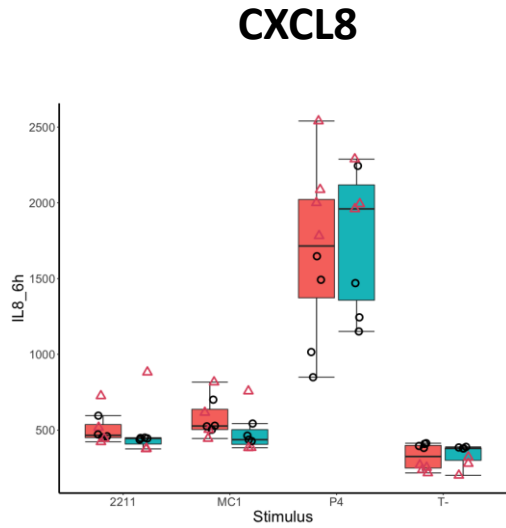
## ➤ Survie à t=6h



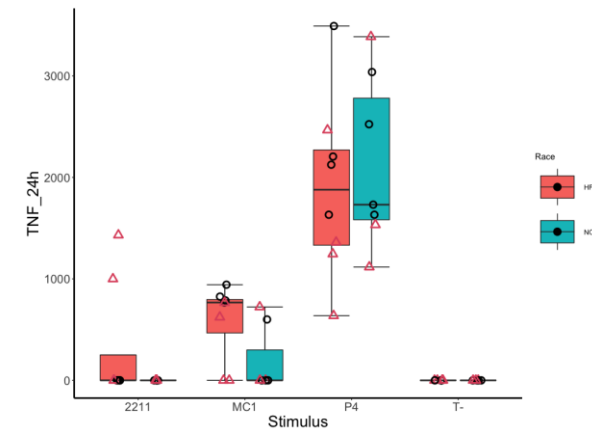
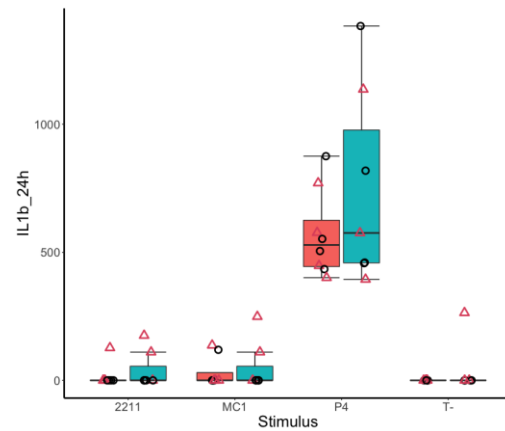
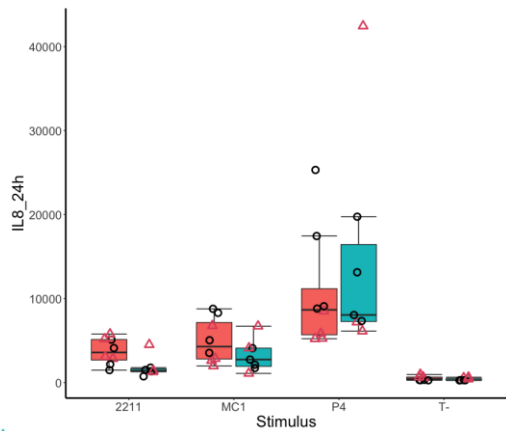
- Pas de différences entre races
- Survie *E. coli* > survie *S. uberis*

# ➤ Sécrétion de cytokines

6h



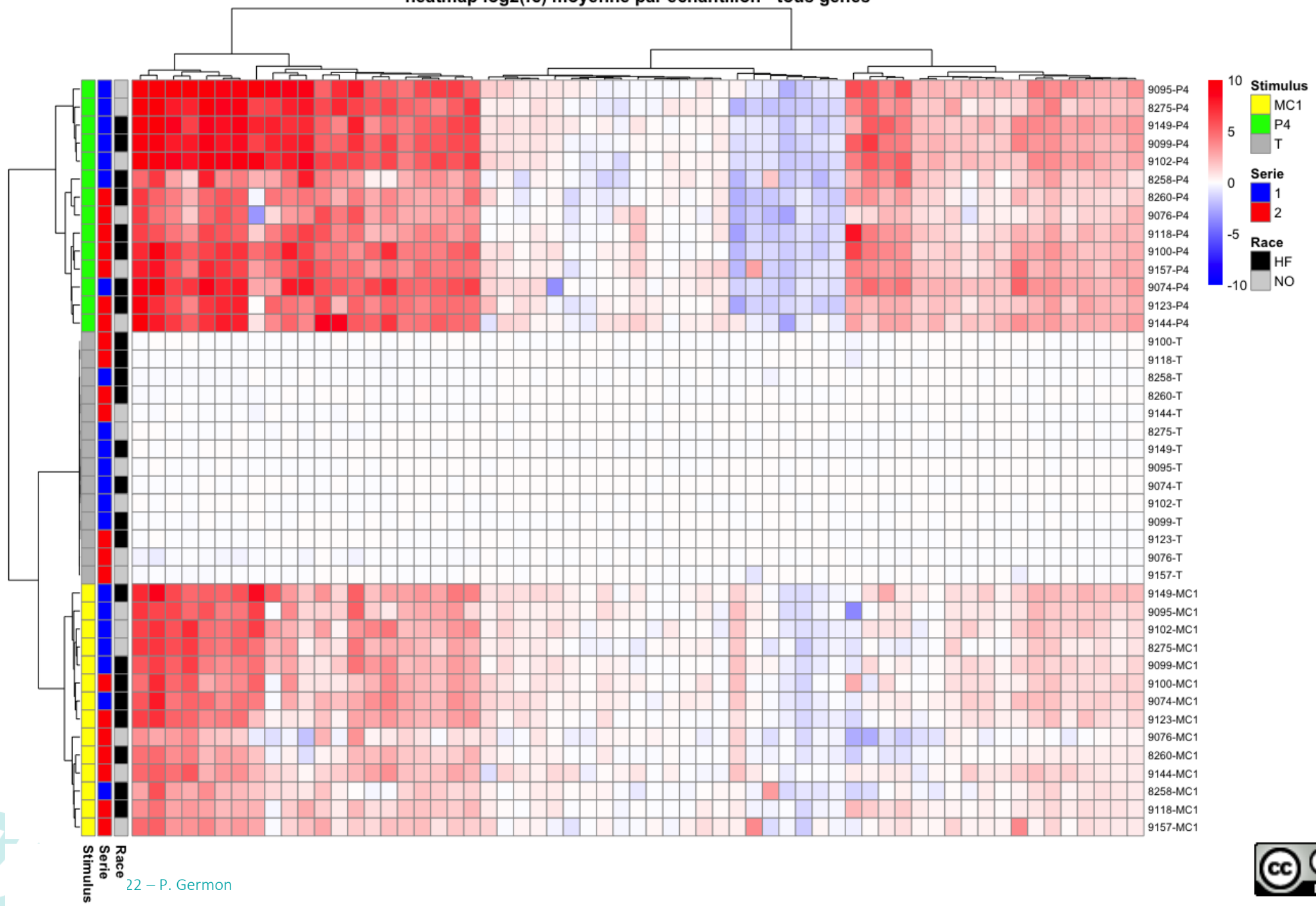
24h



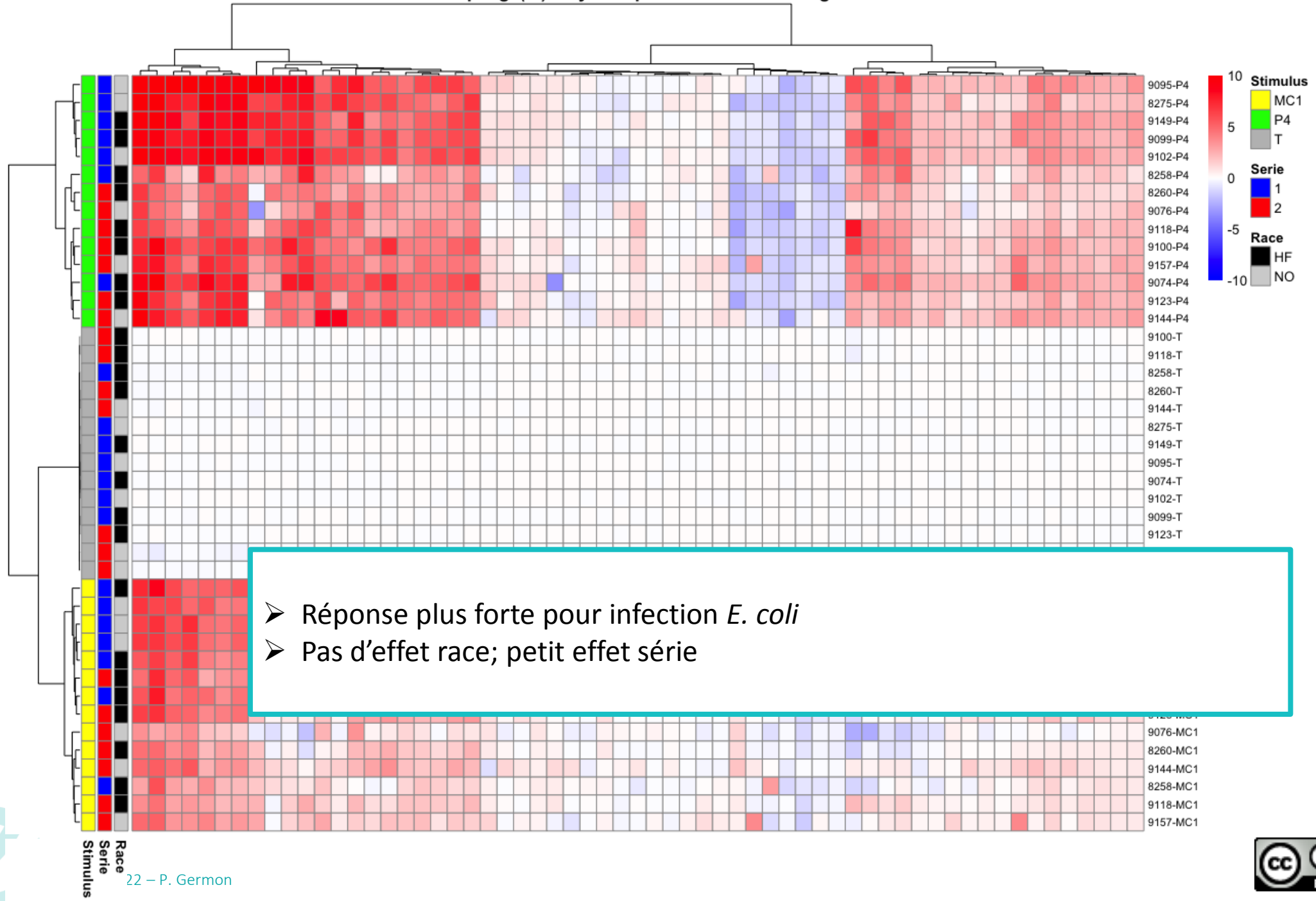
INRAE



heatmap log2(fc) moyenne par echantillon - tous gènes



heatmap log2(fc) moyenne par echantillon - tous gènes



➤ Réponse plus forte pour infection *E. coli*  
➤ Pas d'effet race; petit effet série

