

La levure *Saccharomyces –boulardii*-BIOCODEX modifie la propagation de *Salmonella typhimurium* dans le tractus digestif: conséquences sur la translocation des bactéries et la réponse immunitaire de l'hôte.

R. Pontier-Bres^{1#}, P. Munro², V. Imbert¹, C. Terciolo³, F. André³, E. Lemichez², P. Rampal⁴, JF. Peyron¹, D. Czerucka^{1#}.

¹Equipe 4, ²Equipe 6 INSERM U 1065 Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3M, Hôpital de l'Archet, Nice, France, ³CRO2, INSERM U911, Université Aix-Marseille, ⁴Centre Scientifique de Monaco, Monaco

Conflit d'intérêt: # subvention directe pour le projet par BIOCODEX SA.

Résumé: *Salmonella typhimurium* emprunte généralement la voie digestive pour infecter son hôte. Après ingestion, la bactérie atteint l'iléum dont elle traverse la muqueuse pour se disséminer vers d'autres organes. La levure *Saccharomyces boulardii* lyophilisée Biocodex (*Sb-B*) est un médicament probiotique prescrit pour ses propriétés anti-diarrhéiques lors d'infections virales ou bactériennes. Des études récentes ont démontré que *Sb-B* était capable de s'opposer *in vivo* et *in vitro* aux infections par *Salmonella typhimurium*.

But: Etudier *in vivo* l'effet de *Sb-B* sur la propagation des salmonelles bioluminescentes dans le tube digestif et évaluer l'effet de la levure sur la réponse immunitaire innée dans les temps précoces de l'infection.

Méthodes: Les souches bioluminescentes de *Salmonella typhimurium* (ST-*lux*) ont été obtenues en intégrant un plasmide codant pour la cassette *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens*. Des souris traitées par la streptomycine sont infectées par ST-*lux* (10⁸ bactéries / souris) seules ou en présence de *Sb-B* (10⁷ levures / souris). Après différents temps d'infection (15, 45, 90 min et 6 heures) les souris sont sacrifiées et leur tube digestif (TD) isolé est placé dans le photon imageur (Biospace-Lab, France) pour mesurer l'émission de photons. Des fragments d'intestin contenant le maximum d'émission sont isolés et l'ARNm est extrait pour une étude du niveau d'expression des cytokines par RT-qPCR. Des fragments sont également congelés en Cryomatrix en vue d'immuno-localisation par microscopie confocale des bactéries et levures dans le TD.

Résultats: Le suivi de l'émission de photons a permis de montrer que *Sb-B* accélère la migration de ST-*lux* dans le TD. Après 45 min, les bactéries se trouvent à mi-chemin entre l'estomac et le caecum qu'elles atteignent après 90 min. A 6 heures d'infection, si toutes les ST-*lux* des deux groupes se retrouvent dans le caecum, elles sont plus nombreuses chez les animaux traités par *Sb-B* et de plus, dans ce groupe des ST-*lux* sont retrouvées dans les selles. La translocation bactérienne vers le foie et la rate est diminuée chez les animaux traités par *Sb-B*. Par ailleurs, *Sb-B* modifie la réponse immunitaire innée associée à l'activation des macrophages en stimulant l'expression d'IFN- γ et en inhibant l'expression d'IL-10. Nous avons pu visualiser par microscopie confocale que d'une part *Sb-B* modifie la disposition des Salmonelles dans la lumière intestinale et que d'autre part, la levure peut fixer des Salmonelles sur sa paroi, empêcher ainsi leur translocation et induire leur élimination dans les selles.

Conclusions: L'approche par bioluminescence permet d'étudier le processus infectieux aux temps précoces. Nous avons ainsi pu démontrer que *Sb-B* modifie *in vivo* la propagation de Salmonelles dans le tube digestif, induit une élimination des bactéries dans les fèces, et modifie la réponse immunitaire à l'infection. Cette approche permet de mieux comprendre les niveaux sur lesquels la levure probiotique agit lors d'infections par des Salmonelles.

Introduction:

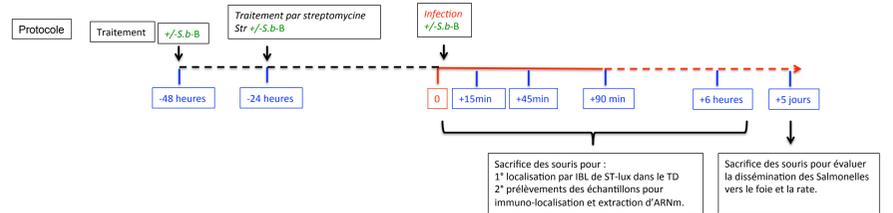
- L'imagerie par bioluminescence (IBL) permet le suivi spatio-temporel en temps réel de processus biologique, par exemple la propagation de l'infection, directement au sein d'un organisme vivant.
- Elle est basée sur la détection de la lumière émise lors de la catalyse par l'enzyme, luciférase de son substrat la luciférine.
- Les souches bioluminescentes de *Salmonella typhimurium* (ST-*lux*) ont été obtenues en intégrant un plasmide codant pour la luciférine et la luciférase de *Photobacterium luminescens* (cassette *luxCDABE*).

But:

Etudier l'effet d'une levure probiotique, *Saccharomyces boulardii*-BIOCODEX (*Sb-B*) sur la phase précoce de l'infection par ST-*lux* lors de sa propagation dans le tube digestif (TD) de souris.

Méthodes:

Des souris traitées par la streptomycine sont infectées par ST-*lux* (10⁸ bactéries / souris) seules ou en présence de *Sb-B* (10⁷ levures / souris) selon le protocole expérimental décrit ci-dessous. Après différents temps d'infection (15, 45, 90 min et 6 heures) les souris sont sacrifiées et leur tube digestif (TD) isolé est placé dans le photon imageur (Biospace-Lab, France) pour mesurer l'émission de photons (Figure 1 et 2). Des fragments du TD sont congelés en Cryomatrix en vue d'immuno-localisation par microscopie confocale des bactéries et levures dans la lumière du TD (Figure 3). Des fragments d'intestin contenant le maximum d'émission sont isolés et l'ARNm est extrait pour une étude du niveau d'expression des cytokines par RT-qPCR (Figure 4).



RESULTATS

Figure 1: *Sb-B* modifie la migration de ST-*lux* dans le TD des souris aux temps précoces après l'infection: 15, 45 et 90 min

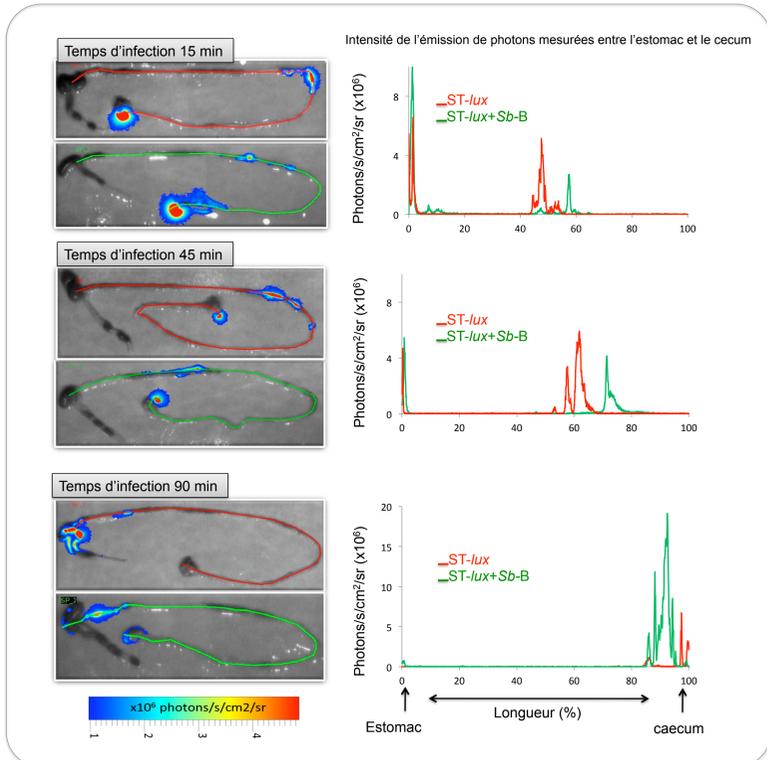


Figure 1: Images acquises avec le Biospace Photon Imager des TD isolés de souris infectées par ST-*lux* (image du haut, ligne rouge) ou de souris traitées avec *Sb-B* et infectées par ST-*lux* (image du bas, ligne verte) à 15, 45 et 90 min après le début de l'infection. Les lignes vertes et rouges sont tracées manuellement et permettent de mesurer les longueurs des TD entre l'estomac et le caecum. Les intensités d'émission de photons mesurées entre l'estomac et le caecum sont représentées sur les diagrammes situés à la droite des images. Les intensités d'émission de photons sont représentées à l'aide d'une échelle de couleurs où le bleu correspond à la plus faible intensité et le rouge à la plus forte (photons/s/cm²/steradian). Les données sont représentatives de 5 expériences indépendantes.

Figure 2: *Sb-B* séquestre ST-*lux* dans le caecum à 6 heures d'infection et favorise leur élimination dans les selles.

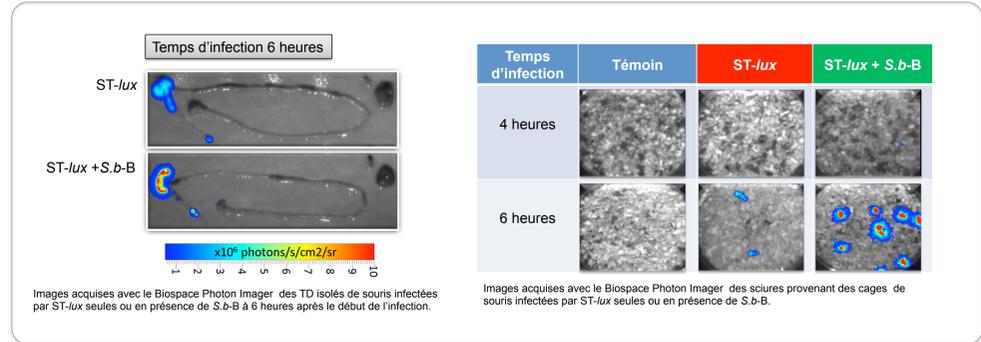


Figure 3: Immunolocalisation par microscopie confocale de ST-*lux* (FITC) et *Sb-B* (TRITC) dans la lumière intestinale de souris

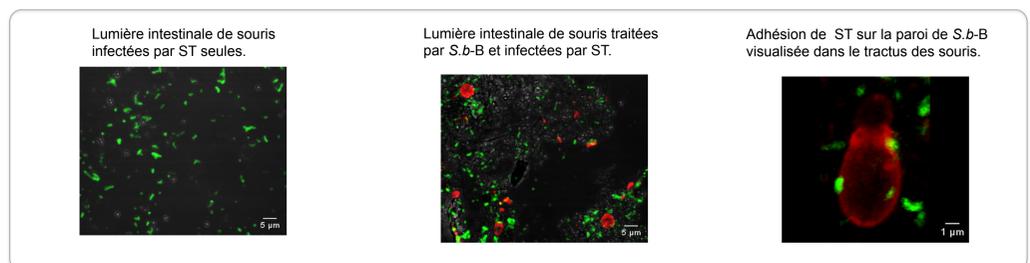


Figure 5: Effet protecteur de *Sb-B* (5 jours d'infection).

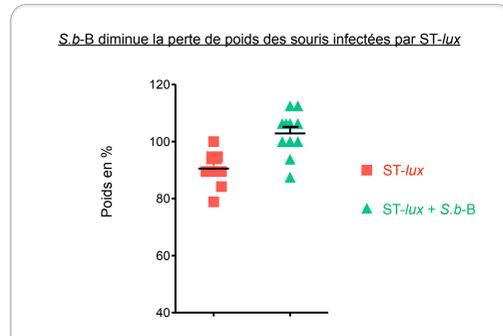
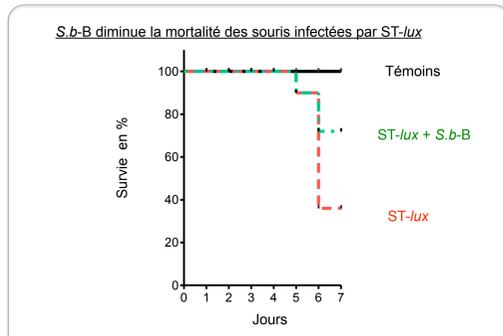
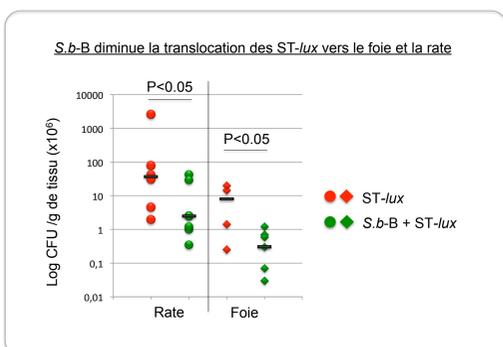
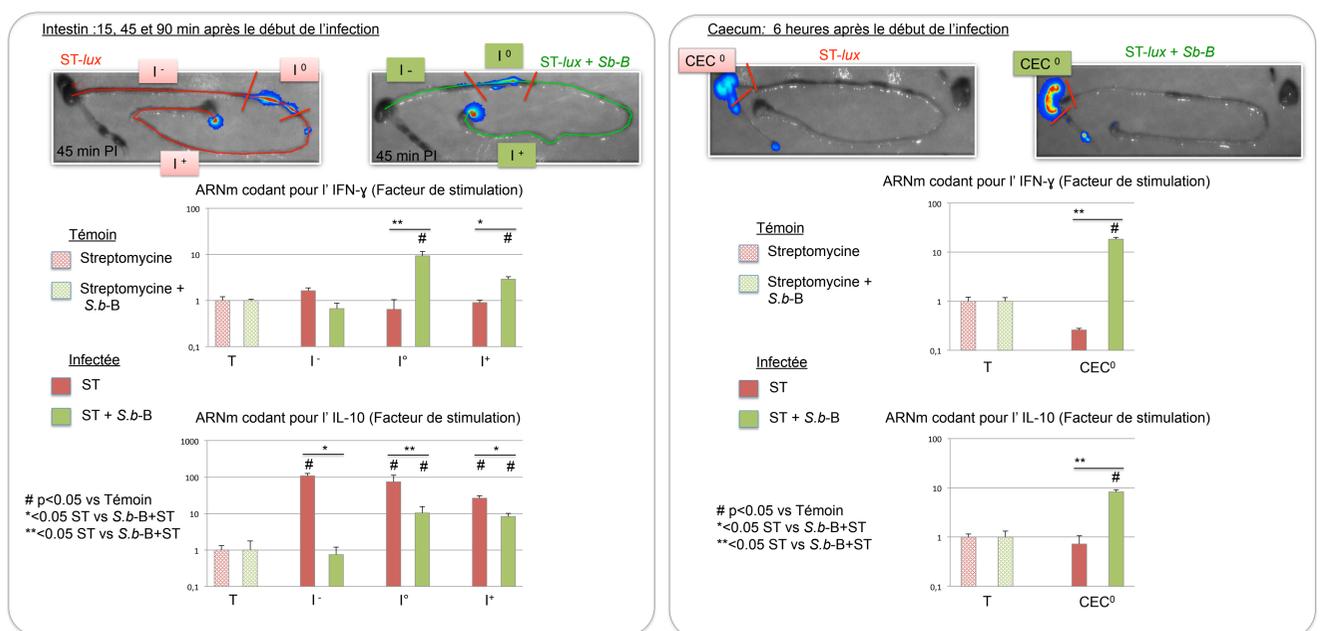


Figure 4: *Sb-B* modifie différemment la réponse immunitaire au niveau de l'intestin (temps précoces) et au niveau du caecum (temps tardifs).



Conclusions:

L'approche par bioluminescence permet d'étudier le processus infectieux *in vivo* aux temps précoces. Cette approche nous a permis de démontrer que la levure *Saccharomyces boulardii*:

- modifie *in vivo* la propagation des Salmonelles dans le tube digestif,
- induit une élimination des bactéries dans les fèces,
- modifie la réponse immunitaire dans l'intestin et le caecum dans les temps précoces de l'infection.

Cette approche permet de mieux comprendre les niveaux sur lesquels cette levure probiotique agit dans les temps précoces d'infection par des Salmonelles.

