

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Étude de l'interaction hôte-pathogène dans le cadre de la maladie du piétin

Sprockeels, Valérie

*Award date:*  
2022

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Faculté des Sciences**

**ETUDE DE L'INTERACTION HÔTE-PATHOGENE DANS LE CADRE DE LA  
MALADIE DU PIETIN**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Valérie SPROCKEELS

Janvier 2022

**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Étude de l'interaction hôte-pathogène dans le cadre de la maladie du piétin**

SPROCKEELS Valérie

### Résumé

Le piétin est une maladie infectieuse, d'origine bactérienne, affectant les moutons dans le monde entier. Cette pathologie débute par une dermatite interdigitée qui peut se propager à l'espace sous-jacent de la corne et mener au détachement de celle-ci. Les moutons atteints présentent une boiterie importante, ce qui réduit leur mobilité et peut, dans les cas les plus graves, causer la mort de l'animal. La transmission de la maladie semble être favorisée dans un environnement chaud et humide, favorisant la formation de petites lésions au niveau de l'espace interdigité. L'agent responsable de la maladie est une bactérie gram négative strictement anaérobie appelée *Dichelobacter nodosus*. Deux souches de cette bactérie sont principalement décrites : la souche virulente et la souche bénigne. Bien que les deux souches soient capables de causer la maladie, la souche virulente semble nécessaire à l'établissement de lésions sévères. Une autre bactérie gram négative strictement anaérobie, *Fusobacterium necrophorum* semble également impliquée dans le piétin. Le mécanisme d'infection et la réponse de l'hôte suite à cette infection sont à ce jour peu connues. Il est donc important de développer un modèle *in vitro* qui permettrait de les étudier. Dans un premier temps, il a fallu caractériser la croissance des bactéries en milieu liquide et leur aérotoleérance. L'infection de kératinocytes en cultures primaires a ensuite permis d'identifier certains marqueurs inflammatoires (cytokines et peptides antimicrobiens) qui semblent être produits par les kératinocytes suite à l'infection par l'une ou l'autre bactérie et d'observer les effets cytotoxiques en normoxie (21% d'oxygène) ou en hypoxie (3% d'oxygène). Un modèle d'épiderme ovin reconstruit a également été développé dans l'optique d'avoir un modèle plus représentatif de l'infection.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2022

**Promoteurs** : D. Coupeau, Y. Poumay

## Remerciements

Le mémoire fut pour moi un long chemin parsemé d'embûches dont je n'aurais pas atteint le bout seule. De nombreuses personnes m'ont aidée, motivée et soutenue tout au long de ce parcours et je les en remercie.

Tout d'abord, je tiens à remercier Damien, mon promoteur, qui a accepté de reprendre la supervision de ce mémoire et de m'accompagner durant ces derniers mois. Tu étais toujours là pour me guider, toujours disponible et toujours bienveillant. Même si tu préfères la virologie moléculaire, tu as pris le temps de t'intéresser au monde des épidermes reconstruits et des bactéries anaérobies (qui ne font rien comme les autres) et pour ça, je ne te remercierai jamais assez.

Je tiens également à remercier Nicolas, qui était à l'origine de ce projet, et qui m'a accompagnée pour mes premiers pas en recherche scientifique, toujours à me pousser à réfléchir par moi-même. J'ai beaucoup grandi grâce à toi. Aux autres membres de la Team Sheep, Inès et Marie, vous m'avez accueillie dans cette équipe à bras ouverts et vous m'avez appris la plupart des manipulations que j'ai réalisées durant ce mémoire. Vous m'avez fait découvrir le monde du piétin et de la médecine vétérinaire. Ces quelques mois que nous avons passés ensemble, à travailler sur ce projet furent très agréables. Je voudrais également remercier Nathalie Kirshvink, qui était ma promotrice au début de ce mémoire et m'a donné de nombreux conseils pour la rédaction et l'élaboration de protocoles.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'URVI, aussi bien les doctorants que les techniciens. Vous nous avez fait, à mes co-mémorants et à moi, une place au sein de ce grand arbre généalogique qui est le vôtre. Vous étiez toujours disponibles pour répondre à mes questions, pour rire ou boire un verre autour d'un jeu de société. Je vous remercie tous d'avoir partagé avec moi vos connaissances et vos projets. J'ai passé de très bons moments avec vous et j'espère qu'on pourra se retrouver autour d'une bonne bière.

Je tiens également à remercier l'équipe du LabCeTi, en particulier Valérie, Valéry, Audrey et Mr. Poumay, qui étaient toujours là pour répondre à mes questions au sujet des épidermes reconstruits, me conseiller et me prêter du matériel afin que mon mémoire se déroule au mieux. Je voudrais également remercier l'équipe de Faulx-les-Tombes et de l'abattoir de Ciney, qui m'ont permis de venir prélever de la peau de mouton.

J'aimerais également remercier mes co-mémorants, Guillaume, Julie et Maxence, avec qui j'ai partagé un bureau durant ces nombreux mois et qui ont fait de cette expérience un souvenir inoubliable. Merci d'avoir été là, de partager votre expérience, vos idées et votre bonne humeur. Julie, je voudrais également te remercier pour tous ces blocus passés ensemble, à se motiver, à étudier et, bien sûr, à faire n'importe quoi durant nos pauses. Guillaume, nous avons commencé ce mémoire à deux, et nous l'avons terminé à deux. Merci pour toutes ces soirées de rédaction jusqu'à pas d'heures au laboratoire et merci d'avoir toujours été là pour moi dans les moments les plus difficiles. Ces 10 mois n'auraient pas été les mêmes sans toi, je te souhaite plein de réussite à Stanford et dans tes projets futurs.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille, en particulier ma maman qui m'a soutenue tout au long de mes études, à relire mes différents travaux, me préparer des petits plats pour mes longues soirées de manipulations ou de rédaction mais surtout d'avoir été là, quand j'avais besoin d'elle.

## Table des matières

1.	Introduction .....	5
1.1	Les infections de la peau et la réponse immunitaire.....	5
1.2	Le piétin.....	5
1.3	Les microorganismes impliqués dans le piétin.....	7
1.3.1	<i>Dichelobacter nodosus</i> .....	8
1.3.2	<i>Fusobacterium necrophorum</i> .....	9
1.3.3	Autres bactéries impliquées.....	10
1.3.4	Interaction entre les organismes pathogènes .....	10
1.4	Diagnostic.....	10
1.5	Épidémiologie .....	10
1.6	Transmission du piétin .....	12
1.7	Prévention.....	13
1.7.1	Vaccination.....	13
1.7.2	Parage de l'onglon.....	14
1.7.3	Pédiluve .....	14
1.7.4	Éradication du piétin.....	15
1.8	Modèles d'étude .....	15
1.8.1	Étude <i>in vivo</i> .....	15
1.8.2	Cultures primaires.....	15
1.8.3	Modèles 3D.....	16
2.	Matériels et méthodes.....	19
2.1	Souches bactériennes utilisées.....	19
2.2	Culture de <i>Dichelobacter nodosus</i> et <i>Fusobacterium necrophorum</i> en milieu liquide.....	19
2.3	Évaluation de la résistance naturelle de <i>D. nodosus</i> à différents antibiotiques .....	19
2.4	Évaluation de la résistance de <i>D. nodosus</i> et <i>F. necrophorum</i> à l'aérobiose .....	21
2.5	Récolte et culture de kératinocytes normaux de mouton.....	21
2.6	Culture de NSK et de kératinocytes humains immortalisés .....	21

2.7	Reconstruction d'un épiderme.....	21
2.8	Mesure de la résistance électrique transépithéliale.....	22
2.9	Exposition de kératinocytes primaires à <i>Dichelobacter nodosus</i> mort .....	22
2.10	Infection de cultures primaires par <i>Dichelobacter nodosus</i> et/ou <i>Fusobacterium necrophorum</i> .....	23
2.11	Mise au point de la qPCR pour le suivi de la croissance de <i>D. nodosus</i> en milieu liquide.....	23
2.12	Mise au point de la détection des peptides antimicrobiens du mouton .....	23
2.13	qPCR .....	24
3.	Résultats .....	25
3.1	Caractérisation de <i>Dichelobacter nodosus</i> .....	25
3.1.1	Culture de <i>Dichelobacter nodosus</i> en milieu liquide .....	25
3.1.2	Suivi de la croissance de la souche virulente de <i>Dichelobacter nodosus</i> en milieu liquide FAB par qPCR.....	26
3.1.3	Évaluation de la résistance naturelle de <i>D. nodosus</i> à différents antibiotiques .....	27
3.2	Caractérisation de <i>Fusobacterium necrophorum</i> .....	27
3.3	Évaluation de la résistance de la souche virulente de <i>D. nodosus</i> et <i>F. necrophorum</i> à l'aérobiose .....	28
3.4	Impact de l'exposition de kératinocytes primaires à diverses quantités de <i>Dichelobacter nodosus</i> virulent mort.....	29
3.5	Infection de cultures primaires par <i>Dichelobacter nodosus</i> ou <i>Fusobacterium necrophorum</i> 31	
3.5.1	Essai préliminaire d'infection de NSK par <i>D. nodosus</i> ou <i>F. necrophorum</i> .....	31
3.5.2	Infection de NSK par <i>D. nodosus</i> et <i>F. necrophorum</i> .....	32
3.5.3	Étude de l'impact de l'hypoxie sur les kératinocytes humains immortalisés .....	34
3.5.4	Infection de N/tert par <i>D. nodosus</i> et <i>F. necrophorum</i> .....	35
3.6	Reconstruction d'un épiderme de mouton.....	38
4.	Conclusion et perspectives .....	40
5.	Références .....	44
6.	Figures supplémentaires.....	48

# 1 Introduction

## 1.1 Les infections de la peau et la réponse immunitaire

La peau est une barrière protectrice, fournissant la première ligne de défense contre les infections bactériennes et les toxines provenant de l'environnement. Elle est presque exclusivement constituée de kératinocytes mais d'autres constituants sont importants comme les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les follicules pileux ainsi que diverses glandes sécrétrices (Krishna and Miller 2012; Juránová *et al.* 2017; Matejuk 2018). Pendant longtemps, les kératinocytes ont été considérés comme de simples éléments constituant la barrière épidermique. Depuis peu, ils sont considérés comme des cellules contribuant activement à la préservation de la barrière immunitaire (Juránová *et al.* 2017; Maboni *et al.* 2017a; Matejuk 2018).

En effet, ces kératinocytes produisent différents marqueurs inflammatoires tels l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, le TNF $\alpha$ , ... ainsi que des peptides antimicrobiens tels que les cathélicidines, les  $\beta$ -défensines et la dermicidine (Krishna and Miller 2012; Juránová *et al.* 2017; Maboni *et al.* 2017a; Matejuk 2018). L'activation de TLR4 et TLR2 peut, dans certains cas, mener à l'activation de voies de signalisation permettant la transcription et la traduction d'IL-1 $\beta$  qui va alors stimuler les cellules immunitaires jouant un rôle primordial dans la réponse immunitaire innée de la peau en stimulant les cellules impliquées dans celle-ci (Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b).

Dans le cadre d'infections par de bactéries aérobies strictes, anaérobies facultatives ou encore anaérobies strictes, une réponse des kératinocytes par libération d'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  et la  $\beta$ -défensine 2 a déjà été observée suite à l'infection par *Staphylococcus aureus* (Cho *et al.* 2010; Steintraesser *et al.* 2010; Maboni *et al.* 2017b), *Pseudomonas aeruginosa* (Steintraesser *et al.* 2010; Maboni *et al.* 2017b), *Acinetobacter* spp. (de Breij *et al.* 2012) et *Propionibacterium acnes* (Lee *et al.* 2010).

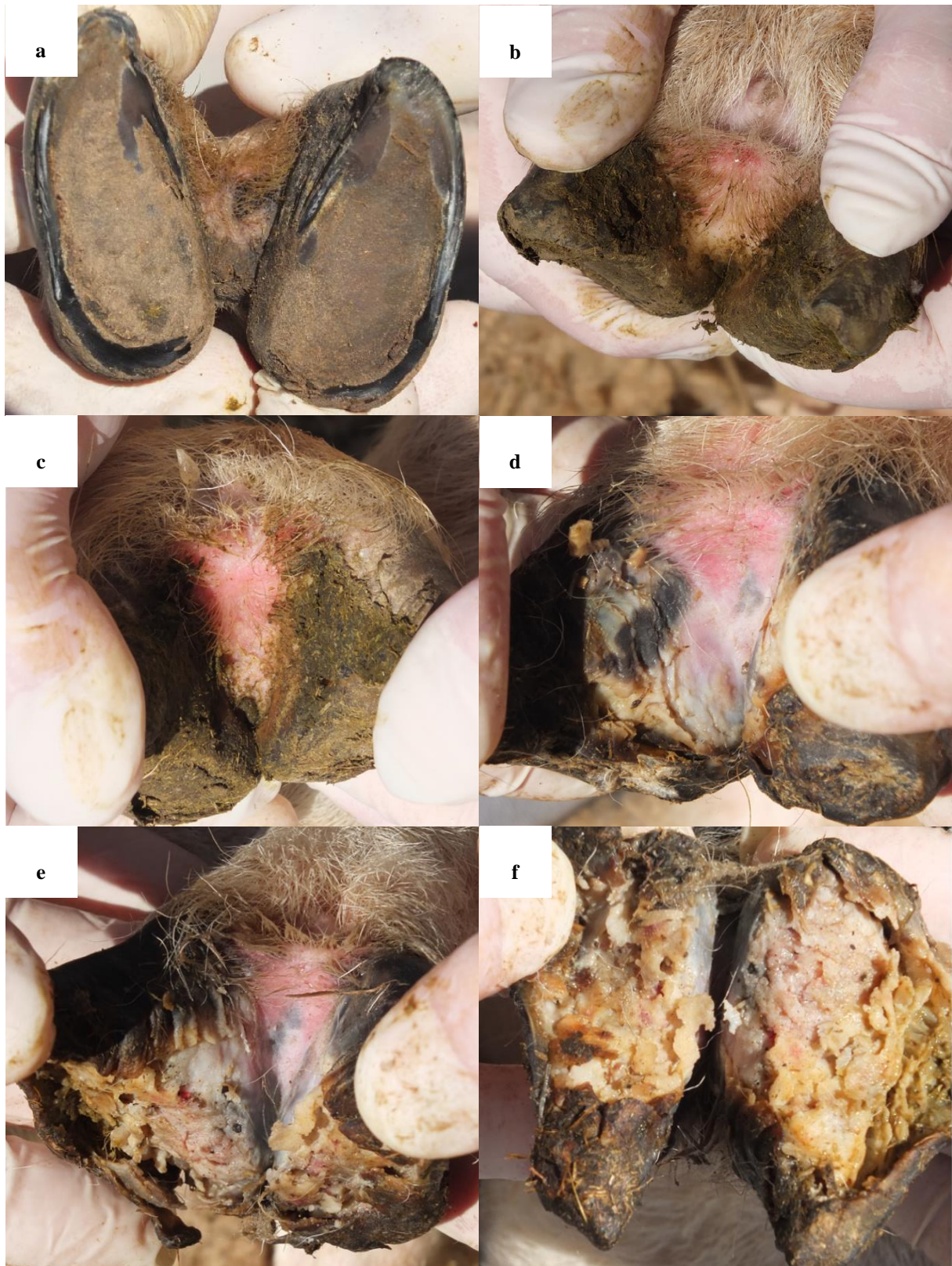
De nombreux modèles d'étude ont été développés pour l'étude d'infections par des organismes pathogènes aérobies ou anaérobies facultatifs. Cependant, à ce jour, aucun modèle permettant d'étudier l'infection par des organismes anaérobies strictes durant plusieurs jours n'a été clairement établi (Maboni *et al.* 2017b).

## 1.2 Le piétin

Le piétin est une maladie infectieuse d'origine bactérienne affectant l'espace interdigité des onglés. Cela commence par une dermatite interdigitée, caractérisée par une inflammation de la couche superficielle de cet espace interdigité. Cette inflammation peut se propager à l'espace sous-jacent de la corne et mener au détachement de celle-ci du reste du pied (appelée *under-running*). Les pieds atteints de piétins sont répartis en scores, allant du pied sain au détachement de la corne (**Figure 1**) (Gauthier 2004; Bennett and Hickford 2011; Frosth *et al.* 2015; Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2016; Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b).

Bien que cette pathologie affecte particulièrement les moutons, dans de rares cas, d'autres ruminants comme les chèvres, les bovins, les camélidés sud-américains (ex : l'alpaga) et les ruminants sauvages (ex : le cerf et le chevreuil) peuvent également être atteints (Zanolari *et al.* 2021).





**Figure 1 | Pieds de moutons atteints de piétin à différents stades de la maladie**

**a.** Pied sain et sec (score 0). **b.** Pied humide, avec espace interdigité inflammé et début de perte de poils (score 1). **c.** Pied avec dermatite interdigitée étendue, corne abimée dans cet espace interdigité (score 2). **d.** Pied avec détachement de la corne au niveau du mur axial, séparation de la corne vers la plante du pied (score 3). **e.** La séparation de la corne s'étend vers l'extérieur du pied, le derme est fortement affecté (score 4). **f.** Séparation complète de la corne qui est détachée du pied, derme abîmé de manière étendue (score 5) (Zanolari *et al.* 2021).



Cette inflammation de l'espace interdigité induit des signes cliniques typiques chez l'animal. De fait, ces animaux présentent une boiterie sévère et restent souvent couchés ou se tiennent debout sur les articulations de leurs membres (**Figure 2**) (Bennett and Hickford 2011; Zanolari *et al.* 2021). L'animal se déplace donc moins, résultant en une diminution de sa prise de nourriture et de son bien-être. Dans les cas les plus sévères, le piétin peut mener à la mort de l'animal (Bennett and Hickford 2011). Le seul traitement curatif est l'injection parentérale d'antibiotiques. Quand on additionne les coûts du traitement et les pertes économiques liées à la diminution du bien-être de l'animal, le coût du piétin peut s'élever à des dizaines de millions d'euros chaque année dans les pays présentant un grand nombre de troupeaux (Bennett and Hickford 2011; Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b).



**Figure 2 | Brebis et agneau présentant des signes cliniques typiques du piétin.**

La brebis se tiens sur 3 pattes, l'agneau broute en se tenant sur ses articulations (Zanolari *et al.* 2021).

La prévalence et la gravité de la pathologie semblent dépendre de l'environnement, des conditions climatiques (température et humidité) ainsi que des conditions d'élevage des animaux (Graham and Egerton 1968; Frosth *et al.* 2015). En effet, des dommages préexistants au niveau des onglons, ainsi qu'un environnement relativement chaud (plus de 10°C) et humide favoriserait l'apparition de lésions au niveau de l'espace interdigité et faciliterait la transmission du piétin au sein d'un troupeau (Bennett *et al.* 2009; Locher *et al.* 2018).

### 1.3 Les microorganismes impliqués dans le piétin

Il a été démontré qu'une seule bactérie est capable de causer le piétin, mais que la présence de certaines autres bactéries induit le développement d'une maladie plus sévère (Egerton *et al.* 1969; Roberts and Egerton 1969; Clifton *et al.* 2019).

### 1.3.1 *Dichelobacter nodosus*

*Dichelobacter nodosus*, précédemment connue sous le nom de *Bacteroides nodosus*, est un bacille Gram négatif. Il s'agit d'une  $\gamma$ -protéobactérie anaérobie stricte qui peut survivre jusqu'à 10 jours en présence d'oxygène (Bennett and Hickford 2011) et même jusqu'à plusieurs semaines dans le sol (Cederlöf *et al.* 2013; Muzafar *et al.* 2016). *D. nodosus* est le principal agent causal du piétin (Skerman 1975; Bennett and Hickford 2011; Frosth *et al.* 2015; Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b; Kuhnert *et al.* 2019; Zanolari *et al.* 2021).

Différents facteurs de virulence ont été identifiés chez *D. nodosus*, tels des protéines de la membrane externe qui interfèrent avec la réponse immunitaire de l'hôte, des protéases, ou encore le fimbriae de type IV qui confère une motilité à la bactérie et lui permet de se lier aux cellules épidermales (Kennan *et al.* 2010; Bennett and Hickford 2011; Clifton and Green 2016; Clifton *et al.* 2019). Dix sérogroupes de *D. nodosus* ont été établis sur base de différentes séquences codant pour le gène *fimA* du fimbriae de la bactérie. Grâce à ces différents sérogroupes, la propagation de la maladie à travers différents troupeaux peut être suivie (Zhou *et al.* 2001). Bien que la plupart des moutons soient infectés par un seul sérotype, un même mouton ou un même pied peut être infecté par de multiples sérotypes différents (Bennett and Hickford 2011; Clifton and Green 2016).

Les protéases produites par *D. nodosus* possèdent différentes caractéristiques ayant une influence sur la virulence de la bactérie. Trois protéases ont été caractérisées et ont été associées à un phénotype virulent (V) ou bénin (B). Il s'agit des protéines *acidic protease isoenzyme 2* (AprV2 ou AprB2), *acidic protease isoenzyme 5* (AprV5 ou AprB5) et *basic protease* (BprV ou BprB) (Kennan *et al.* 2010; Clifton and Green 2016). Chacune de ces protéases est considérée comme un facteur de virulence à part entière mais il a été établi que la protéase Apr2 est le facteur de virulence principal, celui qui permet la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau de l'onglon. Deux souches bactériennes sont donc principalement décrites dans les études épidémiologiques portant sur le piétin : la souche virulente (AprV2) et la souche bénigne (AprB2) (Kennan *et al.* 2010; Clifton and Green 2016). Il a été montré que AprB2 est moins capable de dégrader la matrice extracellulaire qu'AprV2. Cependant, AprB2 est toujours capable de causer le piétin, ce qui suggère que l'activité de l'élastase médiée par AprV2 n'est pas essentielle à l'infection par *D. nodosus* mais qu'elle serait nécessaire pour qu'un isolat de *D. nodosus* provoque une maladie grave (Kennan *et al.* 2010; Maboni *et al.* 2016; Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b). AprV2 et AprB2 sont toutes les deux capables de dégrader la kératine de type I, l'albumine sérique et la sous-unité  $\beta$  de l'hémoglobine mais AprV2 serait plus efficace et pourrait avoir un rôle direct dans la destruction de la kératine de l'onglon (Kennan *et al.* 2010).

La souche virulente et la souche bénigne de *Dichelobacter nodosus* ne diffèrent que par deux paires de bases au niveau de la séquence du gène de *apr*. Ceci se traduit par une différence d'un seul acide aminé (Y92R) qui peut être discriminée par PCR compétitive en temps réel (Frosth *et al.* 2012; Stäuble *et al.* 2014; Kuhnert *et al.* 2019). Cette différence d'un acide aminé confère une thermostabilité à AprV2 (Depiazzi *et al.* 1990; Stäuble *et al.* 2014).

Bien que le facteur principal permettant de déterminer la virulence ou non d'une souche de *D. nodosus* soit la détection du gène *aprV2* (Maboni *et al.* 2017b), certains articles se basent plutôt sur la détection du gène *intA* (Frosth *et al.* 2015; Wani *et al.* 2019) qui pourrait également être impliqué dans la virulence, bien qu'il n'y ait pour l'instant pas de consensus (Frosth *et al.* 2015).

Il a été démontré que *D. nodosus* est présent de manière plus fréquente et en plus grand nombre au niveau des pieds atteints de dermatite interdigitée que de *under-running*. Ces moutons atteints de dermatite interdigitée seraient donc plus contagieux et il est nécessaire de les isoler et de les traiter au plus vite, afin d'éviter de nouvelles contaminations au sein du troupeau (Witcomb *et al.* 2014; Witcomb *et al.* 2015; Maboni *et al.* 2016; Clifton *et al.* 2019). De plus, il a été observé que la bactérie peut déjà être présente en grandes quantités au niveau des pieds de mouton avant même l'apparition des signes cliniques, ce qui signifie que l'isolement des moutons symptomatiques pourrait ne pas suffire à arrêter la propagation de la maladie au sein d'un troupeau (Kuhnert *et al.* 2019).

Il est intéressant de noter que, dans les pays où le piétin est endémique (ex : Angleterre et Australie), la souche virulente de *Dichelobacter nodosus* (AprV2) semble être majoritairement présente, tandis que dans les pays où le piétin n'est pas endémique (ex : les pays Scandinaves), on retrouve surtout la souche bénigne (AprB2) (Frosth *et al.* 2015).

### 1.3.2 *Fusobacterium necrophorum*

La deuxième bactérie communément retrouvée au niveau de lésions caractéristiques du piétin est *Fusobacterium necrophorum*, une autre bactérie gram négative et anaérobie stricte (Bennett and Hickford 2011; Frosth *et al.* 2015; Maboni *et al.* 2017a). Cette bactérie fait partie de la flore commensale digestive des moutons et pourrait se retrouver au niveau des fèces, ce qui contaminerait l'environnement (Maboni *et al.* 2016). Deux souches de *Fusobacterium necrophorum* sont principalement retrouvées au niveau de pieds atteints par le piétin : *F.n. necrophorum* et *F.n. fundiliforme* (Frosth *et al.* 2015). *F. n. necrophorum* semble être plus pathogénique. Il est intéressant de noter que la sous-espèce *necrophorum* semble être plus prévalente dans les régions où le piétin est endémique, tandis que la sous-espèce *fundiliforme* semble être plus prévalent dans les pays où le piétin n'est pas endémique (Bennett and Hickford 2011; Witcomb *et al.* 2015; Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2016). En revanche, contrairement à *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* est détectée en plus grand nombre sur les pieds de moutons atteints de formes sévères du piétin qu'au niveau de moutons atteints de dermatite interdigitée (Maboni *et al.* 2016).

Le rôle précis de *F. necrophorum* dans le piétin est à ce jour toujours incertain. En effet, deux théories sont principalement retrouvées dans la littérature. La première suggère que la présence de *F. necrophorum* au niveau de l'espace interdigité faciliterait la colonisation de l'épiderme par *D. nodosus* et faciliterait donc le développement de la dermatite interdigitée (Egerton *et al.* 1969; Roberts and Egerton 1969). La seconde théorie suggère que *F. necrophorum* agirait plutôt comme un organisme opportuniste qui interviendrait de manière secondaire au niveau de l'infection, une fois la barrière épidermique affaiblie. La bactérie jouerait alors un rôle dans la persistance et la gravité du piétin (Bennett *et al.* 2009; Frosth *et al.* 2015; Witcomb *et al.* 2015; Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2016; Clifton *et al.* 2019).

Bien que le rôle de *F. necrophorum* dans le piétin ne soit pas encore élucidé, cette bactérie est capable de causer de nombreuses pathologies. Par exemple, chez l'humain, *Fusobacterium necrophorum* est responsable du syndrome de Lemierre (Laurencet *et al.* 2019; Reymond *et al.* 2019), de certains cas de pharyngite (Van *et al.* 2017), sinusites et d'autres inflammations (Yusuf *et al.* 2015). Chez les bovins, cette bactérie peut également causer du piétin mais également des abcès, notamment au niveau du foie (Checkley *et al.* 2005). Elle est également connue pour causer une pneumonie chez le mouflon (Shanthalingam *et al.* 2016).

### 1.3.3 Autres bactéries impliquées

De nombreuses familles de bactéries sont couramment retrouvées au niveau de pieds atteints de piétin et semblent jouer un rôle d'opportunistes. On y retrouve notamment des corynébactéries, des flavobactéries, des spirochètes (dont *Treponema* spp.) et des mycoplasmes. Il a été rapporté que la présence de certaines de ces bactéries telles les spirochètes et les mycoplasmes était associée à une inflammation importante au niveau de la lésion (Maboni *et al.* 2017a). Ces bactéries sont par ailleurs connues pour causer des inflammations de l'espace interdigité chez les ovins et les bovins (Frosth *et al.* 2015). Cependant, il n'existe à ce jour aucune preuve de leur implication dans le développement de la maladie (Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2016).

### 1.3.4 Interaction entre les organismes pathogènes

La dynamique bactérienne lors de l'initiation du piétin n'est à ce jour pas claire. Jusqu'à présent, les études se sont focalisées sur *D. nodosus* et *F. necrophorum* afin de mieux comprendre la colonisation des tissus par ces bactéries, la progression de la maladie, l'identification des facteurs de virulence et leurs mécanismes d'action. Le rôle des autres bactéries communément retrouvées au niveau des lésions est donc très mal connu (Maboni *et al.* 2016; Maboni *et al.* 2017a).

L'étude des interactions entre, dans un premier temps, *Dichelobacter nodosus* et l'espace interdigité du mouton (ou un modèle), et par la suite l'interaction de cet espace interdigité avec *Fusobacterium necrophorum* et les autres bactéries potentiellement impliquées pourrait permettre d'élucider le rôle de ces différentes bactéries lors du développement de l'infection et de la maladie.

## 1.4 Diagnostic

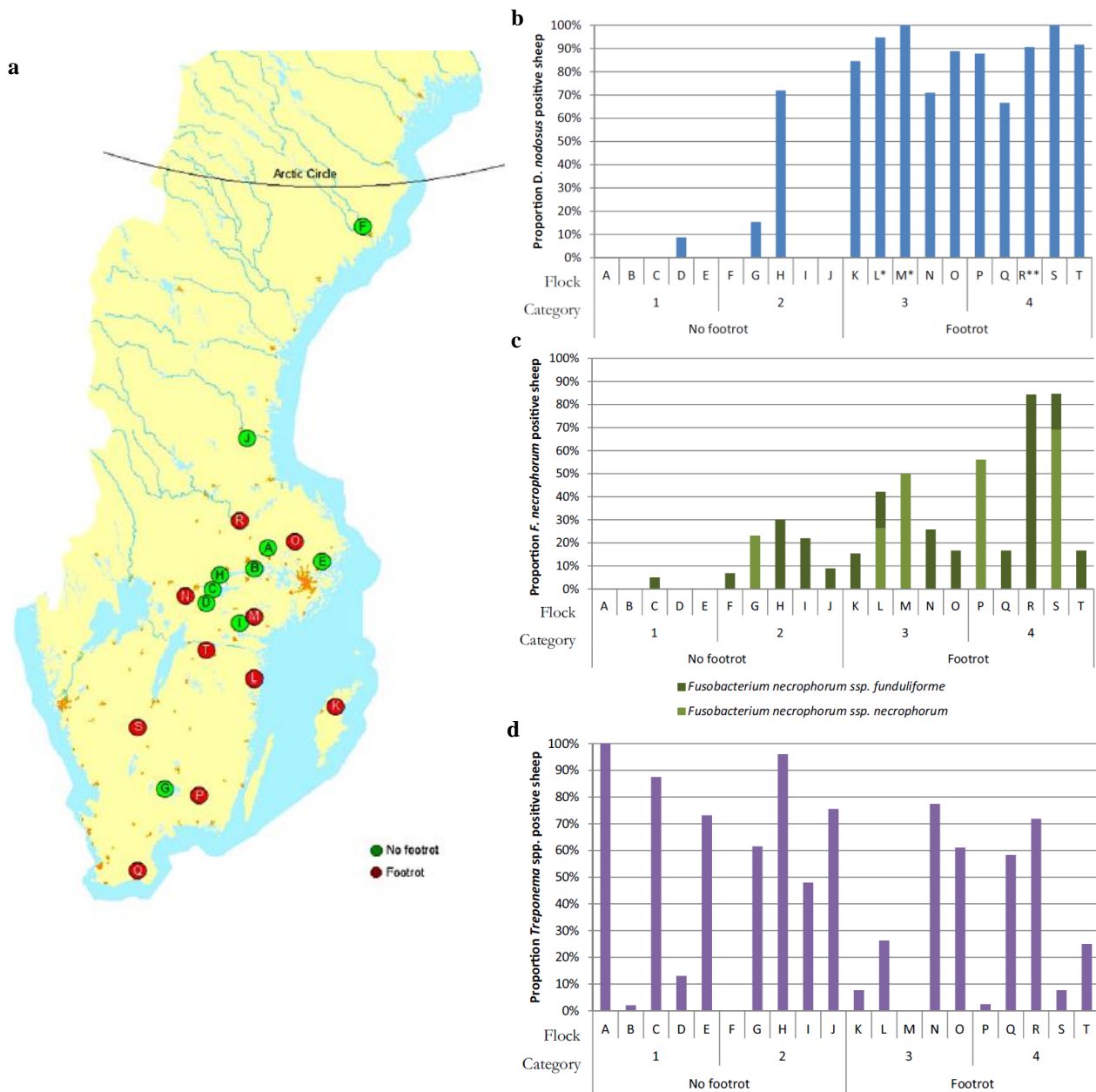
Le diagnostic du piétin se base principalement sur un examen clinique des pieds en suivant un système de scores (Gauthier 2004). Ce diagnostic se base généralement sur plusieurs facteurs tels des changements de conformation de la corne, le comportement de l'animal et l'odeur typique de la lésion. Afin de s'assurer du statut de l'animal, un frottis au niveau des quatre pieds du mouton, associé à la détection de *D. nodosus* et la caractérisation de la souche par real time PCR compétitive peut venir compléter le diagnostic (Stäuble *et al.* 2014; Frosth *et al.* 2015; Zanolari *et al.* 2021).

## 1.5 Épidémiologie

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées dans divers pays.

En 2015, une étude épidémiologique a été réalisée en Suède pour déterminer la proportion de *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* et *Treponema* spp. chez des individus issus de 20 troupeaux classés comme sains (catégories 1 et 2) ou atteints de piétin (catégories 3 et 4) (**Figure 3 a**). La catégorie 1 correspond à des troupeaux au sein desquels la majorité des animaux ont un score de 0 et où aucun animal n'a un score supérieur à 1. La catégorie 2 correspond à des troupeaux où un nombre important d'animaux présentent un score de 1 mais aucun animal n'a de score supérieur à 1. La catégorie 3 correspond aux troupeaux au sein desquels au moins 1 animal a un score de 2. La catégorie 4 correspond aux troupeaux au sein desquels au moins 1 animal a un score de 3 ou plus. En parallèle de ce classement la virulence et les sérogroupes de *D. nodosus* ont été caractérisés (Frosth *et al.* 2015).





**Figure 3 | Localisation géographique des troupeaux recensés et proportion de *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* et *Treponema* spp. au sein de ces troupeaux.**

**a.** Localisation géographique des 20 troupeaux recensés. Proportion de moutons positifs pour **b.** *D. nodosus*, **c.** *F. necrophorum*, **d.** *Treponema* spp. au sein des différents troupeaux répartis en fonction du statut clinique du troupeau. \* Troupeaux positifs pour le gène *intA*. \*\* Troupeaux positifs pour le gène *intA* et le gène *aprV2*. Figure adaptée à partir de (Frosth *et al.* 2015).

La présence de *D. nodosus* a été détectée au niveau de pieds de moutons de troupeaux affectés par le piétin mais également au niveau de troupeaux sains. Cependant, *D. nodosus* était détectée plus fréquemment dans les troupeaux atteints de piétins que dans les troupeaux exempts de la maladie. Le gène *intA* a été détecté dans trois des 20 troupeaux recensés tandis que le gène *aprV2* n'a été détecté que dans un seul troupeau. Ces deux gènes associés à la virulence n'ont été détectés que dans des troupeaux affectés par le piétin (**Figure 3 b**). Le gène *aprB2*, quant à lui, a été détecté dans 12 troupeaux, dont 9 affectés par le piétin (Frosth *et al.* 2015).

Au total, sur tous les pieds testés, 14% ont été classés comme affectés par le piétin parmi lesquels 36% (0,3% au total) de cas sévères ont été recensés. *D. nodosus* a été détectée sur 40% des pieds, dont 13% étaient atteints de piétin. Il a été déterminé que le risque de développement du piétin était multiplié par 13 lorsque *D. nodosus* était présente au niveau du pied. Ils ont également déterminé que, bien que la présence de la souche AprV2 ou AprB2 ne semblait pas avoir d'effet significatif sur le développement du piétin, la présence de bactéries virulentes augmentait le risque de développer une forme sévère. En revanche, la détection du gène *inta* ne semblait pas corrélérer avec le développement du piétin, qu'il s'agisse d'une forme sévère ou non (Frosth *et al.* 2015).

*Fusobacterium necrophorum*, a été détectée dans 16 des 20 troupeaux testés. Il est intéressant de noter *F. necrophorum necrophorum* n'a été détectée que dans 5 de ces troupeaux, tandis que *F. necrophorum fundiliforme* a été détectée dans 13 troupeaux, dont deux où *F. necrophorum necrophorum* a également été détectée (**Figure 3 c**). Les bactéries du genre *Treponema* spp. ont quant à elle été détectées dans 18 des 20 troupeaux (**Figure 3 d**) (Frosth *et al.* 2015).

Sur les tous les pieds recensés pour la détection de *F. necrophorum* et de *Treponema* spp., 23% étaient positifs pour *F. necrophorum* (8% pour *F. n. necrophorum*, 14% pour *F. n. fundiliforme* et 0,8% pour les deux). Ils ont ainsi pu déterminer que le risque de développer le piétin était augmenté de 5,5 fois lorsque *F. necrophorum* était présent au niveau du pied, avec un plus grand risque encore (9,5 fois) lorsque c'est *F. n. necrophorum* qui est présente. Ils ont également déterminé que la présence de *F. necrophorum* induisait un plus grand risque de développer une forme sévère du piétin. Les bactéries de type *Treponema* spp. ont quant à elle été détectées au niveau de 41% des pieds mais aucune corrélation n'a pu être établie avec le piétin (Frosth *et al.* 2015). Bien qu'aucune association n'ait pu être établie entre la présence de bactéries autres que *D. nodosus* et la classification des troupeaux, il a été montré que *F. necrophorum*, peu importe la sous-espèce, était plus présente dans les troupeaux de catégories 2 à 4 que dans la catégorie 1 (Frosth *et al.* 2015).

Dans le cadre d'une étude épidémiologique réalisée sur les troupeaux de 16 fermes suisses, 2 fermes allemandes et 8 fermes françaises, des résultats différents ont été observés. En effet, des bactéries virulentes ont été détectées au niveau de tous les troupeaux atteints de piétin, sans détection de bactéries bénignes. En revanche, dans les troupeaux non-atteints, la bactérie bénigne était majoritairement détectée (80%). Les deux souches de bactéries ont été retrouvées simultanément au niveau de deux troupeaux qui avaient régulièrement des récurrences du piétin mais étaient non-affectés au moment de l'étude (Stäuble *et al.* 2014).

Il semblerait donc que la prévalence des souches virulentes et bénignes de *D. nodosus*, ainsi que la prévalence des autres bactéries impliquées dans le piétin varierait d'un troupeau à l'autre, mais surtout d'une région géographique (ou pays) à l'autre.

## 1.6 Transmission du piétin

Le piétin étant une maladie qui affecte les moutons partout dans le monde, et coûtant des dizaines de millions de dollars aux pays où l'élevage de mouton est fort répandu (Bennett and Hickford 2011; Clifton and Green 2016), il est essentiel de comprendre la transmission de la maladie afin de pouvoir limiter la propagation de celle-ci au sein d'un troupeau, mais également pour limiter l'apparition du piétin dans les fermes non-affectées.

Il a été déterminé que, une fois l'onglon d'un mouton infecté par *Dichelobacter nodosus*, la bactérie peut rester présente au niveau de l'épiderme interdigité ou au niveau de lésions dans la



corne de cet onglon pendant plusieurs mois et infecter le sol. Suivant la composition de celui-ci et suivant la température extérieure, les bactéries peuvent y survivre jusqu'à plus de 30 jours. Durant cette période, les bactéries peuvent infecter d'autres moutons et ainsi répandre la maladie (Whittington 1995; Bennett and Hickford 2011; Cederlöf *et al.* 2013; Muzafar *et al.* 2016). Cette survie de plus de 30 jours dans le sol est inquiétante car elle est plus longue que la recommandation de mise au repos du pré de 14 jours effectuée dans le but de prévenir l'infection des moutons (Muzafar *et al.* 2016). La transmission de *D. nodosus* étant favorisée dans un environnement humide et des températures supérieures à 10°C, deux hypothèses circulent principalement pour expliquer cet effet de l'environnement : l'humidité pourrait modifier le pied de mouton en le rendant plus vulnérable aux infections bactériennes, ou bien la biologie de la bactérie pourrait être modifiée dans ces conditions, la rendant plus agressive (Graham and Egerton 1968; Bennett and Hickford 2011).

En 2018, des chercheurs suisses ont analysé les pieds de moutons se trouvant sur les marchés et les foires aux bestiaux. Il est interdit d'amener un mouton atteint de piétin dans les foires. Le nombre de pieds contaminés par *D. nodosus* y était donc inférieur à celui observé aux marchés, où le taux de contamination atteignait parfois 100% des moutons (Locher *et al.* 2018). Il en a été conclu que les infections dans les troupeaux où aucun cas de piétin n'avait été recensé au préalable étaient probablement dues à l'arrivée d'un nouveau mouton qui était contaminé par la bactérie. Afin de limiter la transmission de la maladie, il a donc été recommandé d'acheter uniquement des animaux provenant de troupeaux exempts de piétin (Locher *et al.* 2018). Le piétin peut également être transmis de mères positives aux agneaux négatifs. La transmission de la bactérie peut être détectée dès 3 jours après le contact initial et les premiers symptômes de piétin peuvent apparaître dès 14 jours après ce contact (Kuhnert *et al.* 2019; Zanolari *et al.* 2021).

Il a été estimé que plus de 90% des troupeaux anglais (Clifton and Green 2016), plus de 57% des troupeaux suisses (Locher *et al.* 2018) et environ 6% des moutons suédois (Frosth *et al.* 2015) sont atteints de piétin. Il est donc important de mieux comprendre l'apparition, le développement et la transmission de la pathologie, afin de pouvoir développer des campagnes de prévention.

## 1.7 Prévention

### 1.7.1 Vaccination

Les dix sérogroupes de *D. nodosus* mènent à la production d'anticorps différents, sans aucune cross-protection entre eux. L'immunisation d'un mouton par un de ces sérogroupes ne protège donc pas contre l'infection par un autre séro groupe (Clifton and Green 2016). Différents vaccins contre le piétin sont efficaces, à la fois pour traiter la maladie mais également pour prévenir son apparition. Il s'agit de vaccins multivalents (généralement des vaccins à base des 10 sérogroupes inactivés) qui permettent de vacciner contre les différents sérogroupes. Cependant, ils ne sont pas utilisables à large échelle car leur effet protecteur contre les différents sérogroupes varie d'un individu à l'autre (Raadsma *et al.* 1999; Bennett and Hickford 2011).

Puisque les sabots de la plupart des moutons atteints de piétin ne sont colonisés que par un seul séro groupe de *D. nodosus*, il serait intéressant de développer des vaccins monovalents, qui seraient utilisés pour le traitement et la prévention d'une épidémie en particulier, afin de garantir l'immunisation des troupeaux contre ce séro groupe. Dans le cas des infections par deux sérogroupes, la vaccination avec un second vaccin monovalent après quelques mois pourrait être envisagée (Bennett and Hickford 2011; Dhungyel *et al.* 2014).

### 1.7.2 Parage de l'onglon

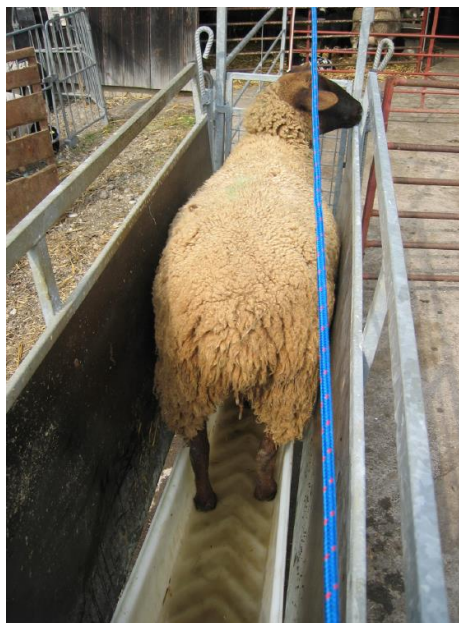
Le parage de l'onglon permet de retirer les tissus malades ou mal formés de la corne (Abbott and Lewis 2005; Bennett and Hickford 2011). De plus, enlever la corne excessive ou mal formée peut également servir de traitement du piétin en retirant une partie des bactéries présentes au niveau de la corne. L'utilisation de cette pratique, combinée à d'autres types de traitements améliorerait l'efficacité de ceux-ci (Abbott and Lewis 2005).

Cette pratique doit néanmoins être réalisée avec soin, afin d'éviter tous dégâts à l'onglon, et ainsi limiter la pénétration des bactéries au sein du pied où elles pourraient s'établir et causer une inflammation (Green and George 2008; Bennett and Hickford 2011; Locher *et al.* 2018). Il a été démontré que le couteau utilisé pour le parage de l'onglon est un vecteur important de transmission des bactéries. Par conséquent, il est recommandé de désinfecter régulièrement le couteau, de porter des gants propres et d'éliminer correctement la corne, afin de limiter au maximum la transmission de la bactérie (Locher *et al.* 2018).

### 1.7.3 Pédiluve

Les pédiluves sont un moyen rapide de traiter un nombre important de moutons. Les moutons sont amenés dans des solutions de formol, de cuivre ou de sulfate de zinc pour y faire tremper leurs pieds (**Figure 4**). Ces solutions sont bactéricides mais certaines d'entre elles sont hautement toxiques pour les moutons ainsi que pour les humains. Il existe donc de nombreux risques biologiques tels que le développement de lésions ou de cancers suite à l'utilisation de ces pédiluves (Abbott and Lewis 2005).

La concentration des solutions et le temps que les moutons passent dans le pédiluve varient d'une ferme à l'autre, ce qui rend difficile l'étude de l'efficacité de ce type de traitement. Une normalisation des pratiques permettrait d'évaluer l'efficacité réelle des pédiluves dans le traitement et la prévention du piétin (Härdi-Landerer *et al.* 2019).



**Figure 4** | Mouton passant dans un pédiluve contenant une solution de formaldéhyde (Zanolari *et al.* 2021).

#### 1.7.4 Éradication du piétin

Pour parvenir à éradiquer le piétin, il faudra avoir recours à une combinaison de différents traitements et méthodes de prévention telles l'administration d'antibiotiques, l'utilisation de pédiluves, le traitement rapide et la mise en quarantaine stricte des moutons infectés, voir même la mise à mort de ces moutons. Si possible, il faudrait également sélectionner génétiquement les moutons afin qu'ils soient naturellement résistants au piétin (ex : moutons Romney) (Abbott and Lewis 2005; Green and George 2008; Bennett and Hickford 2011). Ce type de programme d'éradication peut mettre des années à porter ses fruits et les résultats peuvent être variables en fonction du climat de la région où il est expérimenté. Il est très important de réaliser des contrôles fréquents et de s'assurer que les éleveurs soient sensibilisés à la problématique et aux méthodes de prévention (Bennett and Hickford 2011).

Des programmes d'éradication ont déjà été implémentés dans diverses régions comme l'Australie ou la Suisse. En Australie, le bon timing de ces méthodes de prévention avec les périodes très sèches, rendant difficile la transmission de *D. nodosus* a permis d'arriver à une prévalence du piétin inférieure à 1% dans certaines régions (Bennett and Hickford 2011).

### 1.8 Modèles d'étude

De nombreux modèles d'étude ont été développés afin d'étudier la prévalence, la transmission d'infections cutanées et de comprendre les relations hôte-pathogène associées.

#### 1.8.1 Étude *in vivo*

Des études ont été menées *in vivo*, sur des moutons, afin de tenter de comprendre la dynamique de l'infection dans le cas du piétin. Ces études ont permis d'identifier l'agent causal principal du piétin (*D. nodosus*) (Egerton *et al.* 1969; Roberts and Egerton 1969), d'étudier la transmission par contact de la pathologie (Kuhnert *et al.* 2019) et ont permis la mise en évidence d'une éventuelle implication d'autres bactéries couramment retrouvées au niveau de lésions de piétin, en particulier *Fusobacterium necrophorum* (Egerton *et al.* 1969; Roberts and Egerton 1969).

Cependant, les études *in vivo* présentent un certain nombre de limitations, principalement en raison de problèmes d'éthique et du coût de ces études. En effet, ce type d'étude expose les animaux enrôlés à de la douleur, à un mal-être et peut même se terminer par l'euthanasie des animaux enrôlés. Ce type d'étude doit donc être approuvé par un comité d'éthique (Maboni *et al.* 2017b). Des alternatives aux études sur animaux ont donc été développées.

Afin de limiter ces contraintes éthiques, d'autres animaux que des moutons peuvent être utilisés comme modèles dans un premier temps (ex : des souris). Cependant, il est possible que ces autres animaux aient une réponse immunitaire et une architecture de la peau qui diffère de celle du mouton, ce qui rend difficilement comparable et interprétable les différents modèles (Popov *et al.* 2014).

#### 1.8.2 Cultures primaires

Les cultures de kératinocytes humains peuvent facilement être obtenues à partir de biopsies de peau (De Vuyst *et al.* 2014). Ces cultures donnent une première idée de la réponse cellulaire et tissulaire suite à une infection, notamment par la production de marqueurs inflammatoires. Cependant, les cultures en monocouches ne reflètent pas tous les processus inter-cellulaires et

tissulaires, leur application est donc limitée. En effet, l'expression génique et protéique de ces cellules en monocouche peut varier par rapport à ce qui est observé *in vivo*. (Steinstraesser *et al.* 2010; Popov *et al.* 2014; Maboni *et al.* 2017b).

Le seul modèle d'étude *in vitro* mis au point et servant à l'étude du piétin est celui mis au point par Davenport *et al.* Il s'agit d'un modèle de culture primaire de fibroblastes ovins qui a permis de déterminer l'implication de ces derniers dans la réponse inflammatoire, notamment via une augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et de TLR2 (Davenport *et al.* 2014).

### 1.8.3 Modèles 3D

Les modèles de culture cellulaire en 3D offrent de nombreux avantages tels la présence de différents types cellulaires composant le tissu et la conservation de la structure de celui-ci. Il s'agit d'une alternative à l'expérimentation animale qui est proportionnellement moins coûteuse. Ce type de modèles est considéré comme étant phénotypiquement et histologiquement similaires à ce qui est observé *in vitro* (Maboni *et al.* 2017b).

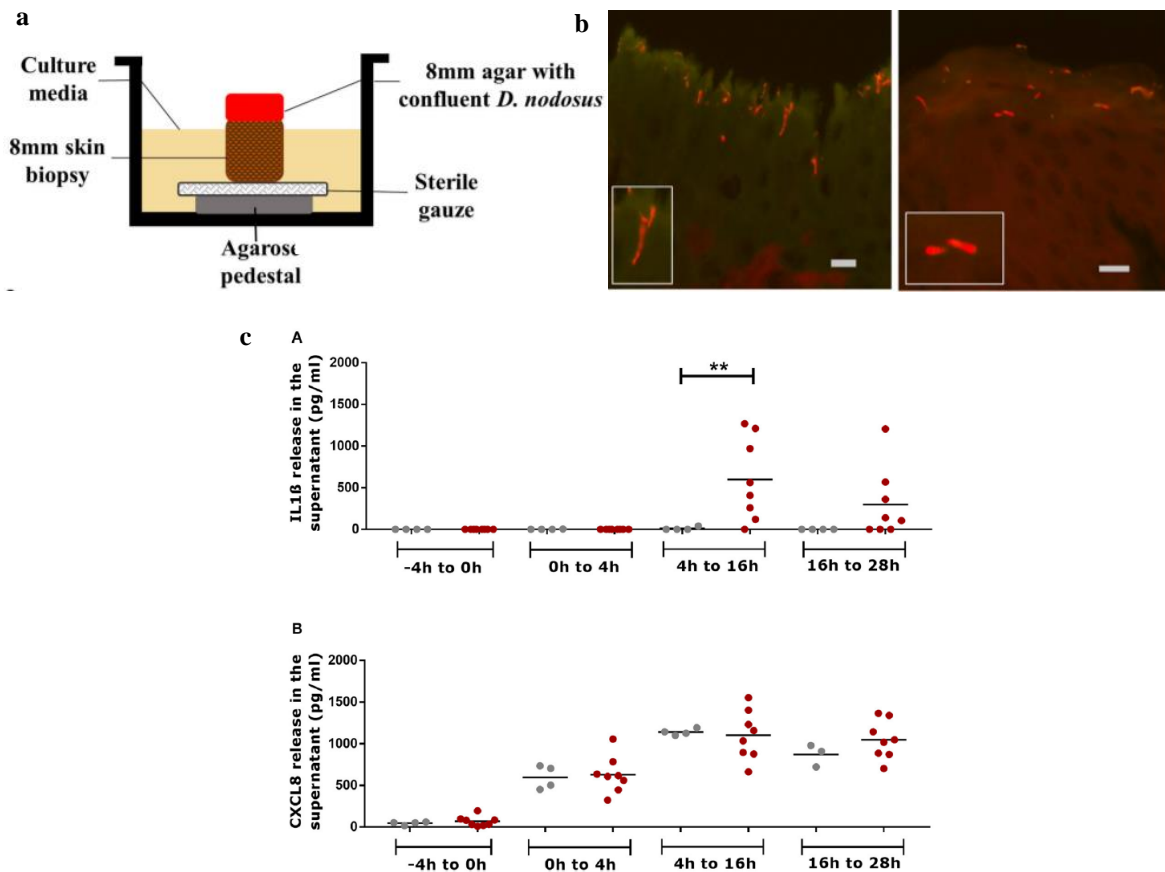
#### 1.8.3.1 Biopsie de peau

L'utilisation d'explants de peau de mouton obtenues post-mortem peut servir à l'étude de l'infection par des bactéries anaérobies (quantification et visualisation de la bactérie) et de la réponse du tissu face à cette infection (histologie et libération de marqueurs inflammatoires dans le milieu). Ces explants sont déposés sur un support d'agar recouvert de gaze chirurgicale. Pour mimer les conditions de l'espace interdigité (humide et avec une faible alimentation en oxygène), un bouchon d'agar, contenant ou non des bactéries, est placé sur la peau (**Figure 5 a**).

Il a ainsi été montré que les deux souches (virulente et bénigne) de *D. nodosus* sont capables de pénétrer les couches superficielles de la peau (jusqu'à la couche granuleuse) (**Figure 5 b**) et de déclencher la libération de cytokines inflammatoires dans le milieu de culture, notamment IL-1 $\beta$  (**Figure 5 c**). Cependant, *D. nodosus* n'est pas capable de pénétrer le derme. Le processing du précurseur d'IL-1 $\beta$  (**Figure 5 c**) et sa libération dans le milieu de culture montre que l'inflammasome (contenant la caspase-1) est impliqué dans la réponse inflammatoire liée à l'infection par *D. nodosus*. Aucune réponse via libération d'IL-8 n'a été observée (**Figure 5 d**) (Maboni *et al.* 2017b).

L'ADN et l'ARN peuvent être extraits à partir de ces biopsies de peau afin d'étudier la réponse inflammatoire induite par la présence et l'abondance de *D. nodosus* et d'autres bactéries. Il a ainsi été observé qu'il y avait une corrélation entre le taux de *D. nodosus* présent au niveau de l'espace interdigité du mouton et la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8. Cependant, il est impossible de déterminer si *D. nodosus* cause cette inflammation ou si c'est l'inflammation qui facilite la colonisation par *D. nodosus* (Maboni *et al.* 2017a).

Ce type de modèles existe également chez l'humain à partir de peaux provenant de chirurgies ou obtenues post-mortem. Ces peaux peuvent alors être conservées jusqu'à deux semaines (Popov *et al.* 2014). Cependant, pour l'étude d'infections par des organismes anaérobies, la peau doit se trouver dans un environnement dépourvu d'oxygène, ce qui réduit fortement la viabilité du modèle et ne permet pas d'étudier la cinétique de l'infection sur une durée supérieure à 28 heures (Maboni *et al.* 2017b).



**Figure 5 | Utilisation d'un modèle de biopsie de peau pour l'étude de l'infection par *Dichelobacter nodosus***  
**a.** Assemblage du modèle. **b.** Détection de *D. nodosus* par *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) au niveau des couches superficielles de l'épiderme. Échelle (gris) 10  $\mu$ m. **c.** Accumulation d'IL-1 $\beta$  dans le milieu de culture suite à l'infection. **d.** Accumulation de CXCL8 (IL-8) dans le milieu de culture suite à l'infection.

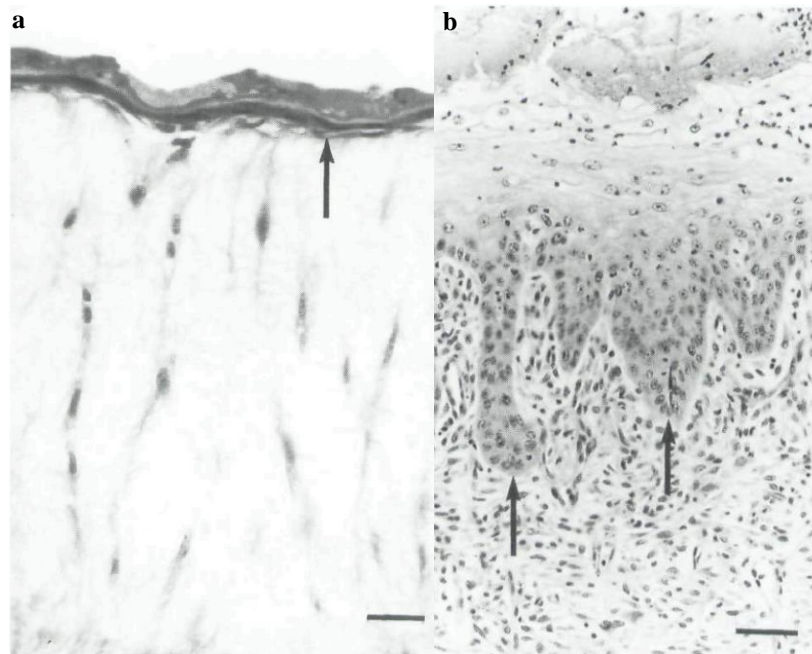
### 1.8.3.2 Épiderme reconstruit

Le modèle d'épidermes humains reconstruits (RHE) est couramment utilisé dans différents domaines, notamment la biologie, la toxicologie, la médecine, la pharmacologie et la cosmétologie. Il existe différentes techniques permettant l'obtention de ce type de modèles : la différenciation des kératinocytes sur un support qui peut être un filtre de polycarbonate, sur une matrice extracellulaire à base de collagène ou sur une matrice extracellulaire contenant des fibroblastes (Watson *et al.* 1994; Scagliarini *et al.* 2005; De Vuyst *et al.* 2014; Popov *et al.* 2014; Souci and Denesvre 2021). Dans les trois cas, des kératinocytes primaires sont collectés à partir d'une biopsie de peau puis mis en culture en monocouches pour être amplifiés avant d'être ensemencés sur le support de différenciation. Ces kératinocytes sont alors exposés à l'interface air-liquide pour qu'ils se différencient. Après deux semaines de différenciation, un épiderme stratifié semblable à de la peau *in vivo* est obtenu (De Vuyst *et al.* 2014; Souci and Denesvre 2021). Afin de rendre le modèle le plus proche possible de la peau *in vivo*, différents types cellulaires, telles les cellules de Langerhans, les cellules nerveuses et les cellules endothéliales peuvent être incorporés dans l'épiderme reconstruit (Auxenfans *et al.* 2009; Popov *et al.* 2014).

Un épiderme reconstruit a une viabilité assez longue, ce qui permet d'observer la réplication de la bactérie à la surface de l'épiderme et d'étudier l'invasion de celui-ci par un agent infectieux. (Popov *et al.* 2014).



Ce modèle a depuis été adapté chez certaines espèces animales, dont le lapin, le cheval, le chien et le mouton (Souci and Denesvre 2021). Un seul modèle d'épiderme reconstruit de mouton a été développé, en 1994, et a été reconstruit sur une matrice de collagène et de fibroblastes. Des kératinocytes différenciés ont ensuite été déposés sur cette matrice et ont été incubés pendant 7 jours (**Figure 6 a**), après quoi les équivalents de peau ont été greffés sur des animaux hôtes pendant 14 jours pour favoriser la différenciation du tissu. Un épiderme épais, complètement différencié et avec des papilles dermiques a pu être observé (**Figure 6 b**) (Watson *et al.* 1994).



**Figure 6 | Coupes histologiques d'équivalents de peau de mouton.**

**a.** Équivalent de peau après 7 jours de différenciation à l'interface air-liquide. L'épiderme présente différentes couches et a une morphologie écrasée. Échelle 30  $\mu\text{m}$  **b.** Équivalent de peau 14 jours après avoir été greffé à un mouton. L'épiderme s'est épaissi et des papilles dermiques sont visibles. Échelle 50  $\mu\text{m}$  (Watson *et al.* 1994).

Il semblerait que le piétin soit modulé par la colonisation bactérienne et la réponse immunitaire locale menant à une inflammation importante pouvant causer la séparation des tissus (Maboni *et al.* 2017a). Le mécanisme d'infection par les différentes bactéries impliquées et la réponse immunitaire suite à cette infection restent cependant très peu connus. Différentes études ont tenté de faire la lumière sur ces processus (Egerton *et al.* 1969; Roberts and Egerton 1969; Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b) mais cette dynamique d'infection et la réponse tissulaire qui y est liée restent très peu connues.

Il est donc important de développer un modèle d'étude *in vitro* du piétin, afin de tenter de mieux comprendre les mécanismes d'infections et la réponse immunitaire associés à la maladie. Durant ce mémoire, notre but est d'étudier l'expression de divers marqueurs inflammatoires (cytokines et peptides antimicrobiens) ainsi que la réponse cellulaire et tissulaire faisant suite à l'infection par *Dichelobacter nodosus* et *Fusobacterium necrophorum*. Pour ce faire, un modèle d'épiderme ovin reconstruit a été développé selon une adaptation de la méthode décrite par De Vuyst *et al.* en 2014. Pour cela, il a d'abord fallu caractériser les souches bactériennes utilisées.



## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches de *Dichelobacter nodosus* bénigne (souche MM277) et virulente (souche MM261) ont été obtenues via une collaboration avec la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Nottingham. La souche de *Fusobacterium necrophorum necrophorum* (17/ A0051) a été obtenue via une collaboration avec l'université de Bern.

### 2.2 Culture de *Dichelobacter nodosus* et *Fusobacterium necrophorum* en milieu liquide

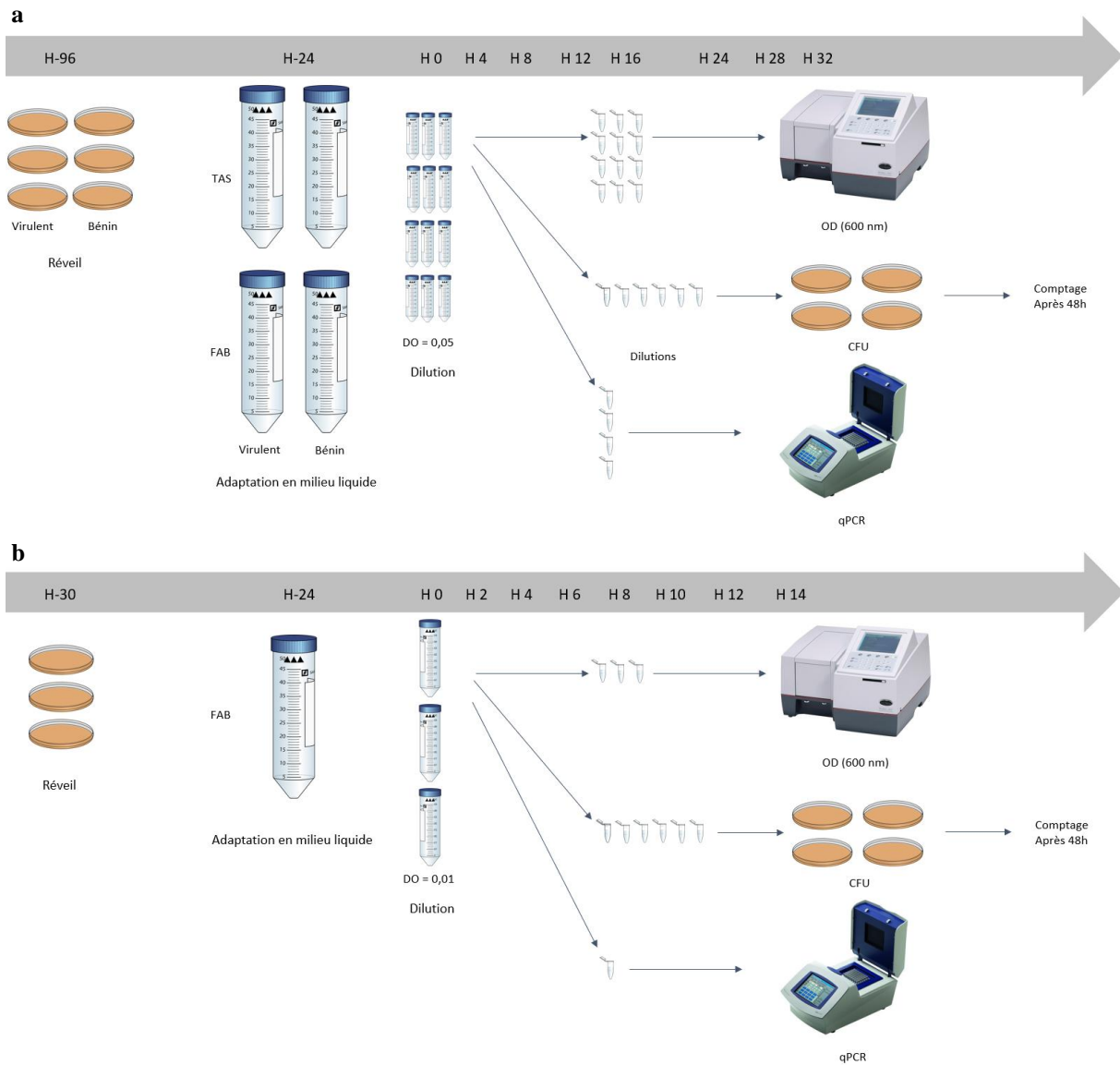
Afin d'étudier la cinétique des souches de bactéries en milieu liquide, les bactéries ont été réveillées sur glace puis étalées sur des géloses contenant du sang de cheval [*Fastidious Anaerobe Agar* (F.A.A.) avec sang de cheval (FHB) (Oxoid)] et ont été incubées durant 72 (*D. nodosus*) ou 24 (*F. necrophorum*) heures dans une chambre d'anaérobiose [Bugbox M (Baker®)]. Les bactéries ont ensuite été récoltées dans du PBS et ensemencées dans du milieu liquide ; du *Trypticase Arginin Serin* (TAS) [bouillon de soja trypticase 15g/L (Trypticase (BBL)), extrait de bœuf 5 g/L (poudre Lab Lemco (Oxoid)), peptone protéique n°3 5g/L (Oxoid), extrait de levure de bactérie 2 g/L (Oxoid), L-Arginine-HCL 5 g/L, DL-Serine 1,5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 2 g/L] ou du *Fastidious Anaerobe Broth* (FAB) [Neogen (mélange de peptone 15 g/L, extrait de levure 10 g/L, thioglycolate de sodium 0,5 g/L, chlorure de sodium 2,5 g/L, agar 0,75 g/L, L-cystéine 0,5 g/L, resazurine 0,001 g/L, bicarbonate de sodium 0,4 g/L, hémine 0,005 g/L et vitamine K 0,0005 g/L)]. Après 24h, la densité optique (DO) de ces suspensions bactériennes a été mesurée à 600 nm. Afin d'étudier la cinétique de ces bactéries en milieux liquides, les suspensions bactériennes ont été diluées afin de commencer avec une DO de 0,05 (*D. nodosus*) ou 0,01 (*F. necrophorum*). La DO a ensuite été mesurée à divers intervalles de temps. À chaque temps de mesure, une partie de la culture a été étalée sur FHB et incubée en anaérobiose afin de pouvoir déterminer le nombre de *Colony Forming Units* (CFU). Une partie de la culture bactérienne a également été prélevée et conservée à -20°C dans le but de réaliser une qPCR (**Figure 7 a et b**).

### 2.3 Évaluation de la résistance naturelle de *D. nodosus* à différents antibiotiques

Dans le but de transformer *Dichelobacter nodosus*, la résistance naturelle des deux souches de cette bactérie à divers antibiotiques a été évaluée en étalant 20 µl de bactéries à une DO = 0,1 sur des géloses FAB contenant de l'agar ainsi que des quantités variables en un antibiotique donné. Les bactéries ont ensuite été incubées pendant 3 jours en anaérobiose.

**Table 1 | Liste des antibiotiques et concentrations testées pour l'évaluation de la résistance naturelle de *D. nodosus***

	<b>Ampicilline</b>	<b>Kanamycine</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Concentrations testées</b>	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml
	100 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml
	20 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml
	0,4 µg/ml	0,2 µg/ml	0,1 µg/ml



**Figure 7 | Schéma des manipulations réalisées pour la détermination de la cinétique de *D. nodosus* (souche virulent et bénigne) et *F. necrophorum* en milieu liquide**

**a.** Étude de la cinétique de *D. nodosus*, souche virulente et bénigne, dans du milieu liquide TAS ou FAB. **b.** Étude de la cinétique de *F. necrophorum* dans du milieu FAB.

## 2.4 Évaluation de la résistance de *D. nodosus* et *F. necrophorum* à l'aérobiose

Afin de déterminer les meilleures conditions d'infection, la croissance des différentes souches de bactérie à différentes concentrations en oxygène (3, 10 et 21%) a été évaluée. Pour ce faire, des bactéries ont été réveillées sur glace puis étalées sur des géloses contenant du sang de cheval (FHB) et ont été incubées durant 24 à 72 heures à diverses concentrations en oxygène obtenues grâce à la chambre d'anaérobiose et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.5 Récolte et culture de kératinocytes normaux de mouton

Dans le but d'isoler des kératinocytes normaux de mouton (NSK), des échantillons de peau ont été prélevés post-mortem dans un abattoir, rincés dans de l'éthanol 70% puis immergés dans un milieu de transport [HBSS (Lonza®) complété par de la Gentamycine à 5 µg/ml (Gibco®), de l'Ampicilline à 250 ng/ml (SIGMA®), et du Fungizone à 250 ng/ml (SIGMA®)]. Au laboratoire, les échantillons ont été rincés dans plusieurs bains contenant du milieu de transport et l'hypoderme a été retiré. Les échantillons de peau ont ensuite été coupés en morceaux de 1 cm<sup>2</sup> et placés dans un bain de trypsine (Sigma®) et incubés à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 2 heures. Les échantillons de peau ont ensuite été placés dans des boîtes de pétri contenant une solution bloquante de la trypsine [Milieu de transport complété par du sérum fœtal de veau dialysé à 2% (Gibco)] et ont été grattés avec une lame de scalpel afin de décrocher les kératinocytes. Ces kératinocytes ont alors été recueillis, filtrés sur une membrane en nylon comportant des pores de 70 µm (Greiner) et centrifugés à 300 g pendant 5 minutes à 4°C. Les kératinocytes primaires de mouton ont étéensemencées à raison de 45 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture [KGM-2 (Lonza) complété selon les instructions du fabricant par du SingleQuot KGM-2 (clonetics) contenant 50 µg/ml d'extrait pituitaire bovin, 10 ng/ml d'EGF, 5 µg/ml d'insuline, 5.10<sup>-7</sup> M d'hydrocortisone, 5 µg/ml de transferrine et 0,15 mM de Ca<sup>2+</sup>]. De la Primocine<sup>TM</sup> (InvivoGen) a été ajoutée au milieu à une concentration finale de 100 µg/ml pour éviter la contamination microbienne. Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 3 jours, le milieu de culture a été remplacé par un milieu de différenciation épithéliale [EpiLife® (Gibco®) complété par du HKGS (Gibco®) et de la Primocine] et incubé à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

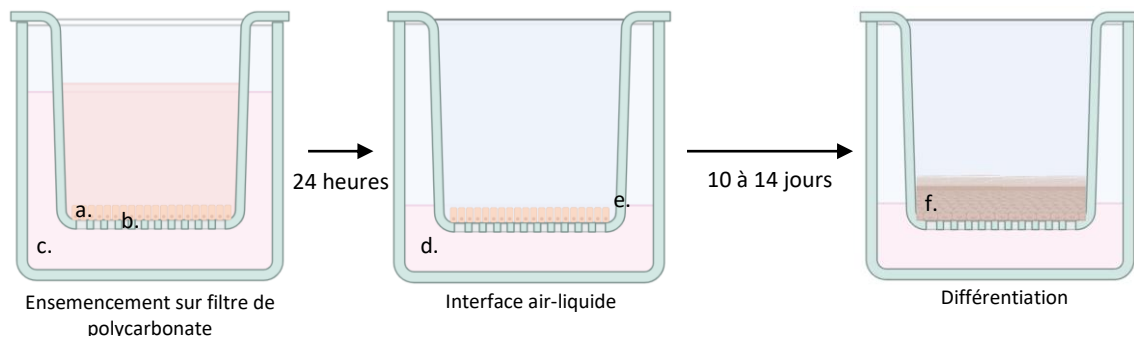
## 2.6 Culture de NSK et de kératinocytes humains immortalisés

Afin de pallier aux difficultés d'obtention de kératinocytes de mouton, des kératinocytes humains de la lignée immortelle N/TERT1 ont été obtenus via une collaboration avec le Laboratoire Cellules et Tissus de l'Université de Namur. Ces cellules et les NSK ont été cultivées dans du milieu EpiLife® et de la Primocine<sup>TM</sup> à une concentration finale de 100 µg/ml pour éviter la contamination microbienne. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a ensuite été changé tous les deux jours et des passages ont été réalisés lorsque les cellules ont atteint 70% de confluence.

## 2.7 Reconstruction d'un épiderme

Afin d'obtenir des épidermes reconstruits de mouton (RSE) ou humains (RHE), des NSK ou des cellules N/tert ont étéensemencées sur des filtres de fibres de polycarbonate [Cell Culture Inserts 0.4 µm PCF, 12 mm de diamètre (Millicell®)] à raison de 250 000 cellules/cm<sup>2</sup>. 2,5 ml de milieu EpiLife® contenant 1,5 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma C5670) a été ajouté dans le puits et les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24 heures, le milieu a été remplacé par du milieu de différenciation [EpiLife® complété par 50 µg/ml de vitamine C (SIGMA), du CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 10 ng de KGF (AMPSBIO®), de la Pénicilline à 50 U/ml (SIGMA®) et de la

Streptomycine à 50 µg/ml (SIGMA)]. Les inserts contenant les cellules ont alors été exposés à l'interface air-liquide (**Figure 8**). Le milieu de différenciation a été changé tous les deux jours.



**Figure 8 | Schéma de la reconstruction d'épiderme de mouton**

**a.** Kératinocytes de mouton. **b.** Filtre en fibres de polycarbonate. **c.** Milieu de croissance des kératinocytes : EpiLife® et CaCl<sub>2</sub>. **d.** Milieu de différenciation : EpiLife®, CaCl<sub>2</sub>, vitamine C et KGF. **e.** Interface air-liquide. **f.** Épiderme stratifié.

## 2.8 Mesure de la résistance électrique transépithéliale

Afin d'évaluer l'évolution de la reconstruction des épidermes, la résistance électrique transépithéliale (TEER) a été mesurée tous les deux jours grâce à un voltmètre (Millicell® ERS-2 Epithelial Volt-ohmMeter Millipore™) 4,5 ml de milieu EpiLife® a été placé dans un puits vide et les épithéliums reconstruits ont été amenés un à un dans ce puits. 0,5 ml d'EpiLife® ont alors été déposés sur chaque RSE ou RHE et des électrodes ont été amenées au contact du milieu, l'électrode la plus courte au niveau de l'insert et l'électrode la plus longue au niveau du puits. La résistance électrique transépithéliale a alors été mesurée pour chaque épiderme reconstruit. Un blanc a également été mesuré afin de déterminer la résistance du filtre de polycarbonate seul.

## 2.9 Exposition de kératinocytes primaires à *Dichelobacter nodosus* mort

Dans le but d'évaluer la réponse des cellules à la présence de bactéries mortes, des kératinocytes primaires de mouton ont été utilisés à leur deuxième passage pour étudier l'impact de la présence de bactéries *D. nodosus* virulentes tuées sur des NSK. Les cellules ont été placées dans des plaques 6 puits avec du milieu EpiLife® jusqu'à ce qu'elles soient à une confluence de 70%. Les bactéries virulentes ont été tuées par un traitement à la chaleur (90°C pendant 30 minutes). Les NSK ont alors été exposés à différentes concentrations en lysat de bactéries et ont été incubées pendant 3 jours. La morphologie des cellules a été évaluée au microscope avant la resuspension des cellules avec de la trypsine 0,25%. Du TRI reagent [TRIZOL Reagent kit (Invitrogen)] a ensuite été ajouté dans le but de lyser les cellules et d'en extraire l'ARN. Cet ARN a ensuite été traité à la DNase [TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen)] avant d'être purifié via la méthode au phénol/chloroforme. 100 ng d'ARN a ensuite été retro transcrit en ADN complémentaire en utilisant la SuperScript® IV Reverse Transcriptase et des random hexamers en présence de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor.

## 2.10 Infection de cultures primaires par *Dichelobacter nodosus* et/ou *Fusobacterium necrophorum*

Afin d'évaluer l'impact de la présence de différentes concentrations en différentes bactéries vivantes au contact de kératinocytes, des kératinocytes primaires de mouton et des kératinocytes humains immortalisés ont été utilisés à leur cinquième passage pour étudier l'impact de la présence de bactéries vivantes sur des kératinocytes normaux de mouton (NSK) ou des kératinocytes humains immortalisés (N/tert). Les cellules ont été placées dans des plaques 12 puits avec du milieu EpiLife® jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 70%. Des bactéries de type *Dichelobacter nodosus* virulente et *Fusobacterium necrophorum* ont été cultivées en anaérobiose puis diluées dans du milieu EpiLife®. Les NSK ont alors été infectés avec diverses concentrations en une bactérie, ou les deux simultanément et ont été incubées pendant 24 à 72h à 3 ou 21% d'oxygène en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. La morphologie des cellules a été évaluée au microscope toutes les 24 heures et les cellules ont été lysées après 24 ou 72 heures. L'ARN a été extrait en utilisant du TRI reagent [TRIZOL Reagent kit (Invitrogen)] en vue de réaliser une qPCR. Cet ARN a ensuite été traité à la DNase [TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen)] avant d'être purifié via la méthode au phénol/chloroforme. 50 à 500 ng d'ARN a ensuite été retro-transcrit en ADN complémentaire en utilisant la SuperScript® IV Reverse Transcriptase et des random hexamers en présence de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor.

## 2.11 Mise au point de la qPCR pour le suivi de la croissance de *D. nodosus* en milieu liquide

Afin de vérifier la spécificité et la sensibilité des primers conçus pour la détection de *Dichelobacter nodosus*, une qPCR a été réalisée à partir de plasmides pGEM®-T Easy comprenant le gène codant pour l'ARN 16S de *Dichelobacter nodosus* ou le gène codant pour APRV2 déjà présents au laboratoire. Les plasmides purifiés ont été dilués pour obtenir des concentrations allant de 1 ng à 1.10<sup>-7</sup> ng d'ADN. Une qPCR de 40 cycles a ensuite été réalisée en utilisant le kit Takyon™NoRox Probe® MasterMix dTTP (Eurogentec) avec 300 nM de primers et 100 nM de sonde (**Table 2**), afin d'obtenir une droite de calibration pour les deux gènes cibles.

## 2.12 Mise au point de la détection des peptides antimicrobiens du mouton

Afin de s'assurer de la sensibilité et de la spécificité des primers utilisés, une PCR nichée a été réalisée pour amplifier les ADN complémentaires des ARNm codant pour les peptides antimicrobiens SBD1 et SMAP29, en utilisant l'enzyme Q5 (NEB) et 400 nM de primers (30 cycles). 1/20 du volume de cette première PCR a été récupéré pour faire une seconde PCR avec l'enzyme go Taq G2 (Promega) et 200 nM de primers (25 cycles). Les ADN complémentaires ont été obtenus à partir de NSK exposés à *D. nodosus* virulent mort, de RSE infectés par *D. nodosus* virulent ou bénin, ou d'extraits d'organes de mouton. Les produits PCR ont ensuite été migrés sur gels d'agarose et les échantillons positifs ont été purifiés via un kit PCR clean-up (MARCHERY-NAGEL), en suivant le protocole fourni par le fabricant. Le produit purifié a ensuite été intégré dans un plasmide pGEM®-T-Easy via l'ADN ligase T4 [Promega (2 U)] et incubé à 12°C au cours du weekend. Les ligations ont ensuite été électroporées dans des bactéries *E. coli* TG1 compétentes via électroporation (1250 V/mm - 25µF - 5 ms). Ces bactéries ont été immédiatement remises en suspension dans du milieu LB (*Lysogeny Broth*) puis ont été incubées à 37°C pendant une heure avant d'être étalées sur des géloses LB agar contenant du X-Gal (60 mg/ml), de l'IPTG (40mg/ml) et de l'Ampicilline (100µg/ml). 12

colonies ayant intégré un insert ont ensuite été criblées par PCR avec 30 cycles en utilisant l'enzyme Go Taq G2 et 200 nM de primers PU et rPU (**Table 2**). Les produits PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose. 3 colonies ayant intégré l'insert d'intérêt ont ensuite été cultivées en milieu liquide en vue de réaliser une Mini-prep en suivant le protocole Plasmid DNA purification (MARCHERY-NAGEL). Les plasmides purifiés ont alors été dosés et 1,2 µg de plasmide provenant de chaque colonie a été envoyé au séquençage (Eurofins). Pour chaque gène d'intérêt, les plasmides purifiés provenant d'une des trois colonies ont été choisis pour réaliser 30 cycles de PCR en utilisant l'enzyme Go Taq G2 à différentes températures d'hybridation et avec 200 nM de différents couples de primers. Les produits PCR ont ensuite migré sur gel d'agarose. Une qPCR de 40 cycles a alors été réalisée en utilisant 3 couples de primers (300 nM) pour chaque cible et 2,5 ng à 25 ag de plasmide. Le meilleur couple pour chaque cible a été conservé (**Table 2**).

### 2.13 qPCR

Pour l'amplification d'ADN, une qPCR. 40 cycles a été réalisée en utilisant le kit Takyon™ NoRox Probe® MasterMix dTTP (Eurogentec) avec 300 nM de primers et 100 nM de sonde dirigés contre l'ARN 16S de *D. nodosus* ou en utilisant le kit Takyon™ NoRox SYBR® MasterMix dTTP Blue kit (Eurogentec) avec 300 nM de primers dirigés contre l'ARN 16S de *F. necrophorum* (**Table 2**). Pour l'amplification d'ADNc, une PCR de 40 cycles a été réalisée en utilisant du Takyon™ NoRox SYBR® MasterMix dTTP Blue kit (Eurogentec) avec 300 nM de primers (**Table 2**) afin de détecter l'abondance d'expression de divers marqueurs inflammatoires.

**Table 2 | Primers et sondes utilisés**

Cible	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<b>ARN 16S <i>D. nodosus</i></b>	CGGGGTTATGTAGCTTGCTATG	TACGTTGTCCCCCACCATAAG
<b>ARN 16S <i>D. nodosus</i> sonde</b>	TGG-CGG-ACG-GGT-GAG-TAA-TAT-ATA-GGA-ATC	
<b>APRV2</b>	GAAGGCGACTGGTTTGATAACTG	GAGCTGTCGCTTCTTTCTTTGCG
<b>APRV2 sonde</b>	ATG-CGG-TGG-TTA-TCC-T	
<b>Plasmide (PU-rPU)</b>	TGTA AACGACGGCCAGTG	GGAAACAGCTATGACCATG
<b>GAPDH ovin</b>	GGCGTGAACACGAGAAGTATAA	CCCTCCACGATGCCAAAGT
<b>NFκB ovin</b>	AGCACAAGAAGGCAGCACAA	CCATCAGCAGCAGCAGACAC
<b>SBD1</b>	GGCTCCATCACCTGCTCCTC	GGTGCCAATCTGTCTCATGTGTC
<b>SBD2</b>	CCTCGTGCTCTTCTTCGTGG	CCGAAACAGGTGCCAATC
<b>SMAP29</b>	GCTAATCTCTACCGCCTCCTG	GTGACTGTCCCCACACTCTT
<b>IL-8 ovin</b>	GAGAAGTCCTCTGGGACAGC	CAGCCAGCTTGGGAAGTCATA
<b>β-actine ovin</b>	CTGGCACCACACCTTCTACAAC	GAGGCGTACAGGGACAGCAC
<b>TNF-α</b>	GGTGCCTCAGCCTCTTCTC	GAACCAGAGGCCTGTTGAAG
<b>IL-1β</b>	CGAACATGTCTTCCGTGATG	TCTCTGTCTGGAGTTTGCAT
<b>RPLPO humain</b>	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
<b>IL-8 humain</b>	GCAGAGGGTTGTGGAGAAGTTT	TTGGATACCACAGAGAATGAATTTTT
<b>β-défensine 2 humaine</b>	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	GAGACCACAGGTGCCAATTT
<b>IL-1β humain</b>	TCCCAGCCCTTTTGTGTA	TTAGAACCAAATGTGGCCGTG

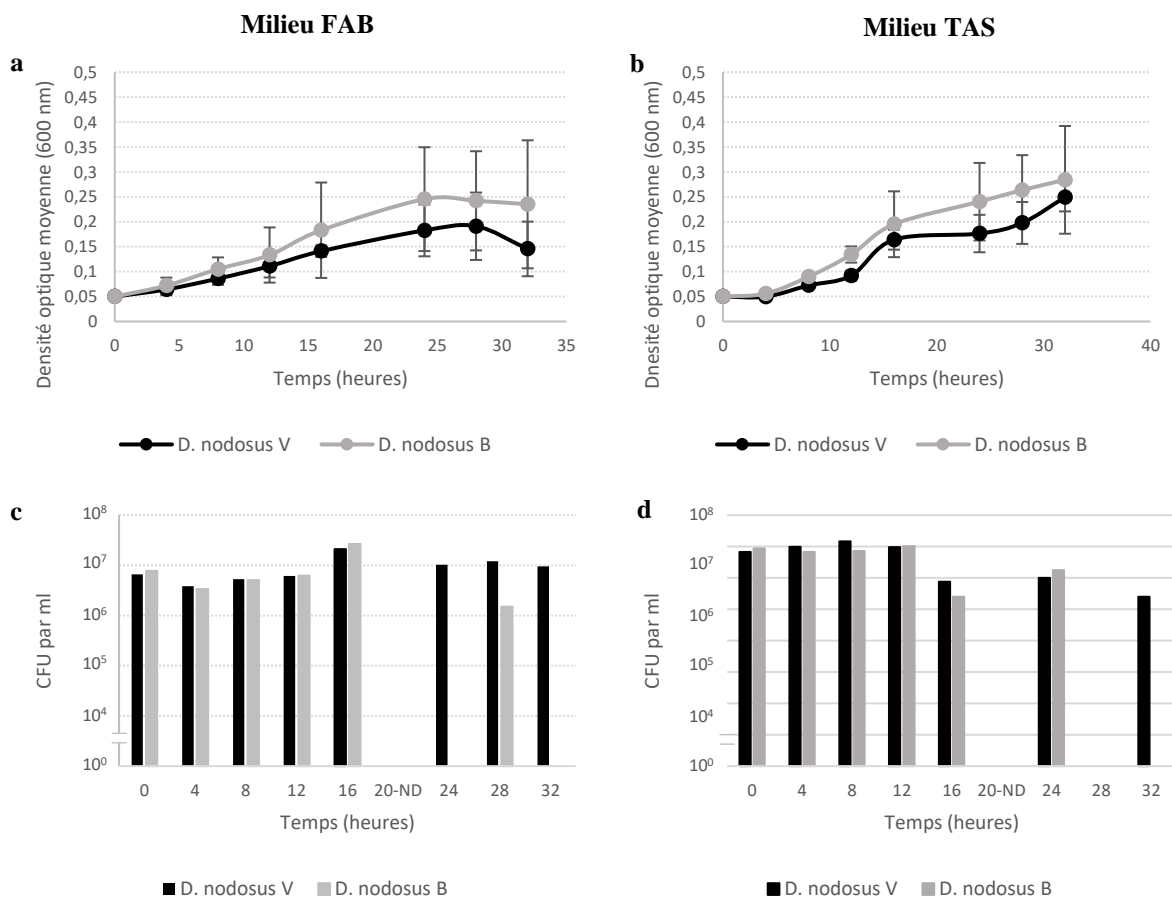


### 3. Résultats

#### 3.1 Caractérisation de *Dichelobacter nodosus*

Afin de pouvoir infecter des cultures primaires et des épidermes reconstruits de manière reproductible, la cinétique des souches virulentes et bénignes de *Dichelobacter nodosus* a été étudiée dans deux milieux liquides différents : un milieu industriel (*Fastidious Anaerobe Broth* ou FAB) et un milieu utilisé dans la littérature (*Trypticase Arginine Serin* ou TAS). La croissance de la bactérie a été évaluée toutes les quatre heures par la mesure de la densité optique du milieu de culture à 600 nm et la quantification de l'ADN bactérien présent dans le milieu. En parallèle, la viabilité de la bactérie a été évaluée par l'ensemencement de *Colony Forming Units* (CFUs) (**Figure 8 a**). La forme de la bactérie, liée à sa viabilité, a également été évaluée au microscope à chaque intervalle de temps.

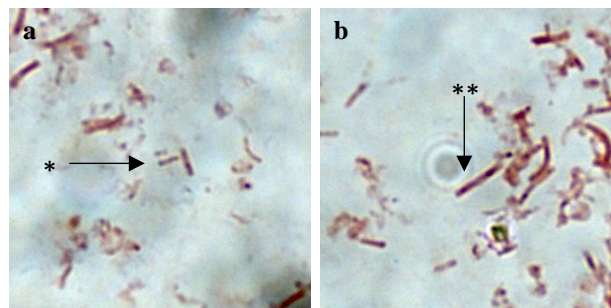
##### 3.1.1 Culture de *Dichelobacter nodosus* en milieu liquide



**Figure 9 | Comparaison de la croissance des souches bénignes et virulentes de *Dichelobacter nodosus* dans du milieu liquide FAB ou TAS**

Évolution de la densité optique à 600 nm de *D. nodosus* virulente et bénigne dans du milieu FAB **a.** TAS **b.** La barre d'erreur représentée sur le graphique correspond à l'écart-type de 3 tripliquas **c, d.** Évolution du nombre de CFU des souches virulente et bénigne de *D. nodosus* sur gélose au sang après x heures dans du milieu liquide **a.** FAB (n = 1) ou **b.** TAS (n = 1). N-D : Non-déterminé.

Les deux souches bactériennes ayant été mises dans du milieu FAB liquide ont atteint un plateau après 24 heures dans les trois expériences. Cependant, même si le plateau a été atteint en même temps pour les deux souches, la densité optique de la souche bénigne était toujours supérieure à la densité optique de la souche virulente (**Figure 9 a**). L'apparition du plateau coïncide avec l'apparition de bactéries à conformation longue pour les deux souches (**Figure 10**). Les deux souches de bactéries ayant été mises dans du milieu TAS liquide ont quant à elles montré une densité optique croissante tout au long des trois expériences et ont atteint une densité optique supérieure à celle obtenue dans le milieu FAB (**Figure 9 b**). Comme dans le milieu FAB, la souche bénigne présentait une densité optique plus élevée que la souche virulente au cours du temps. Cependant, aucune bactérie de conformation longue n'a été observée après 32 heures de croissance dans le milieu TAS. Quel que soit le milieu liquide utilisé pour la croissance des bactéries, la souche bénigne présentait une variabilité plus importante que la souche virulente d'un essai à l'autre (**Figure 9 a, b**).



**Figure 10 | Évaluation de la morphologie de la souche virulente de *D. nodosus* au cours de sa croissance en milieu FAB**

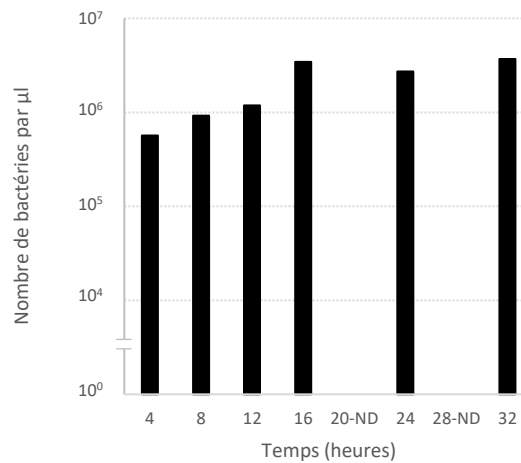
*D. nodosus* virulente après **a.** 4 heures ou **b.** 24 heures dans du milieu FAB. Coloration à la safranine. \* bactérie courte. \*\* bactérie longue. Grossissement 1 000 x.

Une diminution du nombre de CFU peut être observée à 4 heures pour les deux souches ayant été placées dans du milieu FAB. Ce nombre augmente ensuite et atteint un maximum à 16 heures, avant de diminuer une nouvelle fois. À 24 et 32 heures, les colonies formées par la souche bénigne n'ont pas pu être comptées (**Figure 9 c**). Pour les bactéries ayant été placées dans du milieu TAS, une légère augmentation du nombre de colonies formées par la souche virulente est observée entre 0 et 12 heures, avant de diminuer. Cependant, pour la souche bénigne, une diminution du nombre de CFU est observée jusque 8 heures avant d'augmenter pour atteindre un maximum à 12 heures, puis diminuer à nouveau (**Figure 9 d**).

### 3.1.2 Suivi de la croissance de la souche virulente de *Dichelobacter nodosus* en milieu liquide FAB par qPCR

À chaque intervalle de temps, une partie de la culture bactérienne a été récupérée et l'ADN en a été extrait. Une qPCR a ensuite été réalisée sur la souche virulente de *D. nodosus* ayant poussé dans du milieu FAB avec des primers et une sonde dirigés contre l'ADN codant pour l'ARN 16S de la bactérie. Grâce à la droite de calibration préalablement établie (**Figure supplémentaire 1 a, b**), le nombre de bactéries présentes dans un microlitre de culture a ainsi pu être déterminé, sachant que 4 copies du gène sont présentes dans le génome de *D. nodosus*. Il a ainsi pu être observé que le nombre de bactéries en culture semble augmenter de manière

linéaire de 4 à 12 heures avant d'atteindre un pic à 16 heures. Ce nombre de bactéries diminue légèrement après 24 heures avant de réaugmenter à 32 heures (**Figure 11**).



**Figure 11 | Suivi de la croissance de la souche virulente de *D. nodosus* dans du milieu liquide FAB au cours du temps.**

N-D : Non-déterminé.

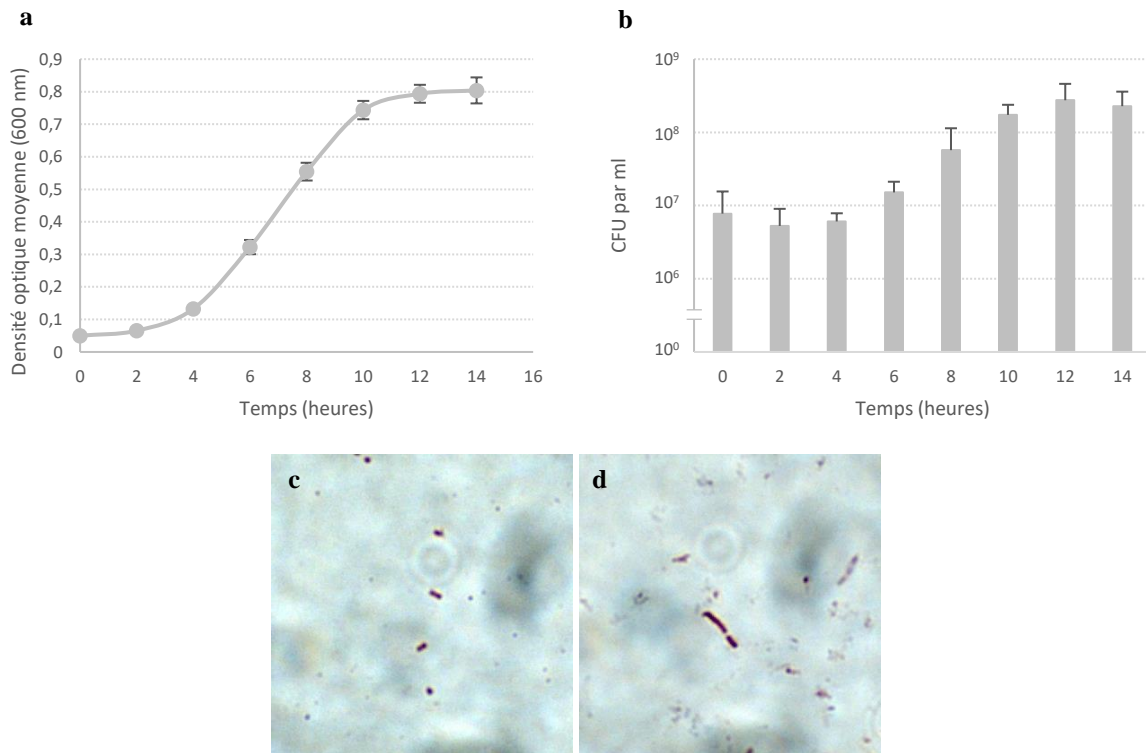
### 3.1.3 Évaluation de la résistance naturelle de *D. nodosus* à différents antibiotiques

Dans une optique de transformer *Dichelobacter nodosus*, la résistance naturelle des deux souches de *D. nodosus* à divers antibiotiques a été évaluée. Des bactéries ont été étalées sur des géloses de FAB agar contenant des concentrations variables en antibiotiques (**Table 1**). Une concentration minimale inhibitrice de  $2 \mu\text{g/ml}$  de kanamycine et de  $1 \mu\text{g/ml}$  de chloramphénicol ont été déterminées pour les deux souches. Une concentration minimale inhibitrice de  $1 \mu\text{g/ml}$  d'ampicilline a été déterminée pour la souche bénigne. Cependant, aucune bactérie virulente n'a poussé à aucune concentration en ampicilline et la concentration minimale inhibitrice n'a donc pas pu être déterminée ( $< 1 \mu\text{g/ml}$ ).

## 3.2 Caractérisation de *Fusobacterium necrophorum*

Afin de réaliser des co-infections avec les deux bactéries principalement impliquées dans le piétin, la cinétique de *Fusobacterium necrophorum* a également été étudiée en milieu liquide FAB. La croissance de la bactérie a été évaluée toutes les deux heures par la mesure de la densité optique du milieu de culture à 600 nm. La viabilité de la bactérie a simultanément été évaluée par l'ensemencement de CFUs et la forme de la bactérie a été évaluée au microscope à chaque intervalle de temps (**Figure 8 a**).

La densité optique de la culture bactérienne a augmenté en suivant une courbe de type sigmoïde, avec une phase exponentielle allant de 4 à 10 heures, et l'obtention d'un plateau après 12 heures de croissance (**Figure 12 a**). Le temps de dédoublement de *F. necrophorum* semble être d'environ 2 heures. Concernant l'évolution du nombre de CFUs au cours du temps, une légère diminution est observée de 0 à 2 heures, suivie d'une augmentation jusqu'à l'atteinte d'un plateau vers 12 heures (**Figure 12 b**). Lors de l'évaluation de la forme de la bactérie au microscope, des bactéries longues ont été observées à partir de 28 heures, bien qu'en moindre proportions que pour *D. nodosus* (**Figure 12 c, d**).



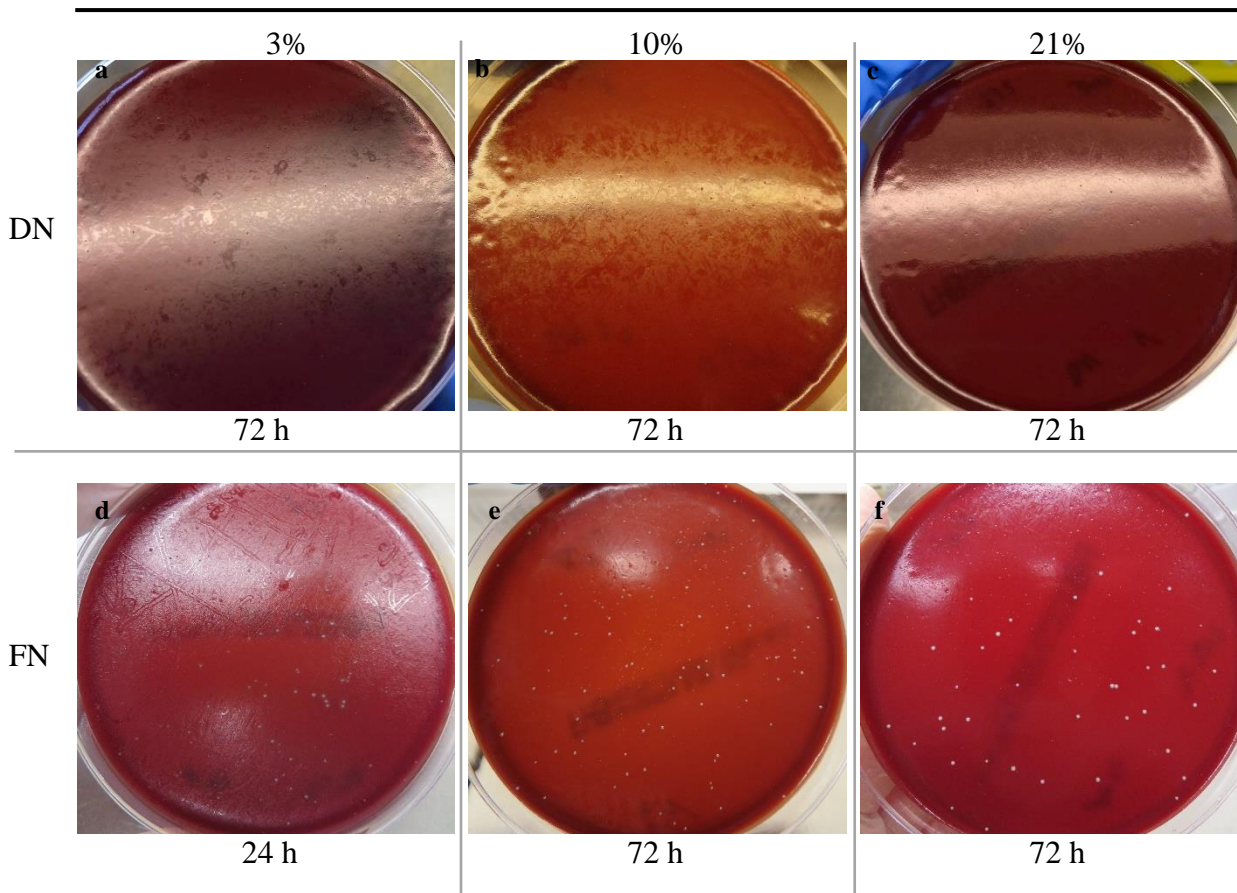
**Figure 12 | Évaluation de la croissance de *Fusobacterium necrophorum* dans du milieu liquide FAB**

**a.** Évolution de la densité optique de *F. necrophorum* au cours du temps (n=9). **b.** Évolution du nombre de colonies formées par *F. necrophorum* sur géloses au sang (FHB) au cours du temps. La barre d'erreur représentée sur les graphiques correspond à l'écart-type de 3 tripliquas. Observation de la morphologie de *F. necrophorum* après 2h **c.** ou 28 h **d.** Coloration à la safranine. Grossissement 1 000 x.

### 3.3 Évaluation de la résistance de la souche virulente de *D. nodosus* et *F. necrophorum* à l'aérobiose

Dans le but de déterminer les meilleures conditions expérimentales pour l'infection de cellules primaires et d'épidermes reconstruits (permettant la pousse de la bactérie tout en perturbant le moins possible le métabolisme cellulaire), le réveil des différentes bactéries a été étudié à différentes concentrations en oxygène (3, 10 ou 21% d'oxygène). Pour la souche virulente de *D. nodosus*, un tapis de bactéries confluentes a été observé après 72 heures de pousse à 3% d'oxygène. En présence de 10% d'oxygène, un tapis bactérien moins confluent a été observé tandis que rien n'a poussé à 21% d'oxygène (**Figure 13**). En revanche, la croissance de *F. necrophorum* semble être plus affectée par la présence d'oxygène. En effet, bien qu'un tapis cellulaire puisse être observé après 24 heures en présence de 3% d'oxygène, la croissance de la bactérie est ralentie et seules des colonies isolées sont visibles après 72 heures en présence de 10 ou 21% d'oxygène (**Figure 13**). Suite à ces résultats, il a été décidé de réaliser les infections en présence de 3% d'oxygène, afin de préserver une bonne croissance bactérienne.

## Concentration en oxygène



**Figure 13 |** Évaluation de la croissance de la souche virulente de *Dichelobacter nodosus* (DN) et *Fusobacterium necrophorum* (FN) à différentes concentrations en oxygène.

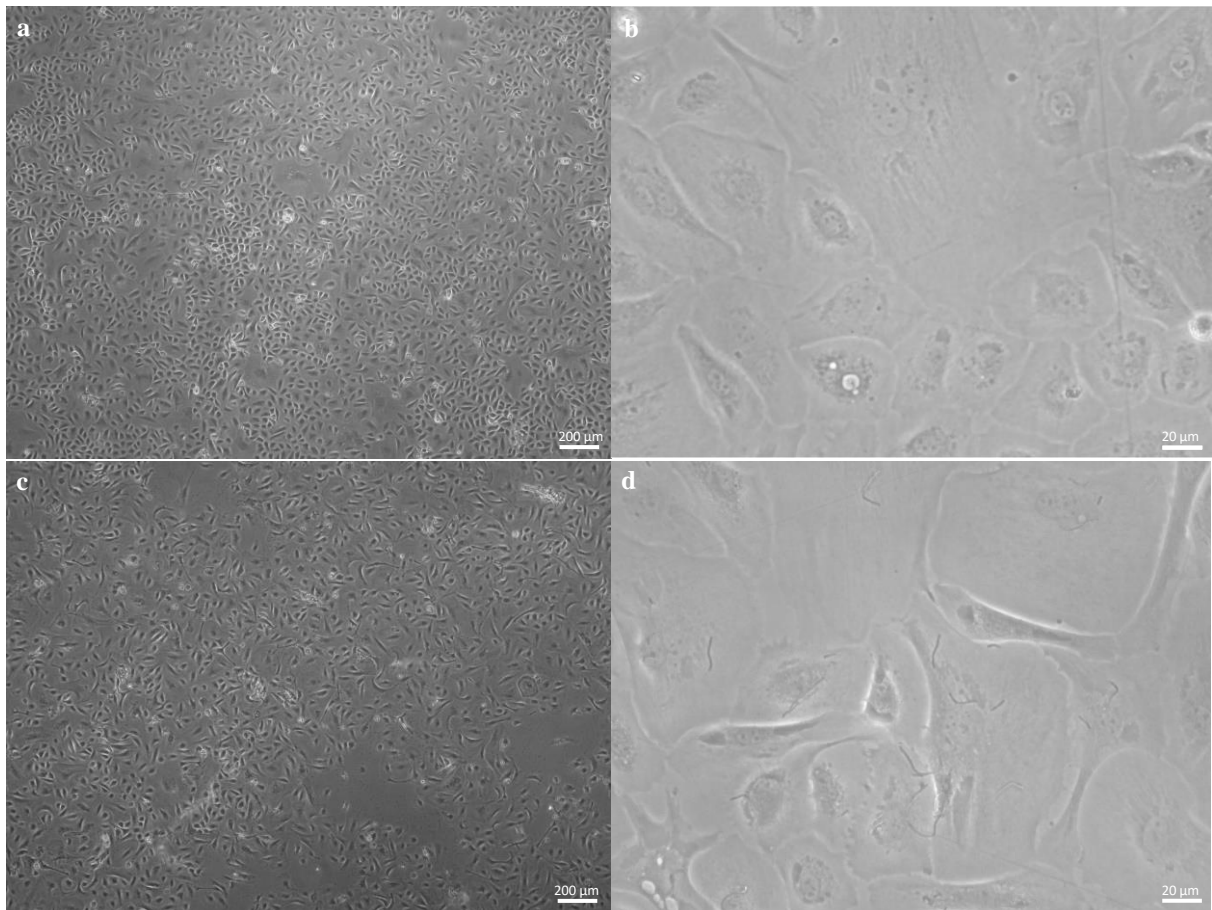
Croissance de *D. nodosus* à **a.** 3%, **b.** 10% et **c.** 21% d'oxygène (n=3). Croissance de *F. necrophorum* à **d.** 3%, **e.** 10% et **f.** 21% d'oxygène (n=3).

### 3.4 Impact de l'exposition de kératinocytes primaires à diverses quantités de *Dichelobacter nodosus* virulent mort

Des cultures primaires de kératinocytes de mouton ont été exposées à *D. nodosus* virulent tué par la chaleur à différentes concentrations. La réponse cellulaire a été évaluée après 72 heures d'exposition et l'aspect général des cellules a été suivi. De manière générale, les cellules de chaque puits avaient atteint le stade de confluence et avaient commencé à se différencier (**Figure 14 a, c**). Des bactéries mortes pouvaient être observées, attachées aux cellules de chaque puit exposé. Les cellules au contact de bactéries ne présentaient pas un aspect différent des cellules non-exposées (**Figure 14 b, d**).

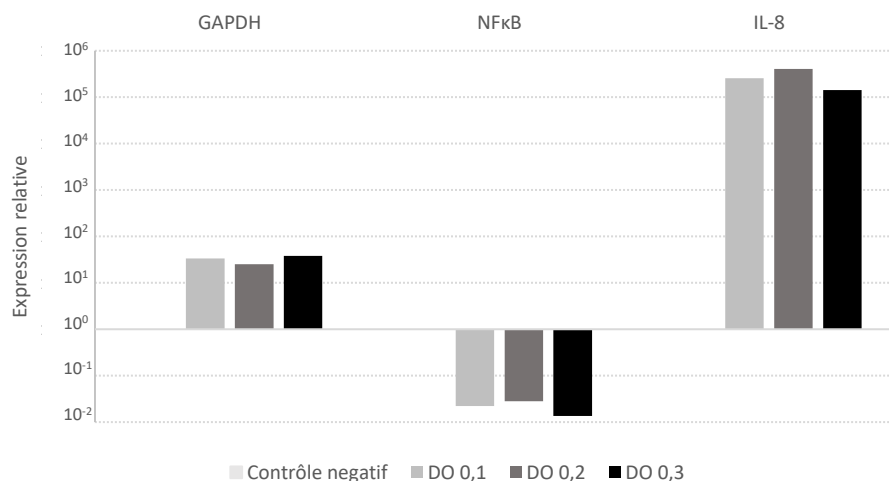
Après 72 heures, les cellules ont été récoltées et une RT-qPCR a alors été réalisée pour quantifier l'expression de certains marqueurs inflammatoires (NF $\kappa$ B et IL-8) (**Figure 15**). En comparant l'expression des différents marqueurs inflammatoires à celle de la  $\beta$ -actine, une diminution de l'expression de NF $\kappa$ B est observée au niveau des cellules exposées à la bactérie morte. En revanche, une forte augmentation de l'expression d'IL-8 est observée dans chacun des puits. Cependant, cette variation de l'expression d'IL-8 et de NF $\kappa$ B ne semble pas corrélée avec l'augmentation de la quantité de bactéries présentes dans le puits.





**Figure 14 | Aspect général des kératinocytes primaires de mouton après exposition à *D. nodosus* virulent mort.**

**a-b.** Kératinocytes primaires non-infectés **a.** (40x), **b.** (400x). **c-d.** Kératinocytes exposés à *D. nodosus* virulent à une densité optique de 0,2 (600 nm) **c.** (40x), **d.** (400x).



**Figure 15 | Impact de diverses quantités de *D. nodosus* virulent mort sur des kératinocytes primaires de mouton**

Expression relative de GAPDH, NFκB et IL-8 comparés à la β-actine dans des kératinocytes primaires de mouton exposés à *D. nodosus* virulent mort, 72h après infection. Analyse performée une seule fois.



### 3.5 Infection de cultures primaires par *Dichelobacter nodosus* ou *Fusobacterium necrophorum*

#### 3.5.1 Essai préliminaire d'infection de NSK par *D. nodosus* ou *F. necrophorum*

Avant de pouvoir infecter des épidermes, la quantité de bactéries à déposer sur ceux-ci doit être déterminée. Une infection a donc d'abord été réalisée sur des kératinocytes de mouton en normoxie (21% d'oxygène) ou en hypoxie (3% d'oxygène). Certaines cellules ont été infectées avec *D. nodosus* à une DO = 0,05 soit 202 500 CFU/cm<sup>2</sup> tandis que d'autres cellules ont été infectées avec *F. necrophorum* à une DO = 0,01 soit 1 250 000 CFU/cm<sup>2</sup>. L'aspect général des cellules a été évalué toutes les 24 heures et des cellules ont été lysées à 24 et 72 heures post-infection afin de réaliser une qPCR et étudier l'expression des différents marqueurs inflammatoires.

Lors de ce premier test, les cellules non infectées et placées en normoxie avaient atteint une confluence de presque 100% avec un faible taux de mortalité. La morphologie des cellules était de type pavimenteux. Concernant les cellules placées en hypoxie, le taux de mortalité était un peu plus élevé, bien que la confluence soit restée très élevée. À partir de 48 heures, le cytoplasme de certaines cellules prenait un aspect filamenteux (**Figure supplémentaire 3 a**).

Au niveau des cellules infectées par *Dichelobacter nodosus*, en présence de 21% d'oxygène, la confluence des cellules diminue à partir de 48 heures post infection, avec une augmentation du taux de mortalité cellulaire et l'apparition de cellules filamenteuses. Les cellules infectées en hypoxie, quant à elles, présentaient dès 24 heures post infection une très faible confluence avec un taux de mortalité très élevé. Toutes les cellules présentaient alors cet aspect filamenteux. Après 48 et 72 heures, la confluence des cellules a continué de diminuer, le taux de mortalité a augmenté et les cellules ont montré de plus en plus de signes de souffrance (**Figure supplémentaire 3 b**).

Pour les cellules infectées en normoxie par *Fusobacterium necrophorum*, les cellules présentaient dès 24 heures une confluence plus faible que les cellules contrôle, avec un faible taux de mortalité mais un aspect filamenteux des cellules, bien que celui-ci soit moins prononcé que l'effet observé suite à l'infection par *D. nodosus*. À partir de 48 heures, la confluence des cellules diminue et le taux de mortalité augmente. Les cellules perdent alors leur aspect de cellules épithéliales. En présence de 3% d'oxygène, dès 24 heures post infection, toutes les cellules se sont décrochées de la plaque et ont formé de petits agrégats multifocaux. La taille de ces agrégats augmente par la suite de taille au fur et à mesure de la perte d'adhésion des cellules au support (**Figure supplémentaire 3 c**).

D'un point de vue de l'expression des différents marqueurs inflammatoires et peptides antimicrobiens préalablement validés par qPCR (**Figure supplémentaire 1 d, e**), une augmentation globale de l'expression des différents marqueurs était observée au niveau des cellules en normoxie, 24h après l'infection, peu importe la bactérie infectieuse (**Figure supplémentaire 4 a**). En revanche, une augmentation était observée pour certains marqueurs 72 heures après l'infection, avec une diminution de l'expression d'autres marqueurs (**Figure supplémentaire 4 b**). Pour les cellules en hypoxie, presque tous les marqueurs inflammatoires étaient surexprimés à la fois à 24 heures et à 72 heures post-infection (**Figure supplémentaire 4 c, d**).

### 3.5.2 Infection de NSK par *D. nodosus* et *F. necrophorum*

Suite aux importants effets cytopathiques observés dès 24 heures, rendant difficile l'étude de la réponse cellulaire, un deuxième test d'infection de kératinocytes normaux de mouton a été réalisé, avec des concentrations moindres en bactéries, à savoir 40 500 ou 4 050 bactéries par cm<sup>2</sup> pour *Dichelobacter nodosus* (DO = 0,01 ou 0,001) et/ou 12 750 ou 1 275 bactéries par cm<sup>2</sup> pour *Fusobacterium necrophorum* (DO = 0,0001 ou 0,00001).

Au niveau des cellules non-infectées, aucune différence n'a été observée par rapport aux cellules non-infectées de l'expérience précédente (**Figure 16 a**).

Pour les cellules infectées par *Dichelobacter nodosus* à une DO = 0,01, en normoxie, les cellules présentaient une confluence élevée et un faible taux de mortalité à 24 heures post infection. À partir de 48 heures post-infection, la confluence des cellules a commencé à diminuer et la mortalité à augmenter. Des cellules filamenteuses commençaient à apparaître. En hypoxie, des cellules filamenteuses étaient présentes dès 24 post-infection. La confluence est restée moyenne durant les 72 heures d'infection avec une mortalité cellulaire qui augmentait progressivement au cours du temps, de même que le nombre de cellules filamenteuses (**Figure 16 b**).

Au niveau des cellules infectées par *Fusobacterium necrophorum* à une DO = 0,0001, en présence de 21% d'oxygène, peu d'effets cytopathiques étaient visibles. Les cellules présentaient, à chaque intervalle de temps, une confluence élevée avec un taux de mortalité faible et une morphologie de type pavimenteuse. En revanche, bien que les cellules en hypoxie aient présenté une confluence élevée à chaque intervalle de temps, le taux de mortalité était plus élevé à 48 et 72 heures post infection et de plus en plus de cellules présentaient une apparence filamenteuse (**Figure 16 c**).

Pour les cellules infectées à la fois par *D. nodosus* à une DO = 0,01 et *F. necrophorum* à une DO = 0,0001, en normoxie et à 24 heures, bien que la confluence soit élevée et le taux de mortalité faible, certaines cellules présentaient une morphologie de type filamenteuse. La confluence a ensuite diminué et la mortalité cellulaire a augmenté jusqu'à 72 heures. Le nombre de cellules filamenteuses a augmenté. Pour les cellules en hypoxie, la confluence des cellules était plus faible que pour les cellules en normoxie durant la durée de l'infection et le taux de mortalité était plus important. De plus, de nombreuses cellules à morphologie filamenteuse pouvaient être observées dès 24 heures post infection et leur nombre augmentait à chaque intervalle de temps (**Figure 16 d**).

Au niveau des cellules infectées avec *D. nodosus* et/ou *F. necrophorum* à des concentrations dix fois inférieures, moins d'effets cytopathiques ont été observés et ce à tous les intervalles de temps et pour toutes les conditions (**Figure supplémentaire 5**).

En regardant la différence d'expression des différents marqueurs en hypoxie, il semblerait y avoir une surexpression de la plupart des marqueurs inflammatoires et des peptides antimicrobiens 24 heures après l'infection, avec une légère diminution de l'expression de certains marqueurs dans certaines conditions (**Figure 17 a**). En revanche, 72 heures après l'infection, une importante diminution de l'expression de tous les marqueurs est observée et ce peu importe la concentration ou la bactérie infectieuse (**Figure 17 b**).

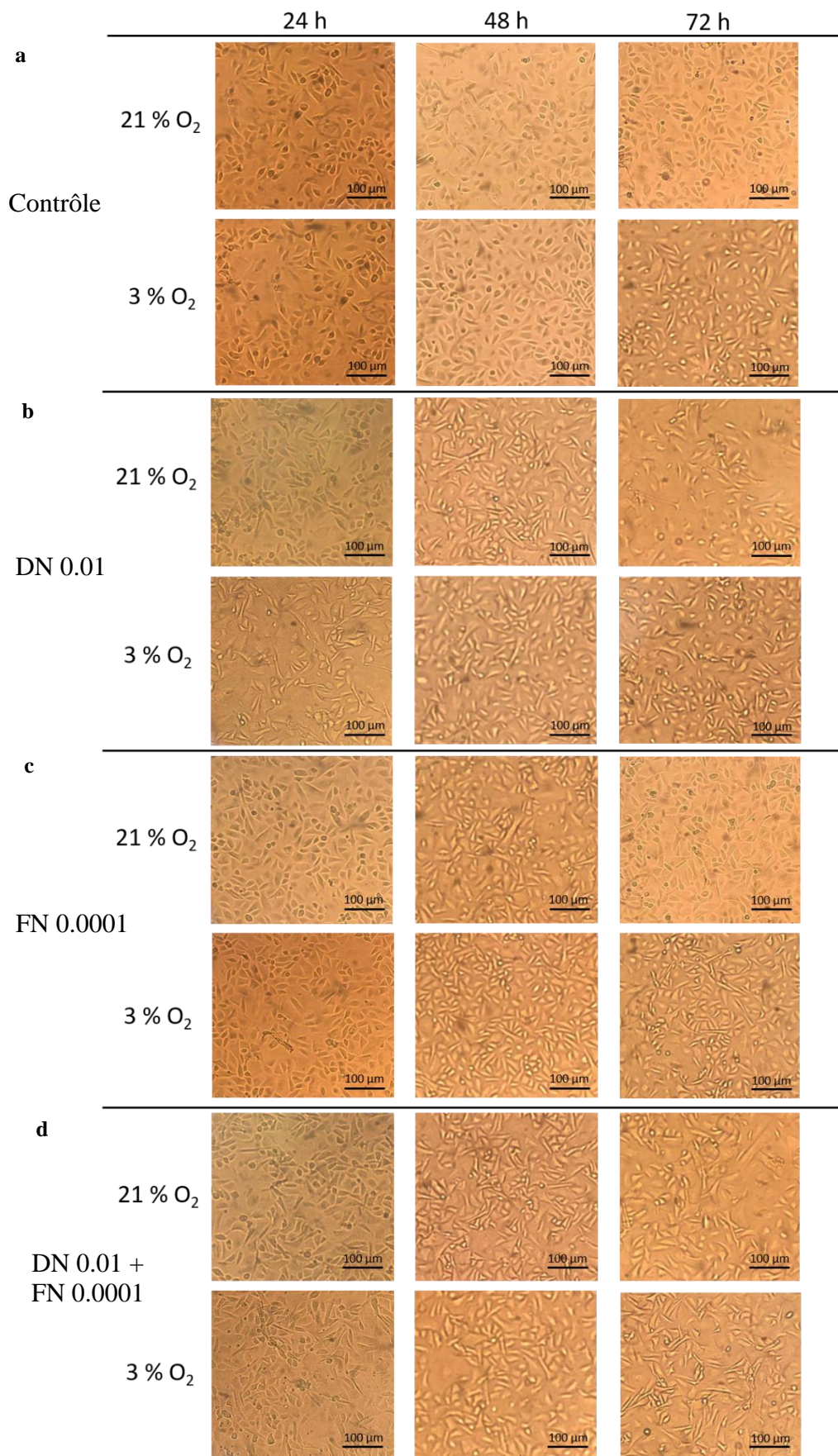
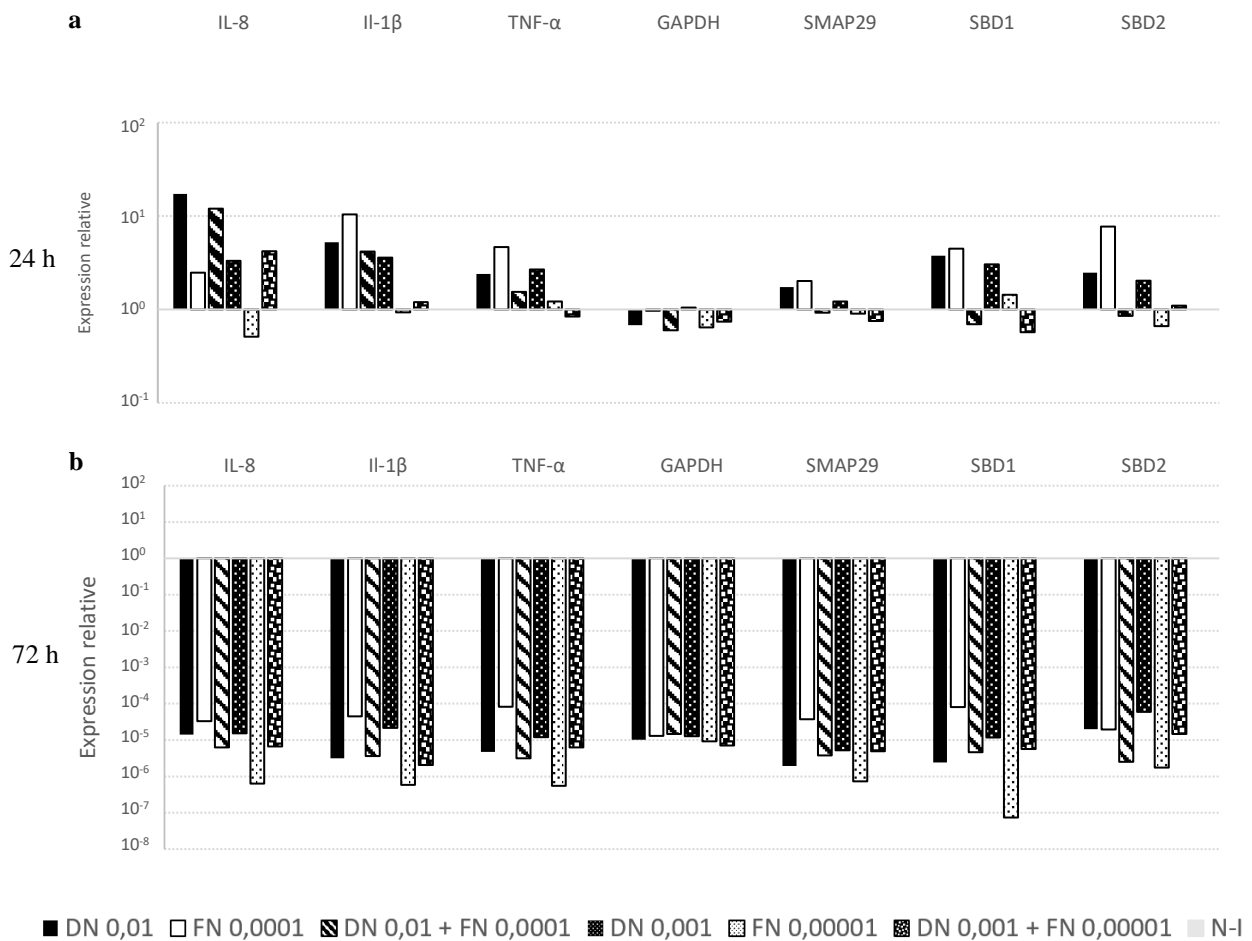


Figure 16 | Étude de l'impact de l'infection par *D. nodosus* (DN) à une DO = 0.01 et/ou *F. necrophorum* (FN) à une DO = 0.0001 sur des NSK, en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>).



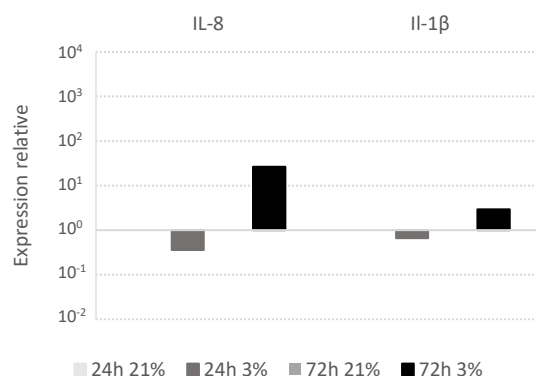
**Figure 17 | Effet de la présence de diverses quantités de *D. nodosus* et/ou *F. necrophorum* sur des NSK en conditions hypoxiques (3% O<sub>2</sub>).**

Expression relative d'IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GAPDH, SMAP29, SBD1 et SBD2 comparés à la  $\beta$ -actine dans des kératinocytes primaires de mouton après infection par les bactéries responsables du piétin, **a.** 24h ou **b.** 72h après infection. Analyse performée une seule fois. N-I : cellules non-infectées.

### 3.5.3 Étude de l'impact de l'hypoxie sur les kératinocytes humains immortalisés

Les lignées cellulaires humaines étant mieux caractérisées, les infections suivantes ont été réalisées sur cellules N/tert. Afin de déterminer l'effet de l'hypoxie sur les kératinocytes humains, la différence d'expression de divers marqueurs inflammatoires a été testée en comparant des cellules non infectées cultivées en normoxie (21% d'oxygène) à des cellules non infectées cultivées en hypoxie (3% d'oxygène). Après 24 heures en hypoxie, une légère diminution d'IL-8 et d'IL-1 $\beta$  peut être observée. En revanche, après 72 heures en hypoxie, une augmentation de l'expression des deux marqueurs est observée (**Figure 18**). La différence d'expression de la  $\beta$ -défensine 2 n'a pas pu être étudiée car aucun ADNc n'a été détecté.





**Figure 18 | Effet de l'hypoxie (3% d'oxygène) sur des kératinocytes humains immortalisés**

Expression relative d'IL-8 et IL-1β comparés à la RPLPO dans des kératinocytes humains immortalisés exposés à un environnement hypoxique pendant 24 à 72 heures. Analyse performée une seule fois.

### 3.5.4 Infection de N/tert par *D. nodosus* et *F. necrophorum*

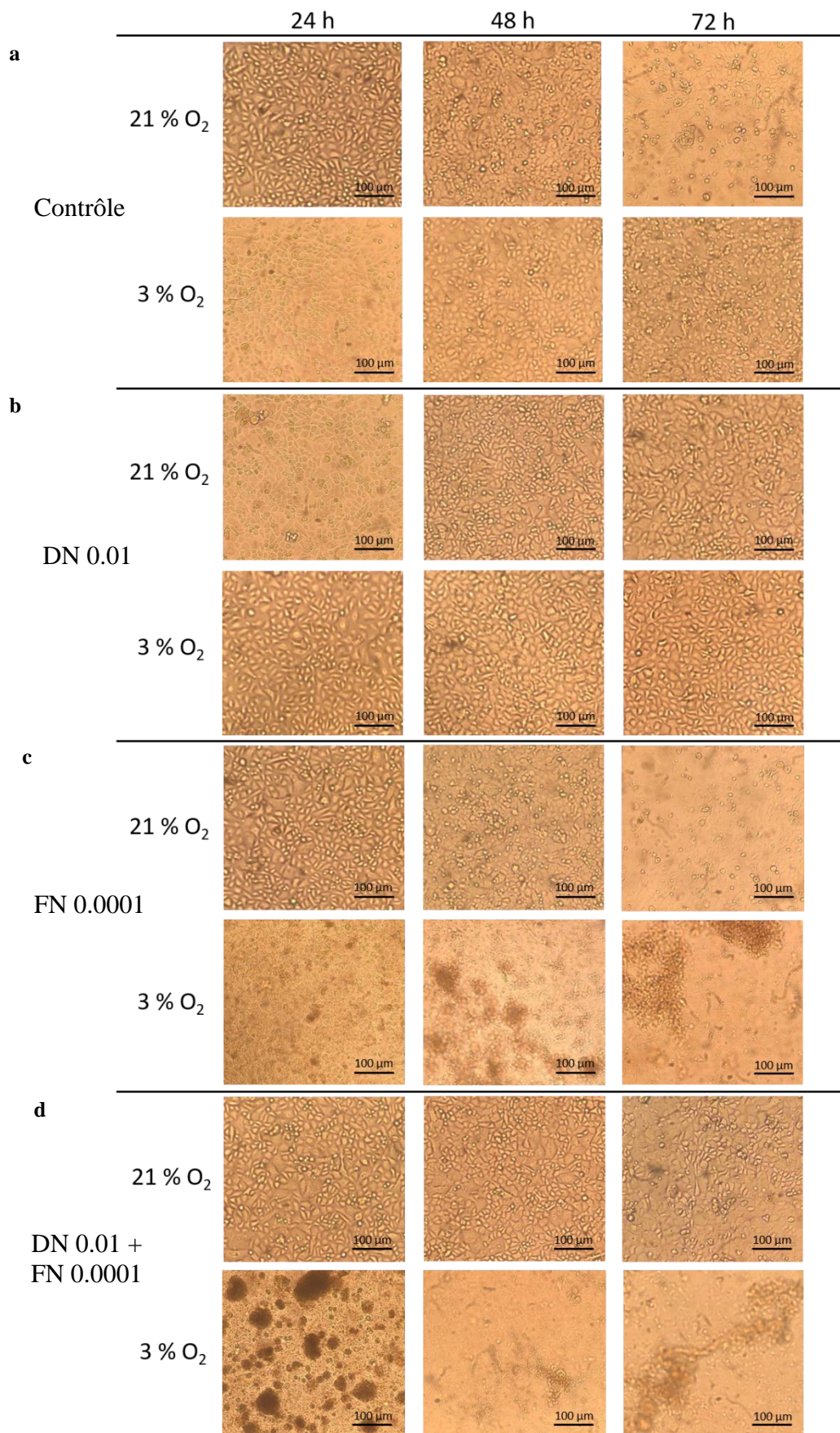
Une infection sur kératinocytes humains immortalisés a été réalisée en utilisant les mêmes concentrations en bactéries que précédemment, c'est-à-dire 40 500 ou 4 050 bactéries par cm<sup>2</sup> pour *Dichelobacter nodosus* (DO = 0,01 ou 0,001) et/ou 12 750 ou 1 275 bactéries par cm<sup>2</sup> pour *Fusobacterium necrophorum* (DO = 0,0001 ou 0,00001).

Les cellules non infectées montraient une confluence très élevée dès 24 heures en normoxie, avec une mortalité assez importante et des cellules pavimenteuses. À 48 et 72 heures, certaines cellules avaient commencé à se différencier et présentaient une taille plus importante que les autres. Les cellules en hypoxie montraient également une confluence très élevée dès 24 heures, avec une mortalité assez importante. À 48 et 72 heures, la confluence est restée élevée et le taux de mortalité a augmenté. Après 72 heures, les cellules montraient des signes de souffrance (bordures cellulaires dentelées) (**Figure 19 a**).

Pour les cellules infectées par *Dichelobacter nodosus* à une DO = 0,01, les cellules présentaient une confluence élevée aux différents temps avec un taux de mortalité croissant de 24 à 72 heures, que ce soit pour les cellules exposées à 3 ou 21% d'oxygène. Cependant, au niveau des cellules en hypoxie, quelques cellules filamenteuses sont apparues 72 heures après infection (**Figure 19 b**).

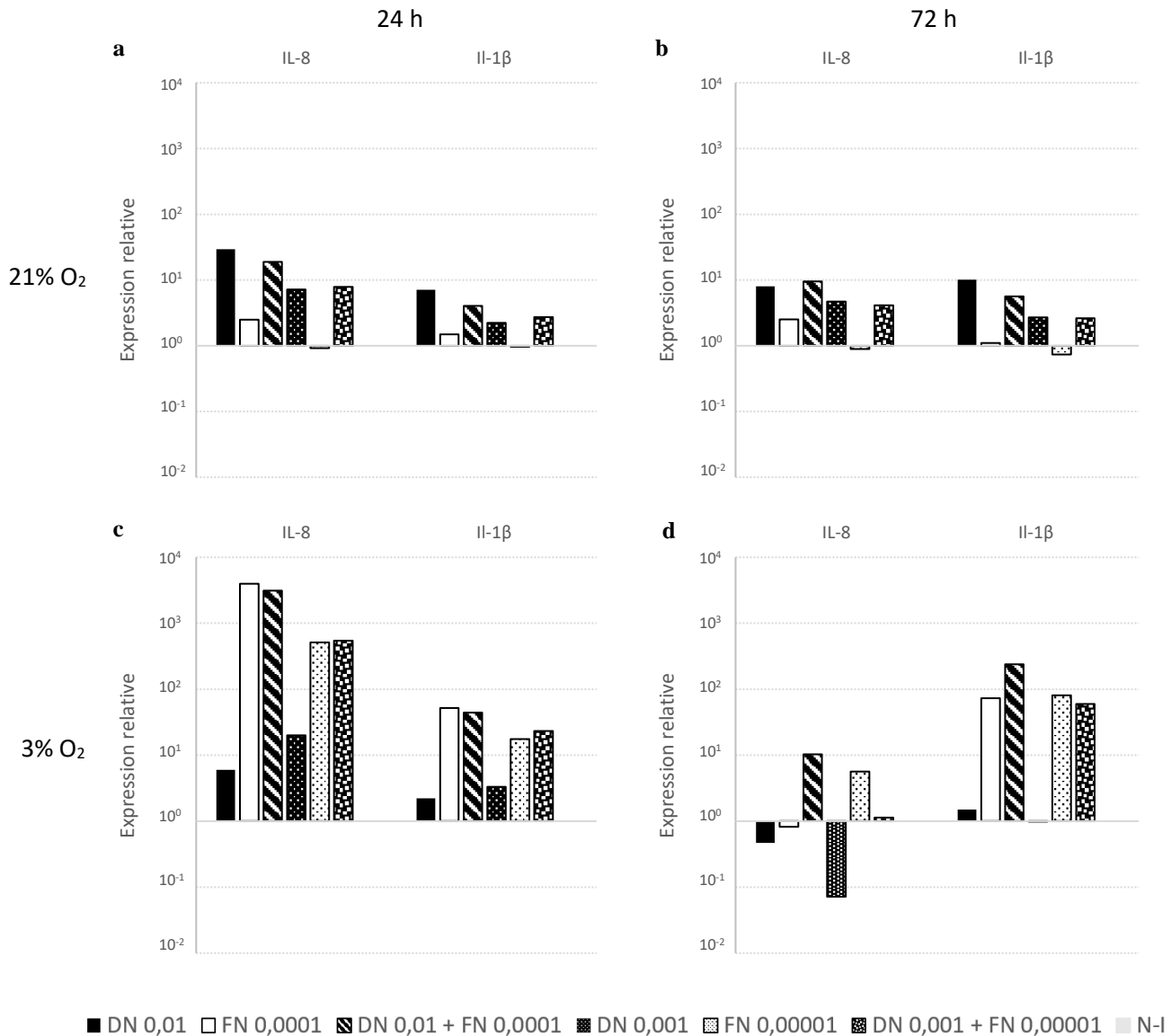
Pour les cellules infectées par *Fusobacterium necrophorum* à une DO = 0,0001, en normoxie et 24 heures après l'infection, les cellules présentaient une confluence élevée avec un taux de mortalité assez important mais les cellules avaient une conformation pavimenteuse. À 48 et 72 heures post infection, la confluence avait diminué et la mortalité cellulaire avait augmenté. De plus, certaines cellules présentaient un phénotype de cellules en souffrance. En revanche, pour les cellules en hypoxie, les cellules s'étaient toutes décrochées de la plaque dès 24 heures post-infection, formant des agrégats multifocaux. À 48 et 72 heures, la taille de ces agrégats augmentait et leur nombre diminuait (**Figure 19 c**).





**Figure 19 | Étude de l'impact de l'infection par *D. nodosus* (DN) à une DO = 0.01 et/ou *F. necrophorum* (FN) à une DO = 0.0001 sur des N/tert, en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>).**

Au niveau des cellules infectées à la fois par *D. nodosus* (DO = 0,01) et *F. necrophorum* (DO = 0,0001), des cellules filamenteuses peuvent être observées dès 24 heures post-infection en normoxie, ainsi qu'un taux de mortalité important mais une confluence élevée. À 72 heures après l'infection, la confluence des cellules avait diminué, le taux de mortalité avait augmenté, ainsi que le nombre de cellules filamenteuses. En revanche, en hypoxie, aucune cellule vivante ne pouvait être observée dès 24 heures post-infection. Il y avait un nombre important de gros agrégats multifocaux. À 48 et 72 heures, les agrégats focaux étaient toujours présents et aucune cellule n'a pu être observée attachée à la plaque (**Figure 19 d**).



**Figure 20 | Effet de l'infection par diverses quantités de *D. nodosus* et/ou *F. necrophorum* sur des kératinocytes humains immortalisés en normoxie et en conditions hypoxiques.**

**a, b.** Expression relative d'IL-8 et IL-1 $\beta$  comparés à RPLPO dans des kératinocytes humains immortalisés après infection par les bactéries responsables du piétin en normoxie (21% O<sub>2</sub>), **a.** 24h ou **b.** 72h après infection. **c, d.** Expression relative d'IL-8 et IL-1 $\beta$  comparés à RPLPO dans des kératinocytes humains immortalisés après infection par les bactéries responsables du piétin en conditions hypoxiques (3% O<sub>2</sub>), **c.** 24h ou **d.** 72h après infection. Analyse performée une seule fois. N-I : cellules non-infectées.

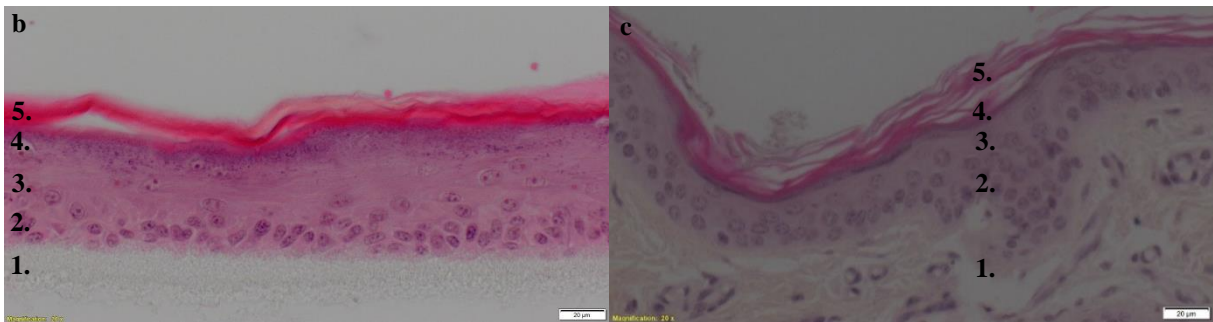
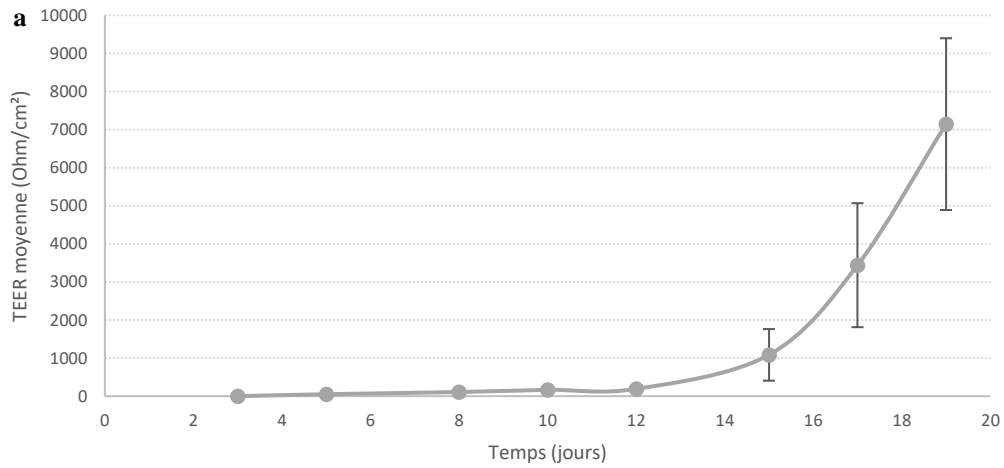
Concernant les cellules infectées avec *D. nodosus* et/ou *F. necrophorum* à des concentrations dix fois inférieures, moins d'effets cytopathiques ont été observés à tous les temps et pour toutes les conditions. Cependant, il est intéressant de noter que des cellules vivantes étaient toujours observables à 48 et 72 heures pour les cellules infectées par les deux bactéries simultanément alors que toutes les cellules étaient mortes à ces temps-là pour les cellules uniquement infectées par *F. necrophorum* (**Figure supplémentaire 6**).

En regardant l'expression des différents marqueurs en normoxie, 24 heures après l'infection, une surexpression d'IL-8 et d'IL-1 $\beta$  peut être observée dans toutes les conditions. Il est intéressant de noter que, dans les deux cas, l'expression des marqueurs inflammatoires est plus marquée au niveau des cellules infectées par *D. nodosus* que des cellules infectées par *F. necrophorum* (**Figure 20 a**). 72 heures après l'infection, la réponse cellulaire liée aux deux marqueurs étudiés semble avoir diminué mais conserve un profil assez similaire (**Figure 20 b**).

Au niveau des cellules en hypoxie, un profil différent est observé 24 heures après l'infection. En effet, il semble y avoir une surexpression des marqueurs inflammatoires par les cellules infectées par *F. necrophorum* seule et cette surexpression semble plus marquée que celle observée suite à l'infection par *D. nodosus* seule. Il semblerait également qu'une plus faible concentration en *D. nodosus* induise une inflammation plus importante et qu'une plus faible concentration en *F. necrophorum* entraîne une inflammation plus faible (**Figure 20 c**). 72 heures après l'infection en milieu hypoxique, une diminution de la réponse via IL-8 est observée au niveau des cellules infectées dans toutes les conditions, avec une diminution de l'expression au niveau des cellules infectées par *D. nodosus* et la plus grande concentration en *F. necrophorum*. Au niveau de la réponse IL-1 $\beta$ , en revanche, la réponse semble diminuée pour les cellules infectées par *D. nodosus* seule mais reste stable pour les cellules infectées par *F. necrophorum* seule ou par les deux bactéries simultanément (**Figure 20 d**).

### 3.6 Reconstruction d'un épiderme de mouton

Afin d'établir un modèle d'épiderme de mouton reconstruit à partir de kératinocytes normaux de moutons, Des kératinocytes de mouton ont été isolés à partir de biopsies de peau, cultivés et différenciés pendant 19 jours. La résistance électrique transépithéliale (TEER) a été mesurée tous les deux jours dans le but d'évaluer l'évolution de l'épiderme. La TEER est restée basse jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour, avant d'entamer une augmentation exponentielle (**Figure 21 a**). Au 19<sup>ème</sup> jour, deux RSEs ont été sacrifiés afin de performer une analyse histologique. Ces RSE étaient complètement différenciés en épiderme et présentaient les quatre couches qu'on retrouve dans un épiderme *in vivo*, avec la couche basale composée de petites cellules prolifératives, la couche épineuse composée de plus grandes cellules, la couche granuleuse caractérisée par la présence de granules de kératohyaline et la couche cornée, dépourvue de noyaux (**Figure 21 b**).



**Figure 21 | Évaluation de la reconstruction d'un modèle d'épiderme de mouton après 19 jours de différenciation.**

**a.** Évolution de la TEER au cours du temps (n = 11). **b.** Épiderme de mouton reconstruit (200x) : 1. Filtre en fibre de polycarbonate, 2. Couche basale, 3. Couche épineuse, 4. Couche granuleuse, 5. Couche cornée (échelle = 20 µm). **c.** Peau de mouton (20x) : 1. Derme, 2. Couche basale, 3. Couche épineuse, 4. Couche granuleuse, 5. Couche cornée (échelle = 20 µm).



## 4. Conclusion et perspectives

Le piétin est une pathologie de l'espace interdigité du mouton, ayant pour origine l'infection de la peau par *Dichelobacter nodosus*, une bactérie anaérobie stricte. Une autre bactérie anaérobie stricte, *Fusobacterium necrophorum* est suspectée de jouer un rôle dans le développement de la pathologie mais son impact n'est pas clairement établi (Bennett *et al.* 2009; Maboni *et al.* 2017b). Deux hypothèses principales sont avancées. La première suggère que *F. necrophorum* infecterait l'espace interdigité, le fragiliserait et faciliterait ainsi une surinfection par *D. nodosus*, causant le piétin (Egerton *et al.* 1969; Roberts and Egerton 1969). La deuxième hypothèse suggère que *F. necrophorum* agirait plutôt comme un organisme opportuniste et serait un acteur secondaire (Frosth *et al.* 2015; Clifton and Green 2016). Le développement d'un modèle d'étude *in vitro* du piétin permettrait d'étudier la dynamique d'infection par ces deux bactéries, l'interaction entre celles-ci et l'épiderme ovin et permettrait d'élucider le rôle précis de *Dichelobacter nodosus* et de *Fusobacterium necrophorum* dans le développement de la pathologie.

Durant ce mémoire, l'objectif principal était l'étude de l'expression de divers marqueurs inflammatoires (cytokines et peptides antimicrobiens) ainsi que l'évaluation de la réponse tissulaire et cellulaire faisant suite à l'infection par *D. nodosus* et *F. necrophorum*. Un autre objectif étant l'élaboration d'un modèle d'épiderme ovin reconstruit à partir de kératinocytes normaux permettant l'étude de cette réponse.

Bien que, de premier abord, il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'évolution de la densité optique, le nombre de CFUs et le nombre des copies du gène codant pour l'ARN 16S de *Dichelobacter nodosus*, un lien entre les trois méthodes d'évaluation de la croissance de la bactérie a pu être établi. En effet, les bactéries en croissance dans le milieu FAB poussent d'abord lentement jusqu'à 12 heures. Ensuite, à 16 heures, un pic peut être observé à la fois au niveau des CFUs et au niveau de la qPCR. À partir de 24 heures, le plateau est atteint en densité optique et le nombre de CFUs devient difficile à compter de par l'aspect flou des colonies et la pousse difficile de la bactérie aux dilutions plus importantes. L'atteinte du plateau et la formation de colonies floues correspond à l'apparition de formes longues de *D. nodosus*. Il semblerait donc que la bactérie arrête de se répliquer après 16 heures.

Cette croissance lente et variable de *Dichelobacter nodosus* avec apparition de bactéries longues avait déjà été observée dans les années 70 avec une concentration maximale allant de  $1,75 \cdot 10^8$  à  $8,0 \cdot 10^8$  bactéries par ml. L'observation de l'arrêt de croissance et l'apparition de bactéries longues survenait après 16 à 36 heures de croissance en milieu liquide (Skerman 1975). L'aspect « flou » des colonies avait également déjà été observé (Zanolari *et al.* 2021).

Typiquement, la courbe de croissance de bactéries, anaérobies ou non, dans un milieu liquide qui leur est adapté présente une phase exponentielle suivie d'un plateau, (Taylor-Robinson and Taylor-Robinson 2002; Sainsus *et al.* 2008; Graver and Wade 2011). C'est sur base de cette croissance exponentielle que le temps de dédoublement d'une bactérie peut être calculé. Le temps de dédoublement en milieu liquide de *Dichelobacter nodosus* n'a donc pas pu être calculé car la croissance de la bactérie ne semble pas présenter de phase exponentielle. Sans ce temps de dédoublement, aucune comparaison statistique de la croissance des deux souches au sein d'un même milieu ou dans les différents milieux n'a pu être réalisée. L'absence de phase exponentielle lors de la croissance de la bactérie en milieu liquide laisse à penser que les milieux FAB et TAS ne seraient pas totalement adaptés à la croissance de *Dichelobacter nodosus*.



Contrairement à ce qui est observé chez *D. nodosus*, lors de la croissance de *Fusobacterium necrophorum* en milieu FAB, une courbe sigmoïde est observée, avec une phase exponentielle, ce qui permet de calculer au mieux le temps de dédoublement de la bactérie qui est de plus ou moins 2 heures. De plus, la corrélation entre la DO et le nombre de CFU est plus facile à observer puisque les deux suivent la même tendance. Enfin, il est intéressant de remarquer qu'une forme longue de *F. necrophorum* a pu être détectée, bien que ce soit longtemps après que la DO ait atteint un plateau. Une qPCR était prévue pour évaluer l'évolution du nombre de bactéries au cours du temps mais les primers designés n'ont pas permis l'amplification d'ADN bactérien. De nouveaux primers doivent donc être conçus à cette fin.

Afin d'évaluer la croissance des bactéries, un hémacytomètre aurait pu être utilisé (Elbing and Brent 2019). Cela permet d'obtenir une concentration en bactéries plus précise que celle extrapolée à partir de l'absorbance détectée par un spectrophotomètre. Cependant, l'utilisation d'un spectrophotomètre permet d'évaluer rapidement la croissance des bactéries.

*Dichelobacter nodosus* poussant difficilement en milieu liquide, contrairement à *Fusobacterium necrophorum*, on pourrait penser que *D. nodosus* serait plus sensible à la présence d'oxygène dans son environnement. Cependant, il a été observé que *D. nodosus* semble moins impacté par la présence d'oxygène dans son environnement que *F. necrophorum*. En effet, bien qu'il soit difficile de quantifier avec précision la croissance de chaque bactérie sur gélose, puisque la quantité exacte de bactéries initialement déposée n'a pas été déterminée, *Fusobacterium necrophorum* n'est plus capable de former un tapis bactérien en présence de 10% d'oxygène. Il s'agit donc d'une bactérie faiblement aérotolérante, ce qui explique le bénéfice apporté par les thérapies par chambres hyperbares (Hill 1976). En revanche, *Dichelobacter nodosus* est capable de se répliquer et de former un tapis bactérien en présence de 10% d'oxygène, bien que celui-ci soit moins étoffé que le tapis formé en présence de 3% d'oxygène. Cela confirme l'aérotolérance de *D. nodosus* (Zanolari *et al.* 2021). Cependant, la sensibilité de *D. nodosus* à l'oxygène a été confirmée car la bactérie n'était pas capable de former un tapis bactérien, ni même des colonies en présence de 21% d'oxygène.

La droite de calibration pour le gène de ménage GAPDH montre un bon coefficient de corrélation et une efficacité de 94% (**Figure supplémentaire 1 c**). En comparant l'expression des différentes cibles à celle de GAPDH, une faible diminution de l'expression de NFκB et une augmentation de l'IL-8 ont été observées. Cependant, en comparant l'expression de GAPDH à l'expression de la β-actine, des différences ont été observées. Puisqu'il a été rapporté que la β-actine est plus stable que GAPDH au niveau de l'épiderme ovin (Maboni *et al.* 2017a), l'expression des marqueurs inflammatoires y a été rapportée.

L'infection de kératinocyte normaux de mouton avec un nombre important de bactéries induit un effet cytopathique important dans les 24 heures après l'infection, causant la mort d'un grand nombre de cellules. L'étude de la réponse inflammatoire associée via qPCR est donc difficile. Il est possible qu'une partie de l'ARN initialement présent dans ces cellules ait été dégradé, par exemple à cause de la libération d'enzymes lysosomales. De fait, peu d'ARN a pu être extrait de ces cellules. Une autre infection avec des concentrations moindres en bactéries a donc été réalisée, dans l'espoir d'observer des effets cytopathiques plus modérés et plus tardifs afin de pouvoir étudier au mieux l'inflammation induite par la présence des bactéries simultanément. Cependant, une fois de plus, peu d'ARN a pu être extrait de ces NSK infectés, ce qui n'a pas permis d'étudier l'inflammation induite en normoxie. Toutefois, l'inflammation induite en hypoxie a pu être étudiée mais la diminution de l'expression de chaque marqueur étudié, 72 heures après l'infection indique que l'expression du gène de ménage (en l'occurrence, la β-actine), pourrait varier d'une condition à l'autre et ainsi fausser l'analyse. Afin d'éviter d'avoir

un biais lié à la variabilité de l'expression du gène de ménage, la conception de primers permettant l'amplification de divers gènes de ménage et l'analyse de ceux-ci via les programmes geNorm, NormFinder ou BestKeeper serait judicieux (Huang *et al.* 2016; Maboni *et al.* 2017a).

Il est globalement accepté que l'hypoxie peut induire une réponse inflammatoire (Eltzschig and Carmeliet 2011). Dans notre modèle, l'hypoxie à long terme semble induire une réponse inflammatoire au niveau des kératinocytes humains immortalisés et cette réponse semble impliquer IL-8 et IL-1 $\beta$ . Il serait intéressant de déterminer si cette réponse implique également des peptides antimicrobiens et de la comparer à la réponse inflammatoire due à l'anoxie sur un même intervalle de temps. La peau étant naturellement en hypoxie (Mieremet *et al.* 2019), il serait également intéressant de comparer l'expression des différents marqueurs entre les kératinocytes en monocouche, les épidermes reconstruits et la peau *in vivo*. Pour pouvoir étudier au mieux l'expression de marqueurs inflammatoires suite à l'infection par les bactéries, des kératinocytes humains ont été testés, avec RPLPO pour gène de ménage. En normoxie, une réponse IL-8 et IL-1 $\beta$  plus forte est observée lorsque les cellules sont infectées par *D. nodosus*, seule ou en combinaison avec *F. necrophorum*. En revanche, en hypoxie, il semblerait que la réponse liée à la présence de *F. necrophorum* seule soit plus importante, allant de pair avec une souffrance importante observée au niveau de ces cellules, en comparaison avec les infectées par *D. nodosus* seule. Cette réponse via l'expression d'IL-8 et IL-1 $\beta$  est similaire à la réponse qui a été observée suite à des tests d'infection par des bactéries anaérobies (Steintraesser *et al.* 2010; de Breij *et al.* 2012; Maboni *et al.* 2017a; Maboni *et al.* 2017b).

D'un point de vue de la morphologie cellulaire, il semblerait que les cellules soient plus en souffrance lorsque de fortes concentrations des deux bactéries sont présentes à leur surface. En revanche, lorsque de faibles concentrations des deux types de bactéries sont utilisées, les cellules semblent souffrir moins que lorsque seule *F. necrophorum* est présente à leur surface. Jusqu'à présent, aucune autre étude n'a réalisé de co-infection avec ces deux pathogènes. Il est donc difficile de confronter ces résultats à la littérature.

Il est intéressant de noter que la réponse liée aux peptides antimicrobiens n'a pas pu être déterminée au niveau des kératinocytes humains infectés dans les conditions testées. En effet, aucune expression de l'ARNm codant pour hBD2 n'a pu être détectée au niveau des cellules infectées par *F. necrophorum* ou *F. necrophorum* et *D. nodosus*, peu importe leur concentration. En revanche, cet ARNm a pu être détecté dans les autres conditions. Il pourrait donc y avoir une diminution de l'expression de hBD2 suite à l'infection par *F. necrophorum*.

Suite aux infections sur kératinocytes de mouton et kératinocytes humains avec les mêmes concentrations en bactérie, il semblerait que la réponse inflammatoire et cellulaire soit plus prononcée lorsque l'infection a lieu dans un environnement hypoxique. Cela pourrait être dû à une sensibilité accrue des cellules en conditions hypoxiques, à une virulence accrue des bactéries anaérobies en conditions hypoxiques ou à une combinaison des deux.

Cependant, il est important de noter que, sur base des résultats obtenus, les cellules ovines semblent plus sensibles à l'infection par *D. nodosus*, tandis que les cellules humaines semblent plus sensibles à l'infection par *F. necrophorum*. L'infection d'un épiderme humain ne serait donc pas représentative du piétin. L'infection d'un modèle d'épiderme ovin reconstruit avec les deux bactéries et l'étude de la modification de l'expression des différents marqueurs et cytokines inflammatoires ainsi que des peptides antimicrobiens suite à cette infection serait intéressante. Afin de mieux définir la réponse immunitaire suite à l'infection, il serait également

intéressant d'étudier la libération de marqueurs inflammatoires dans le milieu de culture et non seulement la production d'ARNm.

Une fois ce modèle au point, il pourrait également être utilisé afin d'étudier le comportement des bactéries après l'infection. On pourrait, par exemple, analyser la croissance des bactéries sur épithélium via quantification de leur ADN génomique, analyser leur mobilité au sein de l'épithélium et observer la pénétration des bactéries dans l'épiderme. Cela pourrait se faire par *Fluorescent in situ Hybridization* ou FISH (Maboni *et al.* 2017b) ou en transformant les bactéries pour qu'elles expriment une protéine fluorescente (ex : GFP). On pourrait même envisager de faire exprimer des marqueurs différents par ces bactéries, afin de pouvoir différencier les souches de *D. nodosus* et *F. necrophorum* sur l'épithélium.

La synergie entre les bactéries impliquées dans le piétin pourrait être étudiée en infectant l'épiderme avec différentes concentrations en bactéries et en infectant un même épiderme avec d'abord une des bactéries, puis l'autre. Cela permettrait éventuellement d'observer des différences au niveau de l'invasion de l'épiderme ou de la réponse tissulaire et cela pourrait permettre d'élucider le rôle exact de *Fusobacterium necrophorum* dans le piétin (Bennett and Hickford 2011; Maboni *et al.* 2016). Dans la nature, le piétin se développe surtout sur des pieds humides et abîmés, ce qui facilite l'infection par *D. nodosus* (Bennett *et al.* 2009; Clifton and Green 2016; Maboni *et al.* 2017b). Il pourrait donc être intéressant créer des petites lésions à la surface des épithéliums afin de mimer au mieux les conditions retrouvées sur le terrain.

Le piétin se développant généralement en plusieurs semaines (Kuhnert *et al.* 2019; Zanolari *et al.* 2021), un allongement de la viabilité du modèle, serait nécessaire à l'étude du développement de la pathologie dans les conditions les plus proches possibles de ce qui est retrouvé dans les élevages (c'est-à-dire, avec une plus faible quantité de bactéries au départ). Pour cela, il faudrait développer un système permettant l'oxygénation et le renouvellement du milieu de culture et de l'épiderme, sans perturber l'anoxie.

Enfin, on pourrait étudier l'impact des différents facteurs de virulences (fimbriae, protéines extra membranaires et protéases) en créant différents mutants des deux bactéries et en observant le comportement de ces mutants sur épiderme reconstruit. On pourrait également étudier le phénomène de résistance au piétin observé dans certaines espèces comme le mouflon en infectant des épidermes de mouflon ou des épidermes obtenus à partir de kératinocytes provenant de races de mouton résistantes.

En conclusion, le modèle de cultures primaires de kératinocytes normaux de mouton développé dans ce travail permet l'étude d'infections par des bactéries anaérobies en conditions hypoxiques pendant au minimum 72 heures et permet l'analyse de la réponse immunitaire via quantification de l'ARNm. Ce modèle pourrait également être utilisé pour l'analyse de la libération de différents marqueurs dans le milieu de culture et servir de base au développement d'un modèle 3D d'épiderme reconstruit. Ce modèle serait utile à l'étude du piétin mais pourrait également être utilisé pour étudier de nombreuses autres infections de la peau par des organismes anaérobies.

## 5. Références

- Abbott KA, Lewis CJ. 2005. Current approaches to the management of ovine footrot. *Vet J* **169**: 28-41.
- Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, Braye F, Auger FA, Damour O. 2009. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *European journal of dermatology : EJD* **19**: 107-113.
- Bennett G, Hickford J, Sedcole R, Zhou H. 2009. *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe* **15**: 173-176.
- Bennett GN, Hickford JG. 2011. Ovine footrot: new approaches to an old disease. *Vet Microbiol* **148**: 1-7.
- Cederlöf SE, Hansen T, Klaas IC, Angen Ø. 2013. An evaluation of the ability of *Dichelobacter nodosus* to survive in soil. *Acta veterinaria Scandinavica* **55**: 4.
- Checkley SL, Janzen ED, Campbell JR, McKinnon JJ. 2005. Efficacy of vaccination against *Fusobacterium necrophorum* infection for control of liver abscesses and footrot in feedlot cattle in western Canada. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* **46**: 1002-1007.
- Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, Magorien JE, Blauvelt A, Kolls JK, Cheung AL *et al.* 2010. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* **120**: 1762-1773.
- Clifton R, Giebel K, Liu N, Purdy KJ, Green LE. 2019. Sites of persistence of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus*: a paradigm shift in understanding the epidemiology of footrot in sheep. *Sci Rep* **9**: 14429.
- Clifton R, Green L. 2016. Pathogenesis of ovine footrot disease: a complex picture. *The Veterinary record* **179**: 225-227.
- Davenport R, Heawood C, Sessford K, Baker M, Baiker K, Blacklaws B, Kaler J, Green L, Töttemeyer S. 2014. Differential expression of Toll-like receptors and inflammatory cytokines in ovine interdigital dermatitis and footrot. *Veterinary immunology and immunopathology* **161**: 90-98.
- de Breij A, Eveillard M, Dijkshoorn L, van den Broek PJ, Nibbering PH, Joly-Guillou ML. 2012. Differences in *Acinetobacter baumannii* strains and host innate immune response determine morbidity and mortality in experimental pneumonia. *PLoS One* **7**: e30673.
- De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, De Glas V, de Rouvroit CL, Poumay Y. 2014. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **1195**: 191-201.
- Depiazzi LJ, Henderson J, Penhale WJ. 1990. Measurement of protease thermostability, twitching motility and colony size of *Bacteroides nodosus*. *Vet Microbiol* **22**: 353-363.
- Dhungyel O, Hunter J, Whittington R. 2014. Footrot vaccines and vaccination. *Vaccine* **32**: 3139-3146.
- Egerton JR, Roberts DS, Parsonson IM. 1969. The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. I. A histological study of the bacterial invasion. *Journal of comparative pathology* **79**: 207-215.

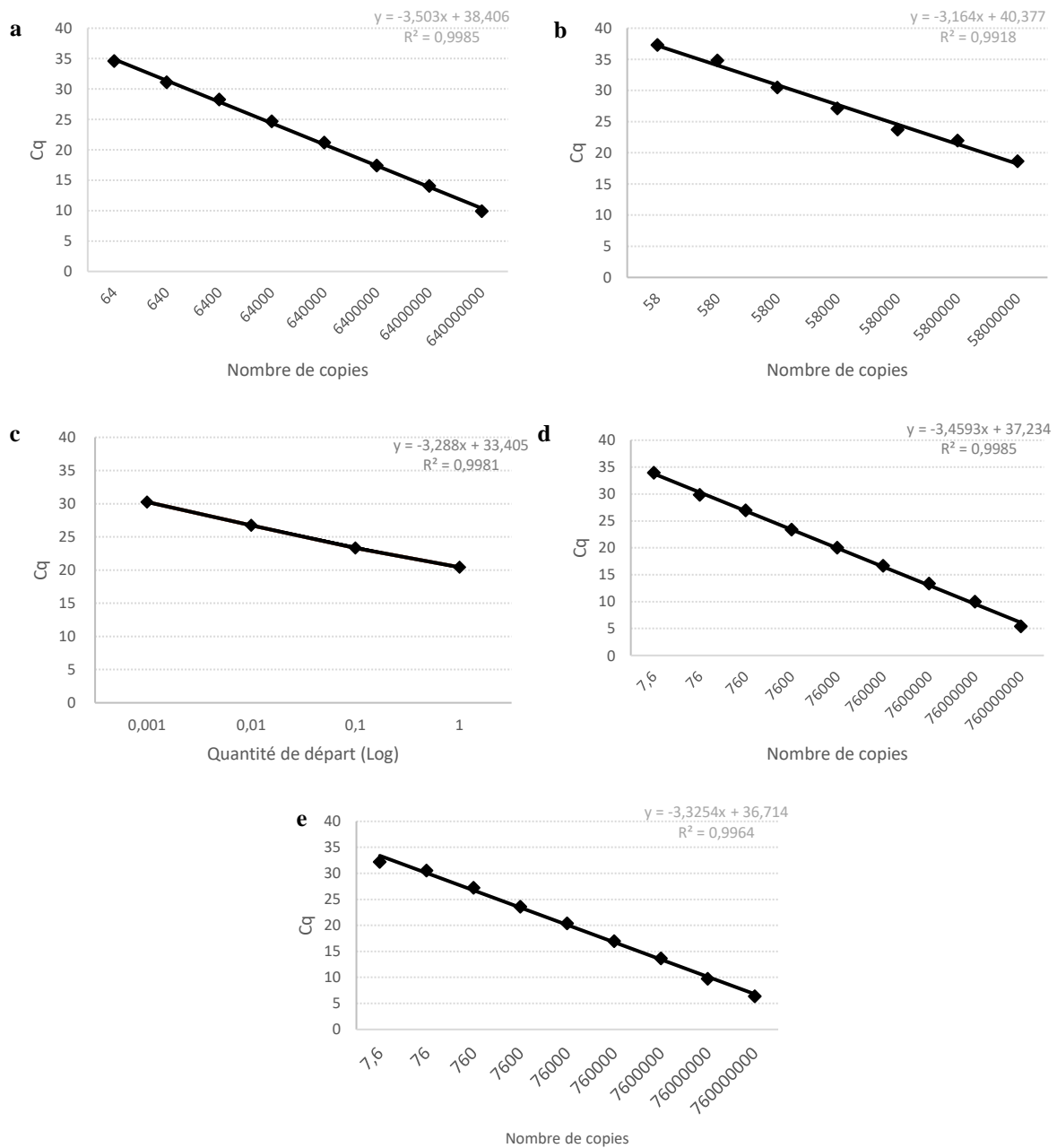
- Elbing KL, Brent R. 2019. Growth of *E. coli* in Liquid Medium. *Current protocols in molecular biology* **125**: e81.
- Eltzschig HK, Carmeliet P. 2011. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* **364**: 656-665.
- Frost S, König U, Nyman AK, Pringle M, Aspán A. 2015. Characterisation of *Dichelobacter nodosus* and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in sheep with different clinical manifestations of footrot. *Vet Microbiol* **179**: 82-90.
- Frost S, Sletteemeås JS, Jørgensen HJ, Angen O, Aspán A. 2012. Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. *Acta veterinaria Scandinavica* **54**: 6.
- Gauthier J-F. 2004. Le piétin. (ed. Sndgt vétérinaires). Société nationale des groupements techniques vétérinaires Société nationale des groupements techniques vétérinaires
- Graham NP, Egerton JR. 1968. Pathogenesis of ovine foot-rot: the role of some environmental factors. *Australian veterinary journal* **44**: 235-240.
- Graver MA, Wade JJ. 2011. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **10**: 8.
- Green LE, George TR. 2008. Assessment of current knowledge of footrot in sheep with particular reference to *Dichelobacter nodosus* and implications for elimination or control strategies for sheep in Great Britain. *Vet J* **175**: 173-180.
- Härdis-Landerer MC, Stoffel A, Dürr S, Steiner A. 2019. [Footbath as treatment of footrot in sheep. Current -situation on Swiss sheep farms]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* **161**: 377-386.
- Hill GB. 1976. Hyperbaric oxygen exposures for intrahepatic abscesses produced in mice by nonsporeforming anaerobic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **9**: 312-317.
- Huang Y, Chen Y, Sun H, Lan D. 2016. Stability of Reference Gene Expression After Porcine Sapelovirus Infection in Porcine Intestinal Epithelial Cells. *Viral immunology* **29**: 343-349.
- Juráňová J, Franková J, Ulrichová J. 2017. The role of keratinocytes in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine* **15**: 169-179.
- Kennan RM, Wong W, Dhungyel OP, Han X, Wong D, Parker D, Rosado CJ, Law RH, McGowan S, Reeve SB *et al.* 2010. The subtilisin-like protease AprV2 is required for virulence and uses a novel disulphide-tethered exosite to bind substrates. *PLoS pathogens* **6**: e1001210.
- Krishna S, Miller LS. 2012. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Seminars in immunopathology* **34**: 261-280.
- Kuhnert P, Cippà V, Härdis-Landerer MC, Schmicke M, Ulbrich S, Locher I, Steiner A, Jores J. 2019. Early Infection Dynamics of *Dichelobacter nodosus* During an Ovine Experimental Footrot In Contact Infection. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* **161**: 465-472.
- Laurencet ME, Rosset-Zufferey S, Schrenzel J. 2019. Atypical presentation of Lemierre's syndrome: case report and literature review. *BMC infectious diseases* **19**: 868.



- Lee SE, Kim JM, Jeong SK, Jeon JE, Yoon HJ, Jeong MK, Lee SH. 2010. Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Archives of dermatological research* **302**: 745-756.
- Locher I, Giger L, Frosth S, Kuhnert P, Steiner A. 2018. Potential transmission routes of *Dichelobacter nodosus*. *Vet Microbiol* **218**: 20-24.
- Maboni G, Blanchard A, Frosth S, Stewart C, Emes R, Töttemeyer S. 2017a. A distinct bacterial dysbiosis associated skin inflammation in ovine footrot. *Sci Rep* **7**: 45220.
- Maboni G, Davenport R, Sessford K, Baiker K, Jensen TK, Blanchard AM, Wattedgedera S, Entrican G, Töttemeyer S. 2017b. A Novel 3D Skin Explant Model to Study Anaerobic Bacterial Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**: 404.
- Maboni G, Frosth S, Aspán A, Töttemeyer S. 2016. Ovine footrot: new insights into bacterial colonisation. *The Veterinary record* **179**: 228.
- Matejuk A. 2018. Skin Immunity. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **66**: 45-54.
- Mieremet A, Vázquez García A, Boiten W, van Dijk R, Gooris G, Bouwstra JA, El Ghalbzouri A. 2019. Human skin equivalents cultured under hypoxia display enhanced epidermal morphogenesis and lipid barrier formation. *Sci Rep* **9**: 7811.
- Muzafar M, Green LE, Calvo-Bado LA, Tichauer E, King H, James P, Wellington EMH. 2016. Survival of the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus* in different soils. *Anaerobe* **38**: 81-87.
- Popov L, Kovalski J, Grandi G, Bagnoli F, Amieva MR. 2014. Three-Dimensional Human Skin Models to Understand *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Infection. *Frontiers in immunology* **5**: 41.
- Raadsma HW, McEwan JC, Stear MJ, Crawford AM. 1999. Genetic characterisation of protective vaccine responses in sheep using multi-valent *Dichelobacter nodosus* vaccines. *Veterinary immunology and immunopathology* **72**: 219-229.
- Reymond B, Huette P, Roger PA, Tredez E, Gagneur O, Sanguin S, Guihéneuf R, Dupont H, Mahjoub Y, Abou Arab O. 2019. Fatal *Fusobacterium necrophorum* infection with gynecological Lemierre's syndrome. *Medecine et maladies infectieuses* **49**: 72-74.
- Roberts DS, Egerton JR. 1969. The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. II. The pathogenic association of *Fusiformis nodosus* and *F. necrophorus*. *Journal of comparative pathology* **79**: 217-227.
- Sainsus N, Cattori V, Lepadatu C, Hofmann-Lehmann R. 2008. Liquid culture medium for the rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **27**: 1209-1217.
- Scagliarini A, Dal Pozzo F, Gallina L, Guercio A, De Clercq E, Snoeck R, Andrei G. 2005. Ovine skin organotypic cultures applied to the ex vivo study of orf virus infection. *Veterinary research communications* **29 Suppl 2**: 245-247.

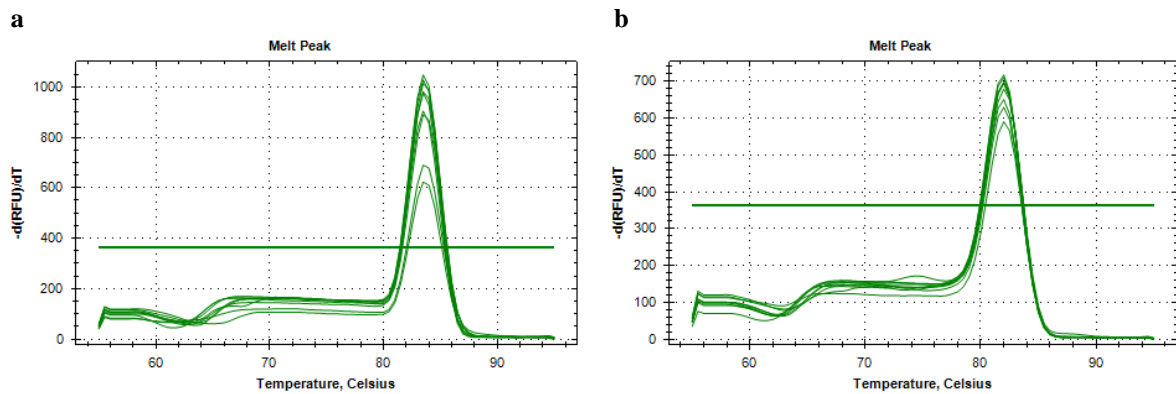
- Shanthalingam S, Narayanan S, Batra SA, Jegarubee B, Srikumaran S. 2016. *Fusobacterium necrophorum* in North American Bighorn Sheep ( *Ovis canadensis* ) Pneumonia. *Journal of wildlife diseases* **52**: 616-620.
- Skerman TM. 1975. Determination of some in vitro growth requirements of *Bacteroides nodosus*. *Journal of general microbiology* **87**: 107-119.
- Souci L, Denesvre C. 2021. 3D skin models in domestic animals. *Veterinary research* **52**: 21.
- Stäuble A, Steiner A, Normand L, Kuhnert P, Frey J. 2014. Molecular genetic analysis of *Dichelobacter nodosus* proteases AprV2/B2, AprV5/B5 and BprV/B in clinical material from European sheep flocks. *Vet Microbiol* **168**: 177-184.
- Steinstraesser L, Sorkin M, Niederbichler AD, Becerikli M, Stupka J, Daigeler A, Kesting MR, Stricker I, Jacobsen F, Schulte M. 2010. A novel human skin chamber model to study wound infection ex vivo. *Archives of dermatological research* **302**: 357-365.
- Taylor-Robinson AW, Taylor-Robinson D. 2002. Evaluation of liquid culture media to support growth of *Mobiluncus* species. *Journal of medical microbiology* **51**: 491-494.
- Van TT, Cox LM, Cox ME, Dien Bard J. 2017. Prevalence of *Fusobacterium necrophorum* in Children Presenting with Pharyngitis. *Journal of clinical microbiology* **55**: 1147-1153.
- Wani SA, Farooq S, Kashoo ZA, Hussain I, Bhat MA, Rather MA, Aalamgeer S. 2019. Determination of prevalence, serological diversity, and virulence of *Dichelobacter nodosus* in ovine footrot with identification of its predominant serotype as a potential vaccine candidate in J&K, India. *Tropical animal health and production* **51**: 1089-1095.
- Watson SA, Pisansarakit P, Moore GP. 1994. Sheep vibrissa dermal papillae induce hair follicle formation in heterotypic skin equivalents. *The British journal of dermatology* **131**: 827-835.
- Whittington RJ. 1995. Observations on the indirect transmission of virulent ovine footrot in sheep yards and its spread in sheep on unimproved pasture. *Australian veterinary journal* **72**: 132-134.
- Witcomb LA, Green LE, Calvo-Bado LA, Russell CL, Smith EM, Grogono-Thomas R, Wellington EM. 2015. First study of pathogen load and localisation of ovine footrot using fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Vet Microbiol* **176**: 321-327.
- Witcomb LA, Green LE, Kaler J, Ul-Hassan A, Calvo-Bado LA, Medley GF, Grogono-Thomas R, Wellington EM. 2014. A longitudinal study of the role of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* load in initiation and severity of footrot in sheep. *Preventive veterinary medicine* **115**: 48-55.
- Yusuf E, Halewyck S, Wybo I, Piérard D, Gordts F. 2015. *Fusobacterium necrophorum* and other *Fusobacterium* spp. isolated from head and neck infections: A 10-year epidemiology study in an academic hospital. *Anaerobe* **34**: 120-124.
- Zanolari P, Dürr S, Jores J, Steiner A, Kuhnert P. 2021. Ovine footrot: A review of current knowledge. *Vet J* **271**: 105647.
- Zhou H, Hickford JG, Armstrong KF. 2001. Rapid and accurate typing of *Dichelobacter nodosus* using PCR amplification and reverse dot-blot hybridisation. *Vet Microbiol* **80**: 149-162.

## 6. Figures supplémentaires



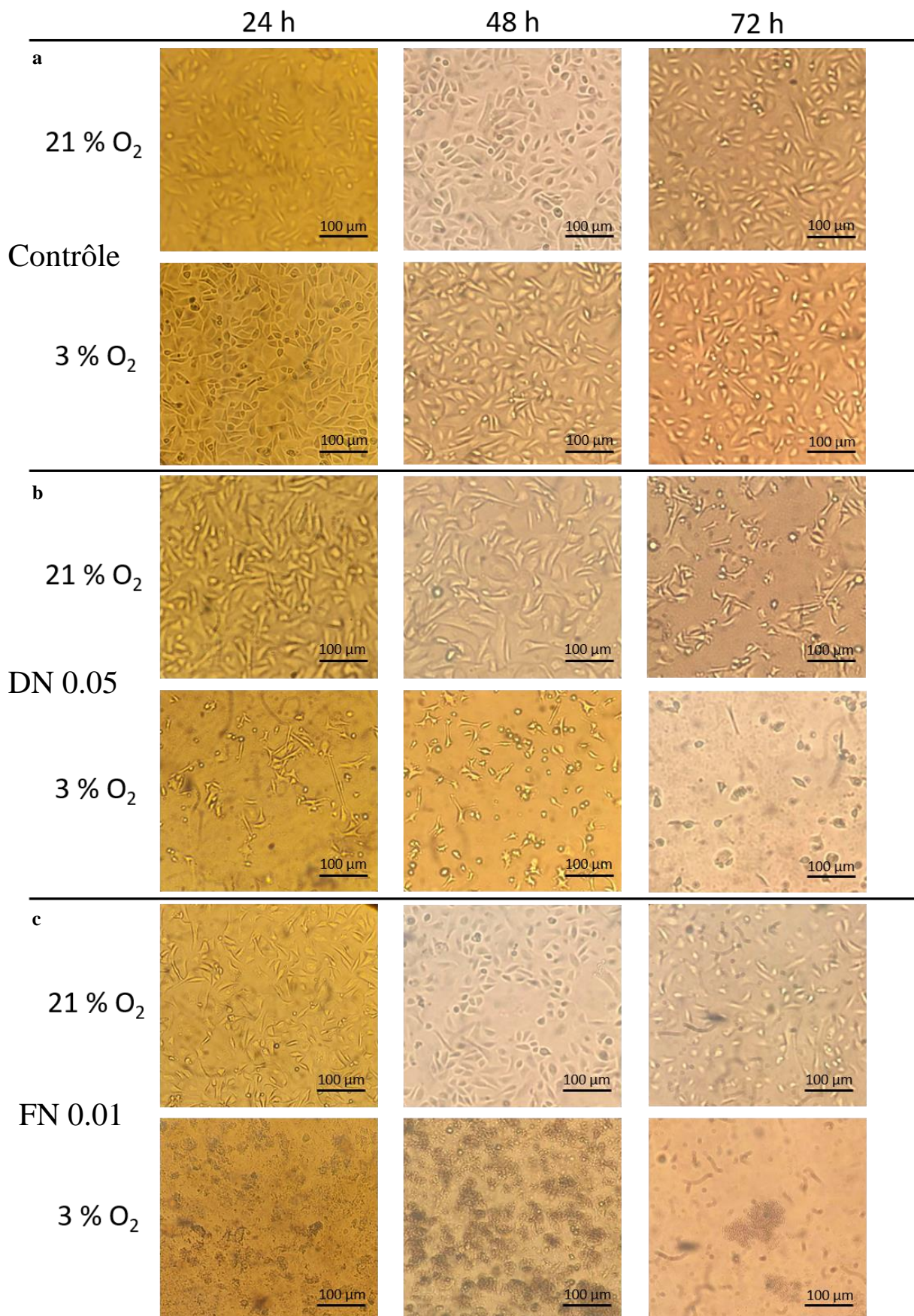
**Figure supplémentaire 1 | Droites de calibration des couples de primers utilisés lors des différentes qPCR.**

Droite de calibration des primers **a.** du gène de l'ARN 16S de *Dichelobacter nodosus* cloné dans un plasmide, **b.** du gène codant pour la protéase APRV2 de *Dichelobacter nodosus* inséré dans un plasmide, **c.** de l'ADNc de GAPDH ovin, **d.** de l'ADNc de SBD1, **e.** de l'ADNc de SMAP29.



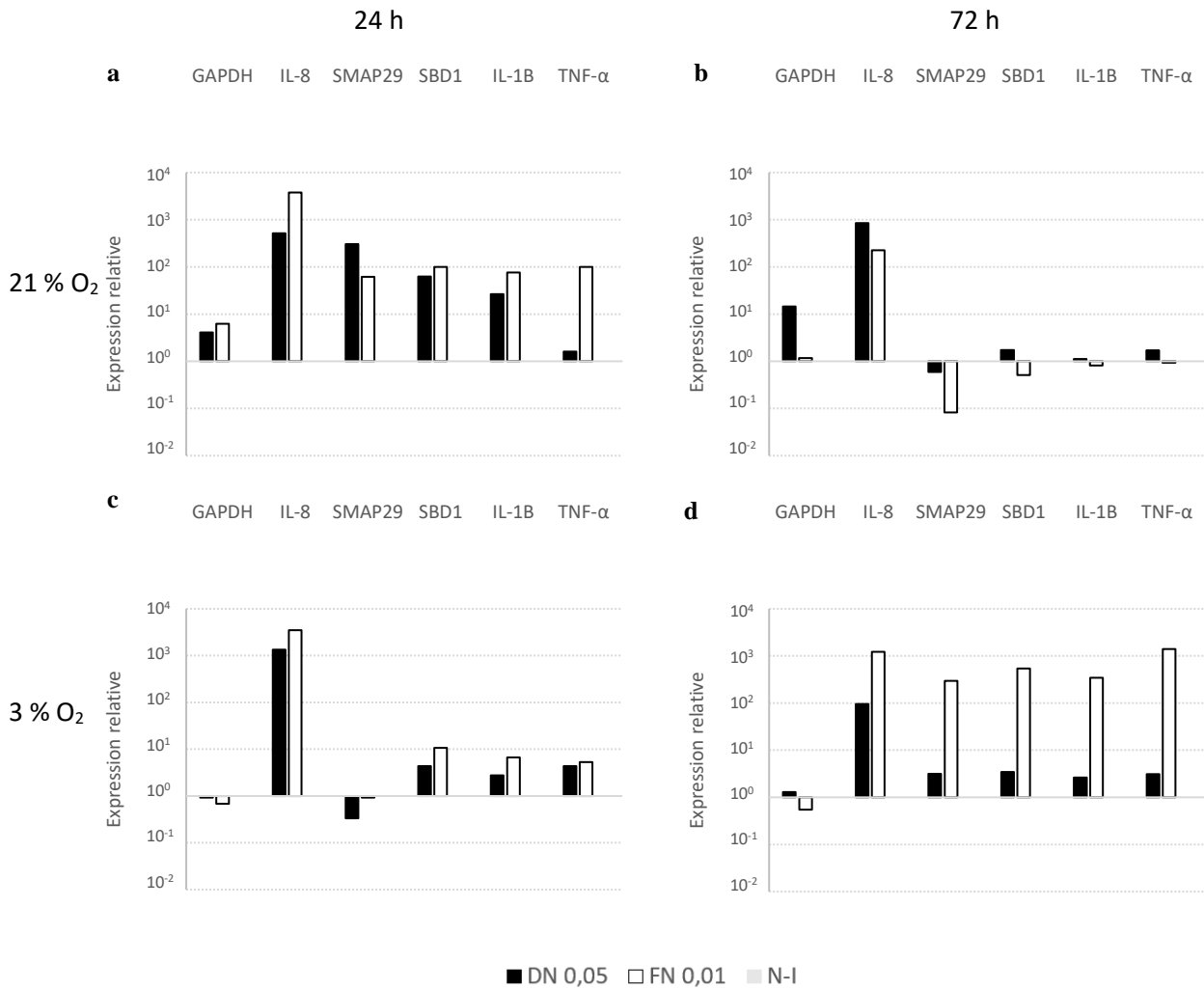
**Figure supplémentaire 2 | Analyse des courbes de dissociation après une qPCR ciblant des peptides antimicrobiens.**

**a.** Courbe de dissociation de SBD1. **b.** Courbe de dissociation de SMAP29Bio-Rad CFX Manager software.



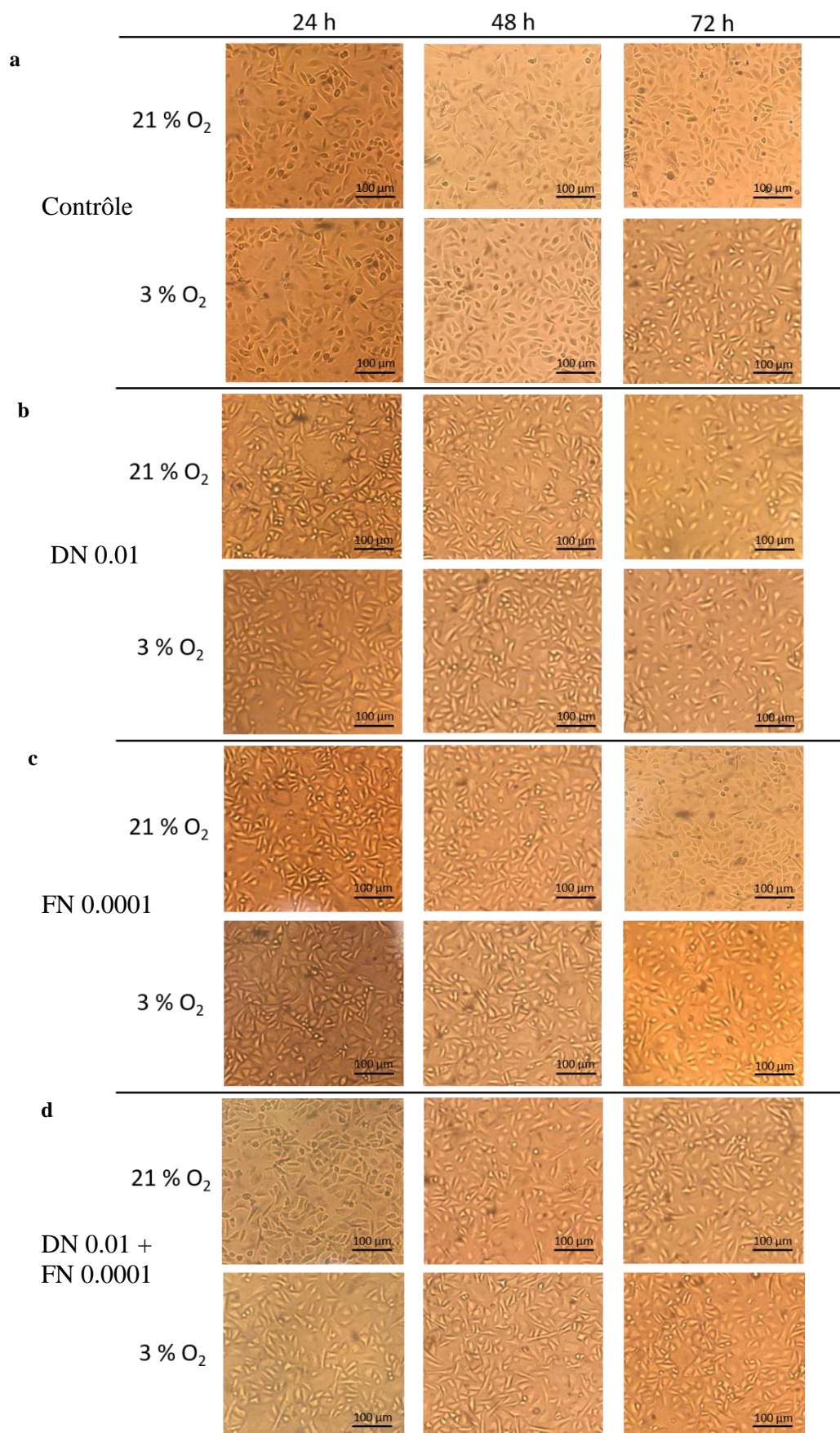
**Figure supplémentaire 3 | Étude de l'impact de l'infection par *D. nodosus* (DN) à une DO = 0.05 ou *F. necrophorum* (FN) à une DO = 0.01 sur des NSK, en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>).**





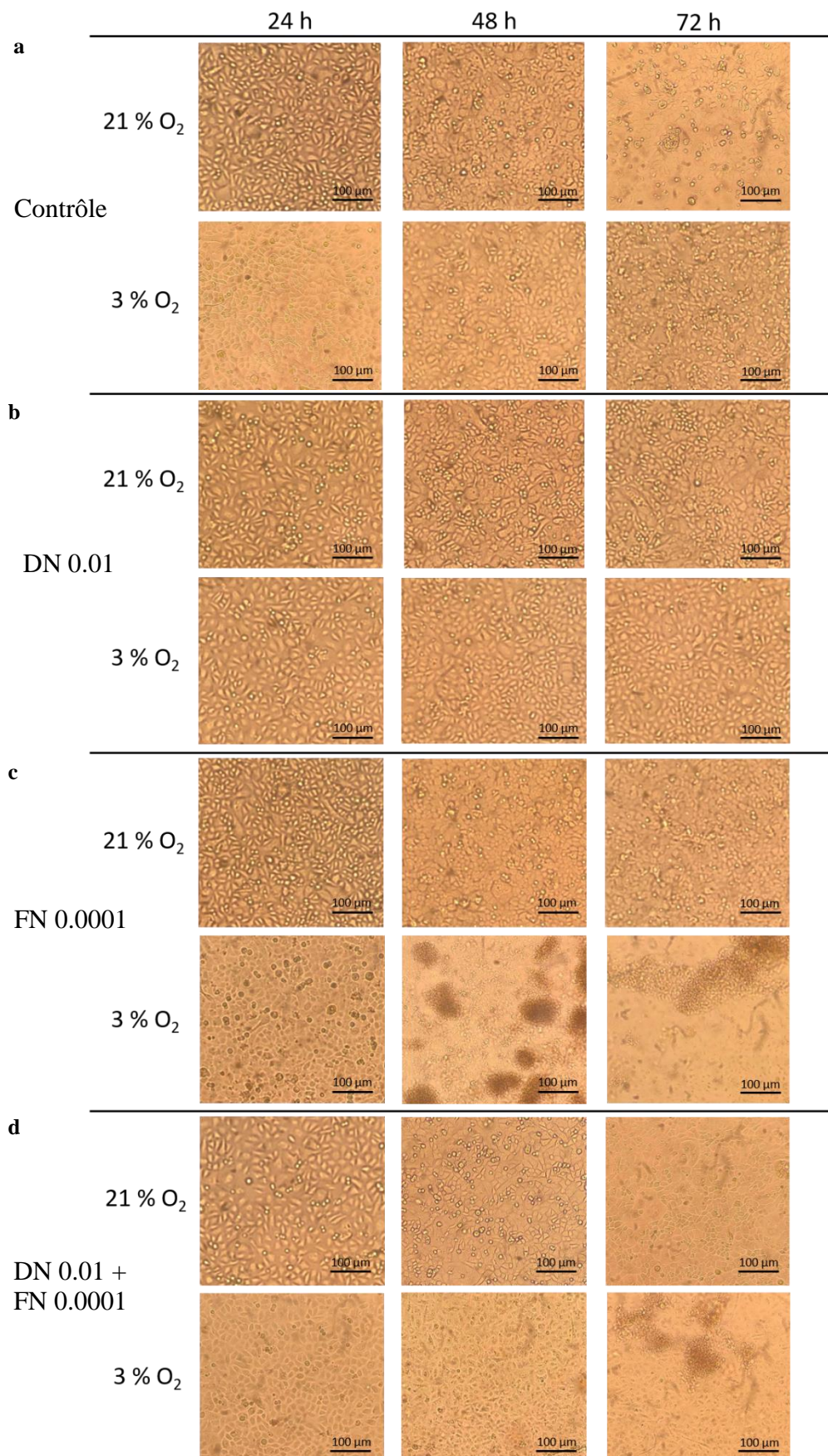
**Figure supplémentaire 4 | Étude de différences d'expression de divers marqueurs inflammatoires et peptides antimicrobiens suite à l'infection de NSK par *D. nodosus* ou *F. necrophorum* en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>).**

**a, c.** Expression relative de GAPDH, IL-8, SMAP29, SBD1, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , comparée à l'expression du gène de la  $\beta$ -actine, 24h après l'infection par les bactéries responsables du piétin et en **a.** normoxie (21% d'oxygène) ou en **c.** en conditions hypoxiques (3% d'oxygène). **b, d.** Expression relative de divers gènes, comparée à l'expression du gène de la  $\beta$ -actine, 72h après l'infection par les bactéries responsables du piétin et en **b.** normoxie (21% d'oxygène) ou en **c.** en conditions hypoxiques (3% d'oxygène).



**Figure supplémentaire 5 | Étude de l'impact de l'infection par *D. nodosus* (DN) à une DO = 0.001 et/ou *F. necrophorum* (FN) à une DO = 0.00001 sur des NSK, en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>).**





**Figure supplémentaire 6 | Étude de l'impact de l'infection par *D. nodosus* (DN) à une DO = 0.001 et/ou *F. necrophorum* (FN) à une DO = 0.00001 sur des N/tert, en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>).**