



HAL
open science

Étude de l'impact de la génétique de l'hôte et de la composition du microbiote intestinal sur le portage de *Salmonella Enteritidis* chez la souris et la poule

Anaïs Cazals

► **To cite this version:**

Anaïs Cazals. Étude de l'impact de la génétique de l'hôte et de la composition du microbiote intestinal sur le portage de *Salmonella Enteritidis* chez la souris et la poule. Génétique animale. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL096 . tel-03600951

HAL Id: tel-03600951

<https://theses.hal.science/tel-03600951v1>

Submitted on 8 Mar 2022

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

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

Etude de l'impact de la génétique de l'hôte et
de la composition du microbiote intestinal sur
le portage de *Salmonella* Enteritidis chez la
souris et la poule

*Study of the impact of host genetics and gut microbiota
composition on Salmonella Enteritidis carriage in mice and chickens*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat: Génétique

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 09 décembre 2021, par

Anaïs CAZALS

Composition du Jury

Hélène GILBERT

Directrice de recherche, INRAE, GenPhySE, Université
de Toulouse

Présidente & Rapporteur

Binnaz YALCIN

Chargée de recherche, INSERM, NeuroGeMM,
Université de Bourgogne Franche Comté

Rapporteur &
Examinatrice

Olga SOUTOURINA

Professeure, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Daniel VAIMAN

Directeur de recherche, INSERM, Université de Paris

Examineur

Direction de la thèse

Fanny CALENGE

Chargée de recherche, INRAE, GABI

Directrice de thèse

Jean JAUBERT

Chargé de recherche, Institut Pasteur

Co-encadrant de thèse

Remerciements

Je tiens en tout premier lieu à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : Binnaz Yalcin et Hélène Gilbert en qualité de rapporteurs, ainsi que Daniel Vaiman et Olga Soutourina en qualité d'examineurs.

Je tiens à remercier vivement mes deux directeur.rices de thèse, Fanny Calenge et Jean Jaubert. Merci pour votre confiance et votre soutien sans faille malgré ces temps « covidésques ». Ces trois années auront été remplies de nouvelles expériences et de nouveaux savoirs scientifiques que je ne suis pas prête d'oublier. Encore un grand Merci !

Je remercie également mes deux financeurs : la région Ile-de-France (projet DIM1HEALTH) et le département de génétique animale (GA) de l'INRAE sans qui ces travaux n'auraient pu être menés. Merci également aux deux instituts de recherche qui m'ont accueillie : l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement) et l'Institut Pasteur.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de mon comité de thèse : Christel Marie-Etancelin, Laetitia Travier et Philippe Velge. Merci pour votre soutien et pour toutes nos discussions enrichissantes. Un remerciement particulier à Laetitia pour avoir tenu le rôle de tutrice de thèse.

Merci à l'école doctorale SDSV, notamment à Sandrine Le Bihan, Pierre Capy et Jean-Luc Pernodet pour leur aide dans mes démarches administratives et pour leurs conseils.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'unité expérimentale à Nouzilly où ont été menées les expérimentations sur les poussins notamment Pierrette Menanteau et Philippe Velge. Mais aussi, merci à l'ensemble du personnel des animaleries de l'Institut Pasteur où ont été menées les expérimentations sur les souris.

Deux instituts de recherches, c'est deux fois plus de rencontres formidables ! Merci donc à l'ensemble des membres de mes deux équipes de recherche : l'équipe GEMS de l'unité GABI à l'INRAE et l'équipe du Laboratoire de Génétique de la Souris du département Génomes et Génétique à l'Institut Pasteur. Merci pour votre accueil, votre bienveillance et tous vos conseils scientifiques et/ou personnels. Un remerciement particulier à Xavier Montagutelli, pour ses conseils, son expertise, et sa formidable gestion d'équipe à l'Institut Pasteur !

Merci à mes collègues de bureau de l'Institut Pasteur d'aujourd'hui ou d'hier : Caroline, Laurine, Marie, Océane et Lucie. Merci pour votre aide, votre soutien, nos discussions de travail productives mais aussi celles non productives ! Laurine, Marie, c'est bon, je ne vous ai pas oubliées ;)

Merci à mes actuels collègues de bureau de l'INRAE, Gaëtan et Pascal, pour leur sérénité malgré mes sautes d'humeur en ces dernières semaines de rédaction du mémoire. Merci également à celles et ceux qui ont partagé ce bureau quelques temps avec moi : Francesca (Vieni a trovarmi in qualsiasi momento nel sud della Francia), Lourdes (Buenos recuerdos de nuestro viaje a Mont-Saint-Michel), Hervé (avec qui j'ai pu parler Français) et Boubacar. Que de bons souvenirs !

Il faut également que je remercie tous ceux et celles qui m'ont aidé de près ou de loin dans la mise en œuvre de mon projet de thèse. Une aide technique de choc : Jean-Luc (pour nos manipulations ARN et ddPCR), Nicolas Bruneau (pour nos extractions d'ADN et nos PCR), Nicolas Lebrun (préparateur en chef du bâtiment 320) mais aussi Sandrine (référente solution-mère pour extraction d'ADN). Une aide précieuse en bio-informatique et en biostatistiques d'une qualité inégalée: Jordi (pour les analyses 16S), Andrea (pour les analyses RNA-seq) et Pascal (pour les analyses de QTL mapping).

Un grand merci également à toute l'équipe de la Plateforme @bridge et en particulier à Marie-Noëlle et Déborah qui ont participé de près à mon projet de thèse sur les étapes d'extraction d'ADN et de séquençage 16S. Merci aussi à Claudia pour la mise à disposition des machines de ddPCR. Et merci à tous les autres (que je ne citerai pas de peur d'en oublier), pour ces moments passés à la cantine ou à la pause-café.

Il ne me faut pas oublier également Vivi ! Merci pour tout, ton aide administrative précieuse mais surtout pour ta positive attitude contagieuse !

J'en arrive à des remerciements plus personnels.

Merci à Antoine, Guillaume, Lauréna, Léa, Loïc et Mélanie (par ordre alphabétique, comme ça pas de jaloux). Chacun d'entre vous est une inspiration pour moi ! Vous me manquez alors promis, la prochaine fois, je viens avec vous en voyage ! Je n'aurai plus d'excuses du genre : « Je ne peux pas j'ai manipulations » ou « Je ne peux pas j'ai rédaction de mémoire ».

Merci, Aurélie, pour la petite virée à Rennes et ta recette de soupe crevette gingembre que je refais souvent ^^

Merci les filles ex. toulousaines, expatriées aux quatre coins de la France: Florence, Sandrine et Alice. Merci pour le bon vieux temps, nos soirées, nos week-ends, nos projets de vacances avortés (#covid) et tout ce qui nous attend encore.

Merci Noémie, pour tes récits de voyage improbable, nos virées cerises, et tout et tout... Je te souhaite bon courage pour ta thèse !

Et pour finir et pas les moindres... Abarna, Bertrand, Céline, Déborah, Emy, Héloïse et Mayrone. Sans cette thèse, on ne se serait pas rencontré. Merci pour nos soirées en soirée ou en journée (#couvre-feu). Merci pour les fous rires, les joies, les peines, les surprises, etc ... Merci d'arriver à me suivre dans mes délires. Vous avez tous été d'un soutien exceptionnel ces derniers mois. Mille merci ! Mention spéciale pour Déborah : qu'aurais-je fait sans toi ces 3 dernières années ? Tu es géniale !

Et enfin, ma famille ! Merci, Maman, pour ton soutien téléphonique et tes bons petits plats cet été qui m'ont fait tenir lors de la rédaction. Papa, merci pour ton éternel optimisme et ton soutien infaillible. Sylvain, merci pour ton accueil lors du premier confinement. Tu m'as sauvé de deux mois dans 20m² sans balcon ! Célia, merci pour ton soutien et tes histoires de boulot qui changent les idées. Merci aussi à Mamie, Papi, Tati Claire, Boris, et à tous les autres ...

Enfin, merci à toi personne que j'ai certainement oublié dans mes remerciements.

A tous, un grand merci !

Table des matières

Liste des abréviations.....	10
Table des illustrations	13
Liste des tableaux.....	15
Introduction générale.....	17
Partie 1 : Les salmonelles	19
I. Le genre <i>Salmonella</i> : taxonomie et nomenclature	19
II. Habitats, mode de contamination et enjeux	20
1) Les salmonelles chez l'Homme.....	21
2) Les salmonelles dans les élevages de poule pondeuse.....	22
III. Les défenses de l'hôte contre les salmonelles	27
1) La muqueuse intestinale : barrière physique et chimique.....	27
2) L'immunité innée	28
3) L'immunité adaptative	31
IV. Les facteurs de virulence des salmonelles	32
V. Mécanismes d'infection des cellules intestinales	34
Partie 2 : Impact de la génétique de l'hôte sur la réponse à SE.....	36
VI. Les modèles expérimentaux utilisés	36
1) Le modèle « souris ».....	37
2) Le modèle « poulet ».....	42
VII. Les méthodes de génétique quantitative	44
1) Les caractères quantitatifs	44
2) Les variants génétiques.....	45

3) Les puces à ADN	47
4) Le QTL mapping.....	48
5) L'identification des gènes candidats	54
VIII. La résistance à SE : les QTLs chez la souris et la poule.....	55
1) Les QTLs chez la souris	55
2) Les QTLs chez la poule.....	56
3) Les gènes identifiés	56
Partie 3 : L'impact du microbiote sur la résistance à SE.....	61
IX. Le microbiote intestinal.....	61
1) Les fonctions du microbiote intestinal.....	63
2) La diversité du microbiote intestinal.....	64
3) Eubiose, dysbiose et santé de l'hôte.....	66
X. Les méthodes d'analyses du microbiote.....	66
1) Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S	67
2) Le séquençage du métagénome intestinal	70
XI. Microbiote intestinal chez la poule et mécanismes de résistance à SE	70
1) Composition du microbiote intestinal chez la poule et facteurs de variation.....	70
2) Impact du microbiote dans la résistance à SE chez la poule.....	74
3) La modulation du microbiote intestinal comme levier contre SE.....	76
XII. Le contrôle génétique de la composition du microbiote chez la poule.....	79
Objectifs de la thèse, Matériel et Méthodes	82
I. Objectifs de la thèse.....	84
II. Matériel et méthodes	85
1) Le modèle « poulet ».....	85
2) Le modèle « souris ».....	89

Résultats	92
I. Article 1 : Impact de la lignée génétique sur la composition du microbiote et le portage de <i>Salmonella</i> Enteritidis chez la poule.....	94
II. Article 2 : Analyse de l'expression des gènes dans les tonsilles caecales de deux lignées expérimentales infectées par SE	123
III. Analyses complémentaires : Impact de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote fécal avant et après infection par SE.....	146
1) Introduction et objectifs.....	147
2) Matériel et méthodes	148
3) Résultats et discussion	150
4) Conclusion	166
IV. Article 3 : Identification de nouveaux loci impliqués dans la résistance à une infection par SE dans les souris du CC et du DO	168
Conclusion générale	189
I. Discussion générale	191
1) Deux modèles expérimentaux complémentaires	191
2) Discussion des résultats obtenus dans le modèle « poulet »	192
3) Discussion des résultats obtenus dans le modèle « souris »	206
II. Perspectives pour la filière avicole.....	215
Références bibliographiques.....	221

Liste des abréviations

129 : lignée 129S2/SvPasCrl

129Sv : lignée 12956/SvEvTac

A

A : Adénine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADOL : Avian Disease and Oncology
Laboratory

ANOVA : ANalysis Of Variance

APC : Antigen-Presenting Cell

ARN : Acide RiboNucléique

Asp : Acide aspartique

ASV : Amplicon Sequence Variant

B

B6 : C57BL/6J

BP: Biological Processes

Bp : Base pairs

C

CC : Collaborative Cross

CCOMS : Centre Collaborateur de l'OMS

ADNc : ADN complémentaire

CFU: Colony Forming Unit

cM : centiMorgan

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNV : Copy Number Variation

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short
Palindromic Repeats

D

DA : différentiellement abondants

DC : Cellules dendritiques

ddPCR : droplet digital PCR

DEG: differentially expressed genes

DGE : Differential gene expression

DO : Diversity Outbred

DPI: Days post infection

dsRNA : double-stranded RNA

E

EFSA : European Food Safety Authority

ERK : Extracellular signal-Regulated kinases

ET : EntéroTypes

F

FBO: Food-Borne Outbreaks

FROGS : Find Rapidly OTU with Galaxy
Solution

FDR: False discovery rate

G

GF : Germ-Free

Gly : Glycine

GO: Gene Ontology

GOS : Galacto-OligoSaccharides

GRP : Genetic Reference Population

GWAS : Genome-Wide Association Study

H

HMM : Hidden Markov Model

I

IFN : Interféron

IL : Interleukine.

INRAE : Institut national de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

InvA : Invasion protein A

IRF : Interferon Regulatory Factor

ISC: Individual *Salmonella* carriage

ITS : Internal Transcribed Spacer	OTU : Operational Taxonomic Unit
IV : Intraveineuse	P
J	PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
J : Jour	PBS : Phosphate-Buffered Saline
K	PCA : Principal Component Analysis
Ko : Knock-out	PCR : Polymerase Chain-Reaction
KO : KEGG ortholog	PEAT : Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours
L	PFIE : Plateforme d'Infectiologie Expérimentale
LITAF : LPS-Induced TNF- α Factor	PNLS : Programme National de Lutte contre les Salmonelles
LMM : Linear Mixed Model	PRR : Pattern Recognition Receptor
LOD score : Logarithm (base 10) Of the Odds score	PYR : PYRin-like domain
LPS : LipoPolySaccharide	Q
LRR : Leucine-Rich Repeat	QIIME : Quantitative Insights Into Microbial Ecology
M	QTL : Quantitative trait locus
MGI : Mouse Genome Informatics	R
MHC : Major Histocompatibility Complex	RNS : Reactive Nitrogen Species
MOS : MannanOligoSaccharides	ROS : Reactive Oxygen Species
MUGA : Mouse Universal Genotyping Array	S
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88	S. : <i>Salmonella</i>
N	SCFA : Short Chain Fatty Acids
NAPDH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate	SCV : <i>Salmonella</i> -Containing Vacuoles
NF-kB : Nuclear Factor-kappa B	SD : Standard Deviation
NLR : Nod-Like Receptor	SE : <i>Salmonella</i> Enteritidis
NMDS : Non-metric MultiDimensional Scaling	Ses : <i>Salmonella</i> Enteritidis Susceptibility
NOD : Nucleotide Oligomerization Domain	Slc11a1 : Solute carriers family 11 member 1
Nos2 : Nitric oxyde synthase 2	SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
Nramp1 : Natural resistance-associated macrophage protein 1	SPF : Santé Publique France
NTS : Non-Typhoidal <i>Salmonella</i>	SPI : <i>Salmonella</i> Pathogenicity Islands
O	sPLSDA : sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis
OMS : Organisation Mondiale de la Santé	

Spv : *Salmonella* plasmid virulence

ssRNA : single-stranded RNA

ST : *Salmonella* Typhimurium

T

T : Thymine

T3SS : Type Three Secretion System

TIAC : Toxi-Infections Alimentaires Collectives

TIRAP : Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR)

domain containing a Adaptor Protein

TLR : Toll-Like Receptor

TLR4 : Toll-Like Receptor 4

TRIF : Toll-like Receptor adaptor molecule 1

TSA : Trypticase Soy Broth

U

UFC : Unité formant colonie

W

WT : Wild Type

X

XOS : XyloOligoSaccharides

Table des illustrations

Figure 1 : <i>Salmonella enterica enterica</i> Enteritidis.	19
Figure 2 : La classification du genre <i>Salmonella</i>	20
Figure 3 : Nombre de cas de NTS pour 100 000 habitants en Europe en 2019.	22
Figure 4 : Nombre de NTS rapportées entre 2014 et 2016 en Europe et proportion des différents sérotypes par type d'élevage et chez l'Homme.	23
Figure 5 : Schéma de l'appareil digestif de la poule.	24
Figure 6 : Prévalence des salmonelles dont les sérotypes ont un impact sur la santé humaine dans les élevages de reproduction et les élevages de poules pondeuses entre 2007 à 2019.	25
Figure 7 : Les voies de signalisation des TLRs chez la poule.	29
Figure 8 : Différentes stratégies d'invasion de <i>Salmonella</i> dans les cellules eucaryotes.	33
Figure 9 : Le mécanisme d'infection par <i>Salmonella</i> et les défenses de l'organisme.	35
Figure 10 : Schéma des stratégies de croisement pour l'obtention de souris F2 (à gauche) et de souris N2 et N2F1 (à droite).	37
Figure 11 : Les quatre phases d'une infection sub-létale par <i>S. Typhimurium</i>	38
Figure 12 : Charges bactériennes dans la rate dans un modèle d'infection par SE (portage chronique) dans deux lignées consanguines C57BL/6J (point, ligne continue) et 129Sv/SvEvTac (129Sv) (triangle, ligne pointillée).	39
Figure 13 : Stratégies utilisées pour l'obtention des souris du Collaborative Cross et du Diversity Outbred ...	41
Figure 14 : Infection systémique chez la poule PA12 par SE type LA5 sauvage (point) ou isogénique pour la mutation bamB (croix).	42
Figure 15 : Nombre de gènes et effet des gènes expliquant un caractère quantitatif : contrôle polygénique ou monogénique.	45
Figure 16 : Exemples de variations génétiques pouvant avoir un impact sur des caractères quantitatifs.	47
Figure 17 : Principe d'une analyse de liaison.	49
Figure 18 : Principe d'une analyse d'association.	50
Figure 19 : Cartographie d'association sur le nombre de neutrophiles dans 742 souris DO.	51
Figure 20 : Reconstruction des haplotypes dans une population CC.	52
Figure 21 : Microbiome, microbiote et environnement de l'hôte.	62
Figure 22 : Principales fonctions du microbiote intestinal.	64
Figure 23 : Hétérogénéité du microbiote intestinal le long du tractus digestif chez l'Homme.	65
Figure 24 : Les deux principales approches pour l'étude du microbiote intestinal : les analyses 16S rRNA ou la métagénomique.	67
Figure 25 : Différence entre β -diversité et α -diversité.	69
Figure 26 : Composition du microbiote le long du tractus digestif chez la poule adulte.	72

Figure 27 : Les facteurs intrinsèques à l'hôte et environnementaux pouvant influencer le microbiote et donc la santé, le bien-être et les performances des poules.	73
Figure 28 : Exemple de mécanismes d'exclusion compétitive pour l'habitat et l'oxygène par les bactéries commensales (bactéries sporulées et Enterobacteriaceae) du microbiote chez la poule adulte	75
Figure 29 : Aperçu des mécanismes d'action des pro- et pré-biotiques.	79
Figure 30 : Schéma récapitulatif des méthodes employées pour le modèle « poulet ».....	86
Figure 31 : Etapes des analyses réalisées pour l'étude du microbiote (A) et pour l'étude de l'expression des gènes (B) pour le modèle « poulet ».	88
Figure 32 : Schéma récapitulatif des méthodes employées dans le modèle « souris ».	90
Figure 33 : Etapes des analyses de détection de QTLs avec R/QTL2 dans le modèle « souris ».	91
Figure 34 : Potentielles explications des variabilités de composition du microbiote observées entre lignées avant et après infection.	194
Figure 35 : Potentielles explications de variabilité de composition du microbiote observée entre faibles et forts porteurs de SE à J19 dans la lignée 61.....	198
Figure 36 : Résumé des résultats obtenus et hypothèses formulées pour expliquer les variabilités de portage observées intra et inter-lignées.	199
Figure 37 : Bilan des mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance de l'hôte à une infection par SE dans un environnement contrôlé.....	202
Figure 38 : Charge bactérienne après infection par SE dans les fientes ou les caecae d'individus de la lignée de White Leghorn PA12 avec ou sans l'utilisation d'isolateur.	203
Figure 39 : Corrélation entre la moyenne de la charge bactérienne dans le foie et dans la rate pour l'ensemble des lignées du CC testées.	207
Figure 40 : Corrélation entre la charge bactérienne dans le foie et dans la rate pour les souris du DO.	208
Figure 41 : Probabilités théoriques de détection de chacun des allèles des huit lignées parentales des CC en fonction du nombre de lignées dans l'analyse.	209
Figure 42 : Normalisation sur les charges des souris contrôle B6.	210
Figure 43 : Distribution des individus en fonction de la charge bactérienne dans la rate (A) et le foie (B). ...	213
Figure 44 : Génome scan binaire de la charge bactérienne dans la rate (A) et le foie (B).	214

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les TLRs et leurs ligands chez l'Homme et la poule	29
Tableau 2 : Liste des QTLs associés à la réponse à Salmonella Enteritidis chez la souris.	55
Tableau 3 : Liste des études ayant identifiées des QTLs associés à la réponse à Salmonella Enteritidis chez la poule.	56
Tableau 4 : Différences entre une OTU et un ASV.....	68
Tableau 5 : Articles scientifiques ayant étudié l'impact de la génétique sur la composition du microbiote chez la poule.....	80
Tableau 6 : Présentation des deux types de normalisations testés.....	211

INTRODUCTION GENERALE

Partie 1 : Les salmonelles

I. Le genre *Salmonella* : taxonomie et nomenclature

Les salmonelles (genre *Salmonella*) sont des bactéries Gram négatives de la famille des *Enterobacteriaceae*. De forme allongée dite bacille, elles mesurent avec le flagelle entre 2 et 5 μm de long pour un diamètre de 0,6 à 1 μm (Figure 1). Elles sont aéro-anaérobies facultatives, oxydase négatives, catalase positive et non sporogènes. Elles sont à l'origine de nombreuses maladies chez l'Homme, mais aussi chez les animaux.



Figure 1 : *Salmonella enterica enterica* Enteritidis.

Photographie disponible à l'adresse :

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Salmonella_enterica:_foodborne_illness

La nomenclature du genre *Salmonella* a longtemps été débattue [1]. Initialement, la classification était basée sur des données épidémiologiques, biochimiques et sérologiques. Avec le développement de nouvelles techniques d'analyse comme l'hybridation ADN-ADN, de nombreuses espèces de *Salmonella* ont été regroupées [2]. Aujourd'hui, deux espèces sont reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. La première étant divisée en 6 sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica* (Figure 2).

Chaque nouveau sérotype identifié est enregistré au Centre collaborateur de l'OMS (CCOMS) pour le typage et la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles (Institut Pasteur – France), selon le schéma de White Kauffmann - Le Minor, basé sur la description de trois antigènes de surface (O, H et K). A ce jour, plus de 2500 sérotypes ont été enregistrés avec plus de 50% appartenant à la sous-espèce *S. enterica enterica* [3], responsable à 99% des infections chez l'Homme et les animaux [4].

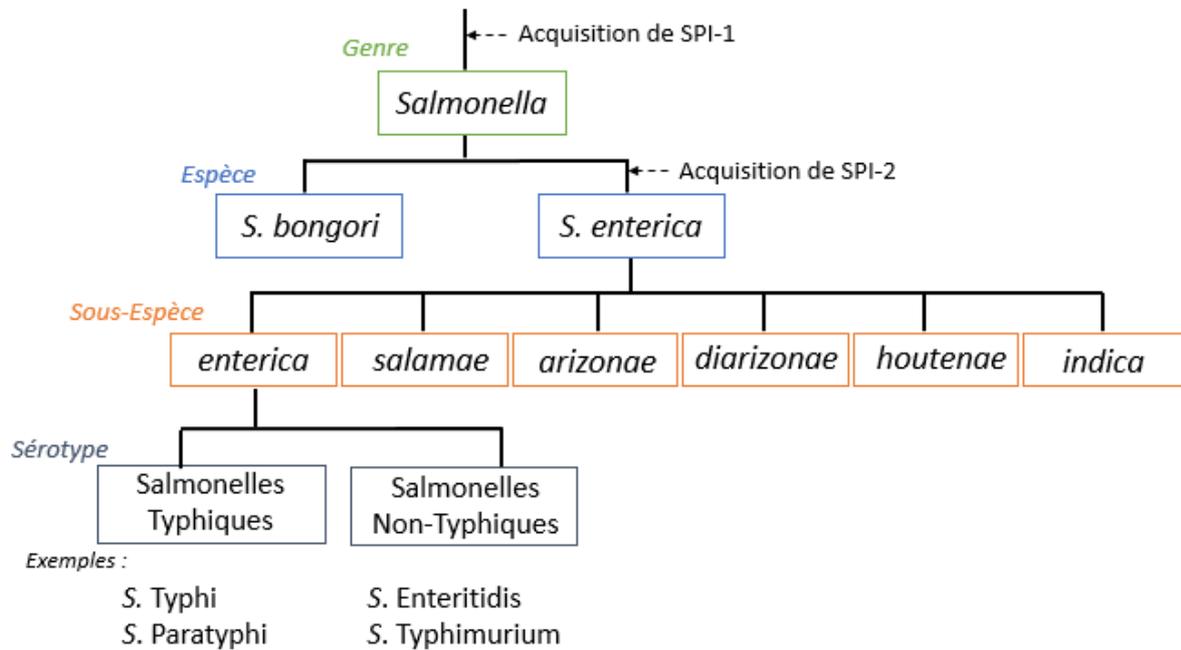


Figure 2 : La classification du genre *Salmonella*.

II. Habitats, mode de contamination et enjeux

Les salmonelles sont largement répandues dans le monde. Elles peuvent infecter les animaux de rente tels que les volailles, les bovins, les ovins, les porcins, les poissons [5], les animaux sauvages et les animaux de compagnie tels que les reptiles [6]. L'Homme peut être facilement infecté *via* la consommation d'aliments ou d'eau contaminés [7]. En fonction des types d'hôte et des symptômes qu'elles provoquent, trois groupes de *Salmonella enterica enterica* peuvent être identifiés [8] :

- les salmonelles provoquant des fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes chez l'Homme telles que *S. Typhi* et *S. Paratyphi* ;

- les salmonelles provoquant des salmonelloses non typhiques (NTS) chez l'Homme et adaptées à de nombreuses espèces animales (bovins, ovins, volailles, souris, ...) telles que *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*.
- les salmonelles adaptées à un type d'espèce comme par exemple *S. Gallinarum* chez la poule ou *S. Abortusovis* chez les ovins.

1) Les salmonelles chez l'Homme

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes

Les sérotypes responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont *S. Typhi* et *S. Paratyphi*. Les bactéries se transmettent par l'intermédiaire de nourriture ou d'eau contaminée et par contact entre malades. La maladie se propage plus facilement dans les pays en voie de développement où les conditions d'hygiène sont précaires. Les principaux symptômes sont la fièvre, les maux de tête, l'anorexie, l'abattement et les douleurs abdominales avec diarrhée ou constipation. En 2010, une étude estimait à près de 25 millions de cas de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et plus de 180 000 morts sur l'année [9]. Après plusieurs semaines, en fonction de la génétique de l'hôte, de la sévérité de l'infection et de facteurs environnementaux, le patient peut éliminer complètement la bactérie. Cependant, dans 5% des cas, il peut devenir porteur sain asymptomatique, on parle alors de portage chronique [10]. Ce réservoir environnemental pourrait expliquer la résurgence continue d'infections dans la population humaine.

Les gastroentérites ou salmonelloses non typhiques (NTS)

Les principaux sérotypes responsables de gastroentérites sont *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* [11]. Les élevages d'animaux de rente sont les principaux réservoirs environnementaux des salmonelles responsables de NTS chez l'Homme. Les NTS sont des zoonoses ; les bactéries sont transmises à l'Homme par la consommation de viande, d'œuf, de lait cru ou de fromage contaminés. Les principaux symptômes sont la fièvre, la diarrhée, les vomissements et les douleurs abdominales. En 2010 dans le monde, le nombre de cas d'intoxication alimentaire par des salmonelles non-typhiques a été estimé à plus de 150 millions avec près de 60 000 morts [9]. En Europe, les NTS sont la deuxième cause de Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) après les infections à *Campylobacter* [11]. Une TIAC est définie comme une intoxication d'au moins deux individus présentant les mêmes symptômes, dont la cause est

rapportée à une même origine alimentaire. Les TIAC sont obligatoirement déclarées. En France, la surveillance est assurée par l'agence nationale de santé publique (SPF). Ces dernières années (2015-2019), le nombre de cas de NTS semble rester stable en Europe : il était de 87 923 cas confirmés soit 20 cas pour 100 000 personnes en 2019 [11] (Figure 3).

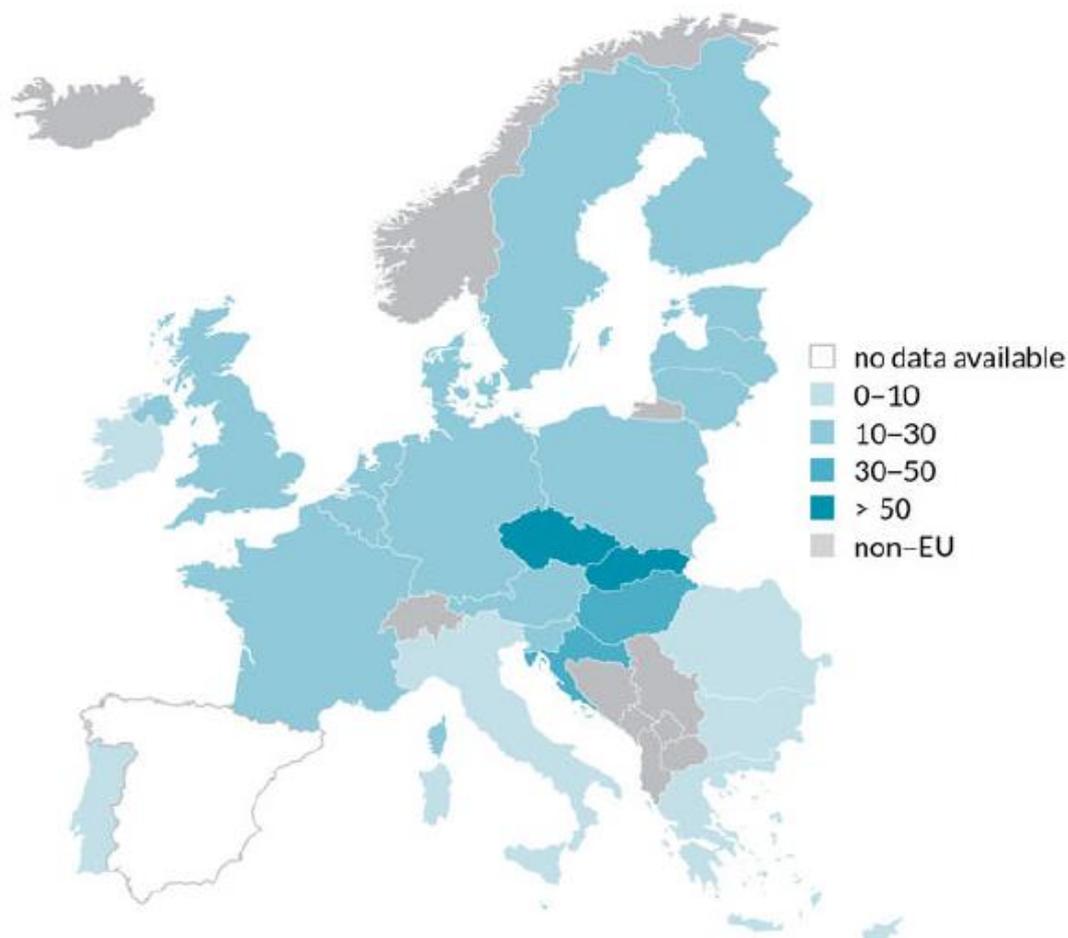


Figure 3 : Nombre de cas de NTS pour 100 000 habitants en Europe en 2019 [11].

2) Les salmonelles dans les élevages de poule pondeuse

D'après l'EFSA, en Europe, la poule est la première espèce d'élevage responsable de NTS suivie par le porc, la dinde et les vaches. La catégorie d'aliment « œufs et produits à base d'œufs » est la première cause de foyer d'intoxication alimentaire chez l'Homme, soit 37% des cas. Près de 75% des cas de NTS chez l'Homme sont dus au sérotype *S. Enteritidis* ; c'est aussi le sérotype le plus présent dans les élevages de poules pondeuses (Figure 4).

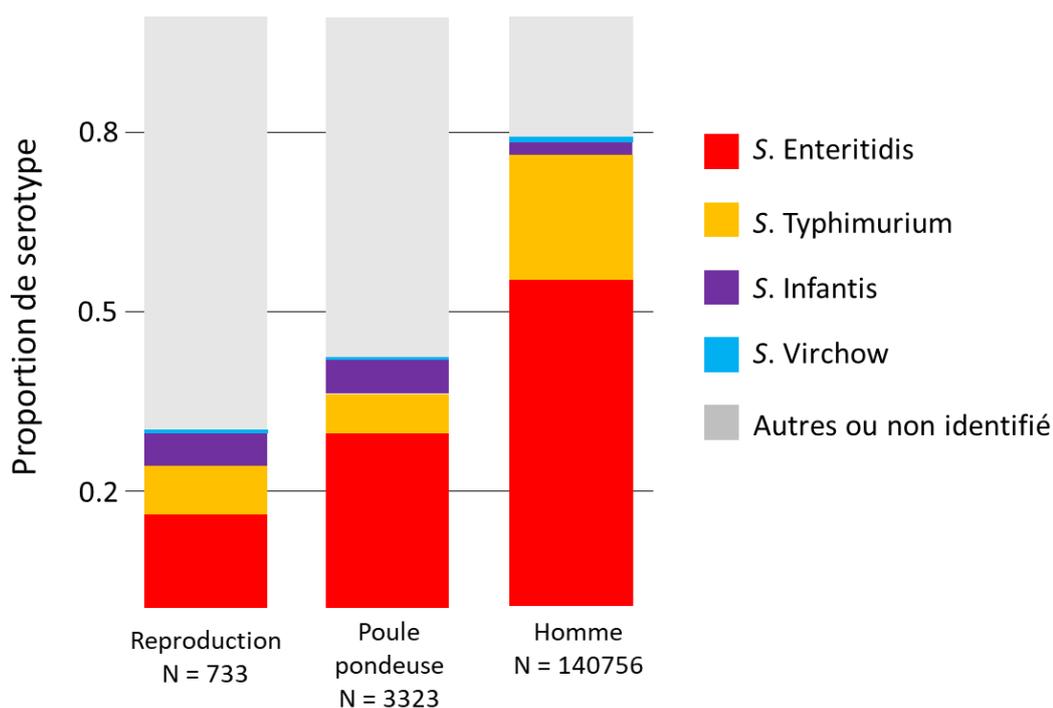


Figure 4 : Nombre de NTS rapportées entre 2014 et 2016 en Europe et proportion des différents sérotypes par type d'élevage et chez l'Homme [12].

Mode d'infection chez la poule

Les poules, lors d'une infection par *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium*, ne présentent pas de symptômes particuliers : on parle de portage asymptomatique [13]. Après une infection systémique très rapide, pouvant mener à la mort de très jeunes individus [14], la bactérie persiste dans les caecums (Figure 5) des animaux et est excrétée dans les fientes, facilitant la transmission à leurs congénères [15, 16]. Cette transmission se fait par contact direct entre individus, par ingestion de matériels contaminés, par les fientes et par l'air [17]. Des facteurs tels que la dose d'infection (faible ou forte), l'environnement, la génétique et la composition du microbiote de l'hôte pourraient influencer le niveau de portage d'un individu mais aussi le niveau d'excrétion de salmonelles dans l'environnement [15]. Par ailleurs, la capacité des salmonelles et notamment de *S. Enteritidis* à infecter les œufs par passage trans-ovarien est un enjeu très important pour la filière [18, 19].

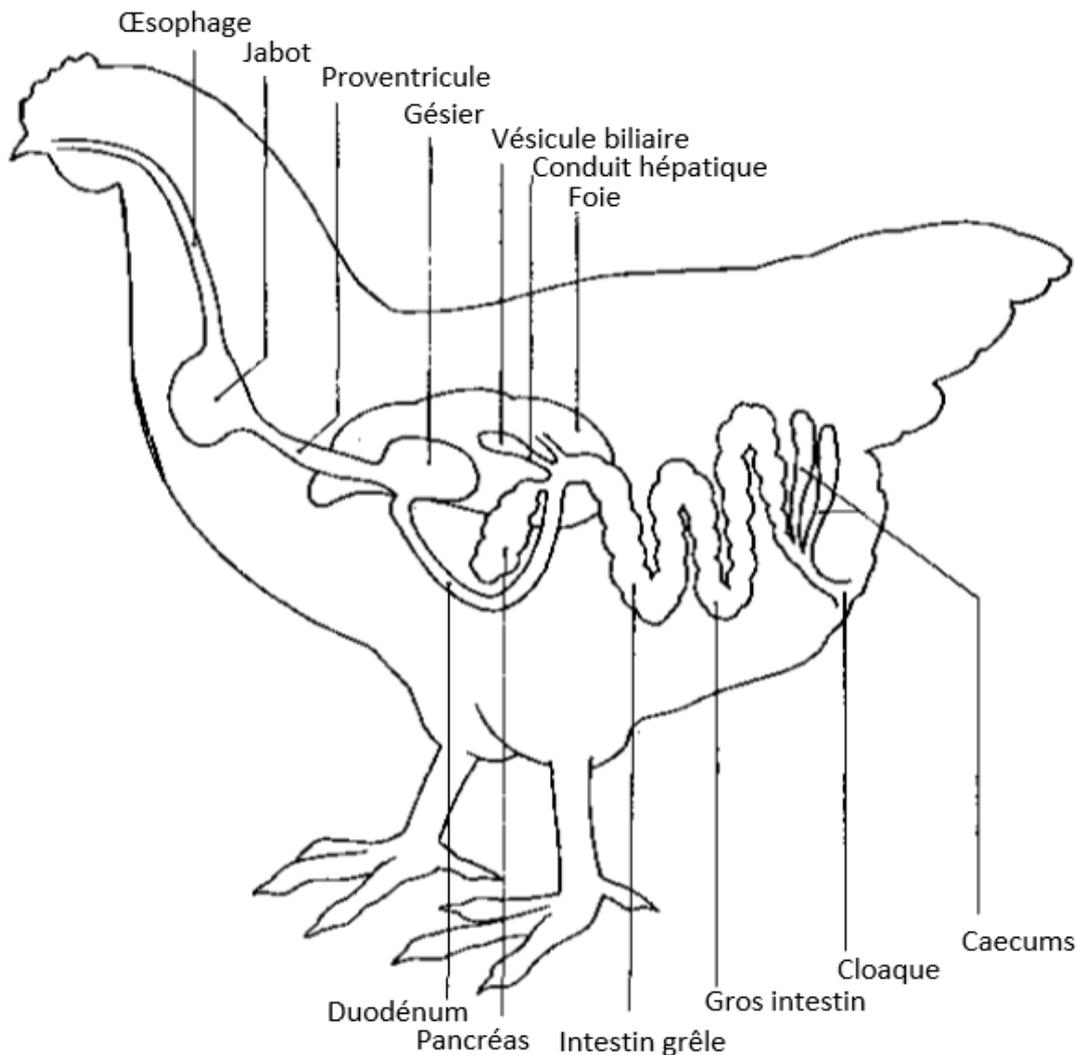


Figure 5 : Schéma de l'appareil digestif de la poule [20].

Prévalence dans les élevages

La production avicole est structurée en trois étages : un étage de sélection des animaux, un étage de multiplication ou reproduction et un étage de production. Les salmonelles peuvent toucher l'ensemble de ces étages de production. En Europe, l'EFSA publie chaque année la prévalence des salmonelles dans les élevages, c'est-à-dire le nombre d'élevages testés positifs à la salmonelle par rapport au nombre d'élevages testés. En 2003, la mise en place de mesures de contrôle avec la directive 2003/99/CE a permis une diminution importante de la prévalence dans les élevages de poules pondeuses au niveau européen. L'objectif de moins de 2% de prévalence a été atteint dès 2010. Mais depuis 2014, cette prévalence semble ré-augmenter (Figure 6).

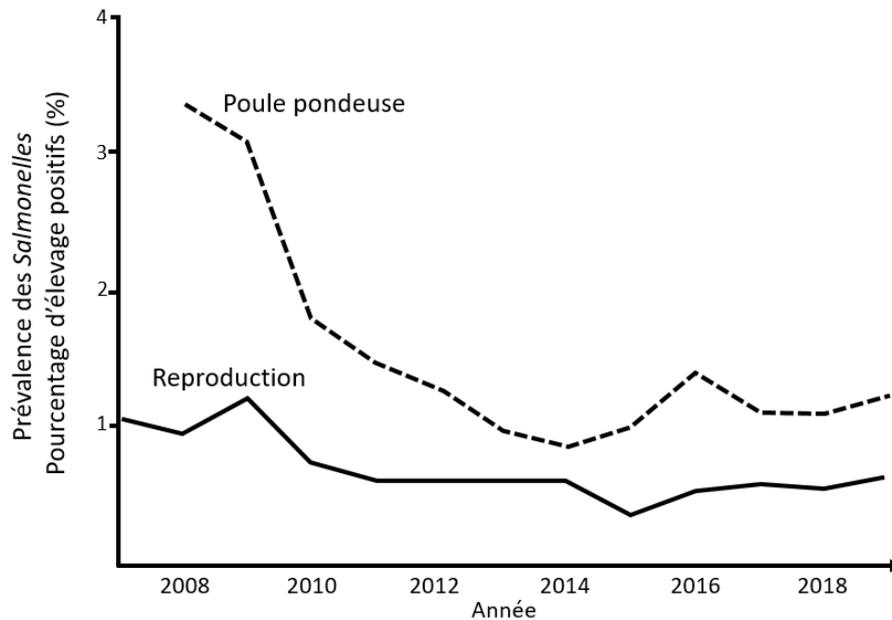


Figure 6 : Prévalence des salmonelles dont les sérotypes ont un impact sur la santé humaine dans les élevages de reproduction et les élevages de poules pondeuses entre 2007 à 2019 [12].

Les moyens de lutte

La directive européenne de 2003 et ses applications en France par arrêtés ministériels décrivent les modalités et les mesures à mettre en place dans les élevages de la filière avicole pour la lutte et la prévention contre les infections par *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. En France, l'exécution du programme national de lutte contre les salmonelles (PNLS) semble être efficace pour répondre aux exigences européennes de moins de 2% d'élevages infectés [21]. Nous pouvons citer par exemple, pour la filière poule pondeuse, l'arrêté de 2018 qui décrit les conditions d'échantillonnage, les mesures préventives et les recommandations à suivre pour la lutte contre les salmonelles. Les principaux éléments détaillés dans cet arrêté sont : i) les conditions de dépistage systématique des volailles de reproduction, des poulettes futures pondeuses et des pondeuses ; ii) les conditions d'élimination des troupeaux de volailles de reproduction et de poulettes futures pondeuses infectées ; iii) les conditions d'assainissement des produits de poules pondeuses infectés voire d'élimination des troupeaux ; iv) les conditions de décontamination des lieux d'élevage infectés et de traitement des effluents.

Les mesures de prophylaxie sanitaire telles que l'hygiène des bâtiments, le contrôle des entrées (alimentation, eau, personnel) et des sorties (traitement des effluents) sont essentielles pour prévenir des infections par *Salmonella*.

La vaccination est également un moyen de lutte efficace. Elle n'évite pas le portage asymptomatique chez les animaux, mais elle diminue la transmission vers l'œuf lors d'une infection [22, 23]. Elle limite également l'excrétion des salmonelles dans les fientes et donc dans l'environnement, limitant les contaminations entre individus [23]. La vaccination est obligatoire et encadrée dans les élevages de multiplication et de production par le règlement européen de 2006 (n° 1177/2006). Cependant, elle est interdite dans les élevages de sélection.

Le microbiote de l'hôte, sa diversité et sa composition, joueraient également un rôle essentiel pour prévenir la colonisation de pathogènes tel que *Salmonella* [19]. L'introduction dans l'alimentation des animaux de probiotiques (microorganismes vivants) et de prébiotiques (nutriments, fibres végétales non digestibles par l'hôte), supposés avoir un effet sur la composition du microbiote intestinal, a déjà montré son efficacité à réduire le portage de salmonelles (cf. partie XI.3). De plus, l'existence d'un contrôle génétique de la composition du microbiote démontrée chez la poule (cf. partie XII), constitue une piste intéressante à développer pour la sélection d'individus possédant un microbiote leur conférant une meilleure résistance à *Salmonella*.

Impacts économiques et enjeux pour la filière

Les moyens de lutte mis en place ont un impact sur la filière. En France, entre 2015 et 2018, plus de 400 troupeaux positifs aux salmonelles ont été éliminés, soit plus de 5 millions d'animaux abattus et plus de 4 millions d'œufs éliminés ou traités thermiquement. Le coût économique pour la filière n'est pas négligeable avec près de 8 millions d'euros par an en moyenne entre 2015 et 2018 et un pic en 2017 avec plus de 10 millions d'euros [21].

L'intensification des systèmes d'élevages, avec l'augmentation de la densité d'animaux par bâtiment et l'augmentation de la taille des élevages, pourrait être à l'origine d'une augmentation de l'occurrence, de la persistance et de la dissémination des salmonelles dans les élevages [12, 24].

La fin du modèle d'élevage en cage est également un grand enjeu pour la filière et pourrait avoir un impact sur la qualité sanitaire des œufs. Il n'y a pas pourtant de consensus scientifique sur le fait que le système d'élevage ait un effet sur les infections par *Salmonella* [19, 25]. Les études publiées sont contradictoires. Ainsi, certaines études ne montrent pas de différence de présence de salmonelles sur les œufs entre plusieurs types d'élevage [26].

D'autres au contraire montrent que des systèmes au sol ou en volière augmenteraient la transmission de *S. Enteritidis* entre individus par rapport à un système d'élevage en cage [27].

L'antibiorésistance, résultant d'une utilisation intensive d'antibiotiques, est un enjeu majeur pour la santé globale des Hommes et des animaux d'élevage [28]. Le danger de l'antibiorésistance est l'incapacité de traiter un patient infecté par une bactérie résistante et le risque élevé de transmission de ce pathogène [29]. Depuis 2006, un règlement européen interdit l'utilisation d'antibiotique en tant que facteur de croissance dans les élevages. Des plans d'action sont mis en place, comme en France avec le « Plan de réduction des risques d'antibiorésistance » en médecine vétérinaire de 2011 visant à diminuer de 25% l'utilisation des antibiotiques dans les élevages en cinq ans. Néanmoins, des études menées ces dernières années sur les profils de sensibilité des salmonelles non-typhiques, suggèrent un niveau modéré à faible de résistance aux antibiotiques [30]. De plus, bien qu'il soit probable que les animaux d'élevages soient responsables de ces résistances, on ignore encore où, quand et comment ces salmonelles ont acquis ces propriétés de résistance [30].

III. Les défenses de l'hôte contre les salmonelles

1) La muqueuse intestinale : barrière physique et chimique

La première barrière contre les infections par *Salmonella* est une barrière physique : la muqueuse intestinale. Elle est formée par les cellules épithéliales reliées par des jonctions serrées empêchant l'entrée du pathogène dans l'organisme. Le mucus intestinal repousse les bactéries en évitant leur adhérence à l'épithélium [31]. Les substances chimiques produites par la muqueuse telles que les défensines sont des agents antimicrobiens pouvant détruire les membranes des bactéries [32]. Par exemple, la β -defensine semble être un peptide antimicrobien essentiel dans la résistance à *Salmonella* chez la poule [33]. La bile dans l'intestin et l'acidité dans l'estomac sont également des barrières chimiques contre les pathogènes. La présence du microbiote intestinal, par sa compétition avec les pathogènes pour les nutriments et pour les sites d'attachement, et par sa production de métabolites tels que les SCFAs (short chain fatty acids ou acides gras à chaîne courte), constitue également une importante barrière contre les pathogènes (Cf. partie IX).

2) L'immunité innée

L'immunité innée permet la reconnaissance et l'élimination de pathogènes dès leur entrée dans l'organisme. Deux types de cellules phagocytaires sont impliqués dans le processus : les macrophages et les neutrophiles ou hétérophiles chez les oiseaux. Ces cellules possèdent des sites de reconnaissance sur leurs membranes cytoplasmiques ou dans leurs cytoplasmes : les PRRs pour pattern recognition receptors. Ces derniers peuvent se fixer sur des structures présentes à la surface des bactéries : les PAMPs pour pathogen-associated molecular patterns. Les TLRs (Toll-like receptors) et NLRs (Nod-like receptors) sont deux types de PRRs, respectivement transmembranaires et cytosoliques. Les LPSs (lipopolysaccharides), les lipoprotéines et les flagellines sont des exemples de PAMPs. Une fois activés, les macrophages et les neutrophiles/hétérophiles augmentent leur activité phagocytaire et relâchent des cytokines et des chemokines amplifiant la réponse immunitaire.

Les TLRs et les NLRs, deux PRRs importants dans la résistance à *Salmonella*

Les TLRs ont été largement étudiés chez différentes espèces, notamment chez la poule [34, 35]. Ils peuvent être de différents types selon les espèces [36] et selon le type de PAMP auxquels ils sont adaptés. La liaison établie entre TLR et PAMP entraîne des cascades de réactions moléculaires (Figure 7). Plusieurs adaptateurs moléculaires sont recrutés au niveau du domaine intracellulaire tels que les MyD88, TIRAP ou TRIF et mènent à l'expression de facteurs de transcription tels que les facteurs nucléaires (NF- κ B), les protéines d'activation (AP-1) ou bien les facteurs de régulation de l'interféron (IRF). Ces facteurs activent la production de cytokines, de chemokines ou d'IFNs, stimulant la réponse immunitaire.

Des études sur l'expression des TLRs ont montré leur implication dans la réponse à une infection par *Salmonella* Enteritidis chez la poule [37, 38]. Le Tableau 1 reprend les différents types de TLRs identifiés chez l'Homme et la poule et ceux pour lesquels un intérêt a été montré pour la protection contre *S. Enteritidis* chez la poule.

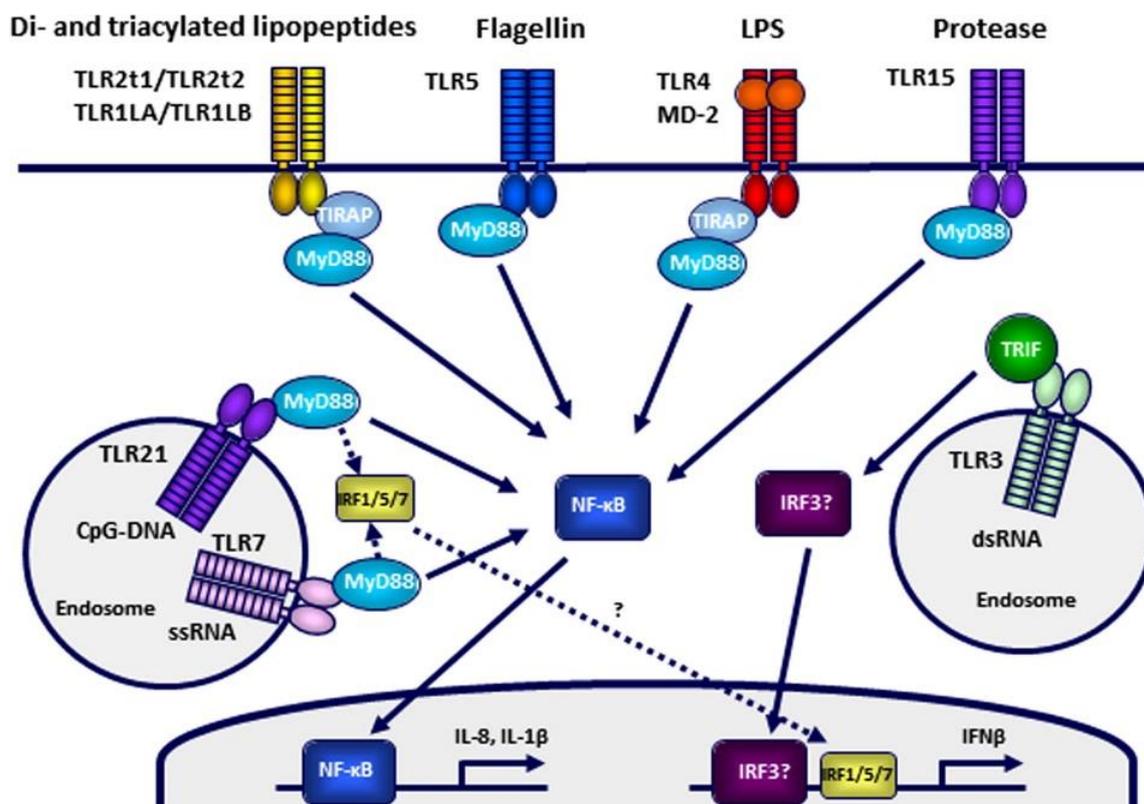


Figure 7 : Les voies de signalisation des TLRs chez la poule [35].

Ligands/PAMP	TLRs chez l'homme	TLRs chez la poule	Protection contre SE chez la poule
Triacylated lipopeptides	TLR2/TLR1	TLR2t1/TLR16, TLR2t1/TLR1LBa, TLR2t2/TLR16	[39]
Diacylated lipopeptides	TLR2/TLR6	TLR2t2/TLR16, TLR2t1/TLR1LB	[39–41]
Possibly triacylated lipopeptides	TLR2/TLR10	Absent	-
dsRNA	TLR3	TLR3	-
LPS	TLR4/MD-2	TLR4/MD-2	[42, 43]
Flagellin	TLR5	TLR5	[44, 45]
ssRNA	TLR7	Possiblement TLR7	[46]
ssRNA	TLR8	Non fonctionnel	-
DNA	TLR9	Absent	-
DNA	Absent	TLR21	[39, 47]
Protease	Absent	TLR15	[43, 48, 49]

Tableau 1 : Les TLRs et leurs ligands chez l'Homme et la poule [34, 35].

Les NLRs reconnaissent des composants bactériens présents dans le cytoplasme de cellules infectées et déclenchent une réponse anti-inflammatoire en agissant sur des voies de signalisation impliquant par exemple les adaptateurs moléculaires MyD88 ou TRIF. Ce sont des protéines cytosoliques solubles composées de 3 domaines : un domaine terminal PYR (pyrin-like domain) qui recrute les protéases ou les kinases, un domaine central de liaison nucléotidique NOD (nucleotide oligomerization domain) et un domaine terminal LRR (leucine-rich repeat) qui reconnaît les PAMPs. Des études ont montré l'importance des NLRs, notamment NLRC4, NLRP3 et NLRP12 dans la réponse à une infection par *Salmonella* Typhimurium chez la souris. NLRC4 est déclenché par les flagelles des salmonelles et la protéine de virulence T3SS, entraînant la formation d'un inflammasome et la transcription de cytokines pro-inflammatoires pouvant entraîner l'apoptose de la cellule infectée [50–52]. NLRP3 est important dans l'activation des caspases et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [53, 54]. *A contrario*, NLRP12 inhibe l'activation des NF-κB et des ERK (signal-regulated kinase) et diminue la production des molécules pro-inflammatoires et antimicrobiennes [55, 56]. Une étude récente sur la souris a montré également les interactions entre *Salmonella* Enteritidis et les inflammasomes [57]. Chez la poule, une étude fonctionnelle sur NOD1 a montré l'importance de ce NLR dans la réponse à une infection par *S. Enteritidis* [58]. Une seconde étude a montré un enrichissement de la voie de signalisation des NLRs dans la rate chez les poulets résistants comparés aux poulets sensibles [59]. Toujours chez le poulet, une étude a montré l'activation des voies de signalisation de MyD88 et TRIF lors d'une infection par *S. Enteritidis* et l'importance des cytokines LITAF et IL-8 dans la résistance à *S. Enteritidis* [60]. Enfin, une étude fonctionnelle sur NLRC5 chez le poulet a montré son importance lors d'une infection par *S. Enteritidis* [61].

Les macrophages

Après activation par un PAMP, des activités antimicrobiennes se mettent en place dans les macrophages. Deux enzymes, NADPH pour Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate et Nos2 pour Nitric oxyde synthase 2, catalysent la production de composés antimicrobiens tels que les ROS pour Reactive Oxygen Species et les RNS pour Reactive Nitrogen Species. L'impact d'une infection par *Salmonella* sur les macrophages a été étudié dans différents modèles expérimentaux chez la souris [62] et la poule [33]. Plusieurs études ont montré l'association entre l'expression de Nos2 et la résistance à *Salmonella* Enteritidis chez la poule [63–65].

Néanmoins, malgré ces activités antimicrobiennes, les salmonelles sont capables de survivre et de se multiplier dans les macrophages grâce à leurs facteurs de virulences [33, 66].

Les Neutrophiles ou les Hétérophiles chez les oiseaux

Durant une infection les neutrophiles migrent vers le site d'infection, attirés par la production de cytokines telles que les IL-8 et IL1- β . Chez la poule, les hétérophiles sont essentiels dans la réponse à *S. Enteritidis* [67]. Ils produisent des peptides antimicrobiens et sont capables d'éliminer les bactéries extracellulaires par phagocytose [33, 68]. Cependant, une infiltration des neutrophiles dans les tissus peut mener à une rupture de la barrière épithéliale et provoquer des inflammations pouvant mener à des diarrhées chez la souris [69].

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices. Elles créent le lien entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative. Elles reconnaissent les salmonelles grâce à leurs PRRs, les phagocytent, deviennent matures puis présentent un antigène spécifique du pathogène via leur MHC (major histocompatibility complex) aux lymphocytes T, activant ainsi la réponse immunitaire adaptative [31]. Des polymorphismes dans les complexes MHC des cellules dendritiques chez la poule pourraient contribuer au contrôle de la réponse à une infection par SE [70].

3) L'immunité adaptative

Enfin, l'immunité adaptative, différente entre individus, permet de reconnaître une grande variété de molécules antigéniques. Les lymphocytes B et T sont les principales cellules intervenant dans cette réponse adaptative. Une infection extracellulaire est reconnue par les immunoglobulines produites par les lymphocytes B. Une infection intracellulaire est reconnue par les récepteurs des lymphocytes T (TCR pour T cell receptor) après activation par les MHC (major histocompatibility complex) des cellules présentatrices (APC) telles que les cellules dendritiques (DC). Il existe deux catégories de lymphocytes T : les CD4 (helper) et les CD8 (cytotoxique). De nombreuses études ont été menées afin d'identifier l'impact d'une infection par SE sur les populations de lymphocytes chez la poule [71–74].

L'échec du système immunitaire à éliminer la totalité des salmonelles de l'organisme peut mener à un portage chronique à long terme et à une excrétion de la bactérie dans les fèces

[75]. Cette persistance des salmonelles serait liée à la balance entre les réponses Th1, T helper 1 et Th2, T helper 2. En effet, chez la poule, l'expression des gènes associés à la réponse Th1 est plus faible que pour ceux liés à la réponse Th2 dans des individus présentant un portage chronique de SE [76]. Chez la souris, il a été montré que les cytokines sécrétées lors de la réponse Th2 inhibaient la réponse Th1, maintenant un état de portage chronique lors d'une infection par ST [75, 77].

IV. Les facteurs de virulence des salmonelles

Des études ont permis de comprendre les mécanismes d'infection d'un hôte par *Salmonella* et d'identifier les principaux facteurs de virulence impliqués. Ces facteurs de virulence permettent à la bactérie de passer les défenses de l'hôte telles que le faible pH du système digestif, la barrière épithéliale ou le microbiote intestinal. Ils permettent également à la bactérie de se multiplier et de persister dans l'organisme en échappant au système immunitaire [31].

Les SPIs

Les SPIs pour *Salmonella* Pathogenicity Islands sont des régions du chromosome bactérien des salmonelles codant les facteurs de virulence. Leurs nombres varient en fonction des sérotypes, cependant SPI-1 à SPI-5 sont communes à la plupart d'entre eux [78]. Le degré de virulence d'un sérotype est fonction du nombre et du type de sites de pathogénicité (SPI) qu'il possède [60]. SPI-1 permet l'invasion des salmonelles dans les cellules de l'hôte et induit l'apoptose des macrophages, SPI-2 est associée à la réplication dans les macrophages et à l'infection systémique, SPI-3 à la survie dans les macrophages et la possibilité des salmonelles à se multiplier malgré le manque de magnésium dans l'environnement, SPI-4 à la survie dans les macrophages et la production de toxines, et enfin des gènes identifiés dans SPI-5 codent des facteurs de virulence tels que les protéines T3SS [78]. Chez la poule comme chez la souris, l'impact de ces 5 SPIs sur la réponse à SE a été largement étudié [79, 80]. Dernièrement, de nouveaux sites de virulence de SE, ROD9 (SPI-9) et ROD21 ont été identifiés chez la souris et associés à la capacité de SE à causer une infection systémique [81–83].

Les complexes multi-protéiques T3SS

Les complexes multi-protéiques tels que les T3SS pour Type III secretion system sont codés par les gènes présents sur les SPIs. Ils permettent le transfert d'effecteurs dans le cytosol des cellules, entraînent des cascades de réaction permettant l'adhésion, l'invasion, la multiplication, mais aussi permettant la répression du système immunitaire. Par exemple, T3SS-1, codé par SPI-1, permet l'adhésion et l'invasion de la bactérie dans les cellules épithéliales. T3SS-2, codé par SPI-2, joue un rôle clé dans la multiplication intracellulaire et l'infection systémique [78]. Chez la poule, des études ont montré l'importance des T3SS-1 lors d'une infection par *S. Enteritidis* *in vivo* [84] et *in vitro* [85]. Ce mécanisme d'entrée dans les cellules faisant intervenir l'effecteur T3SS-1 est appelé mécanisme Trigger mais il existe également un autre mécanisme appelé Zipper faisant intervenir le récepteur cellulaire Rck (Figure 8) [86, 87].

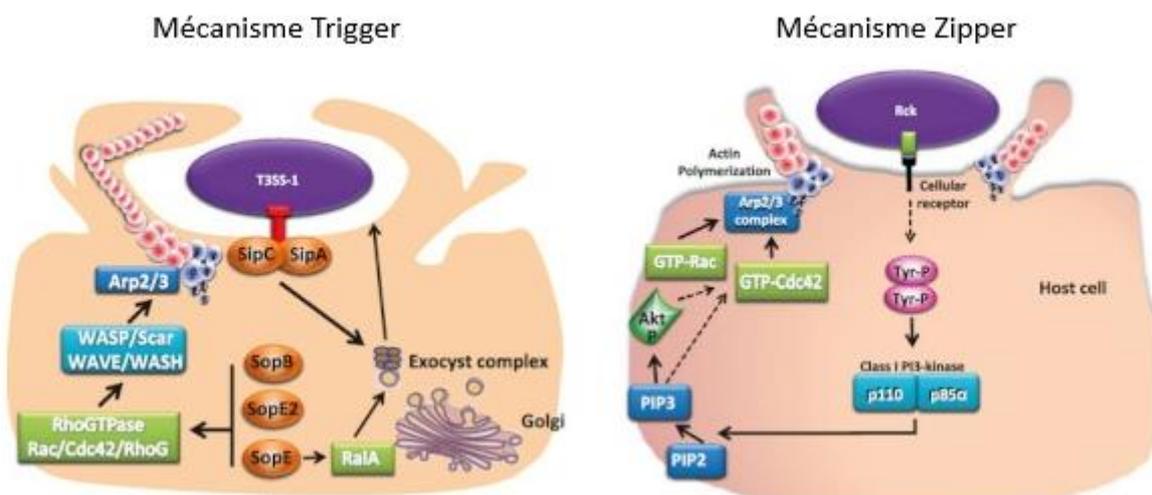


Figure 8 : Différentes stratégies d'invasion de Salmonella dans les cellules eucaryotes. Le mécanisme Trigger : en utilisant le système T3SS, les effecteurs Sip et Sop sont directement injectés dans la cellule eucaryote entraînant des cascades de réactions permettant la modulation du cytosquelette (actine) et le recrutement du complexe exocyste menant à l'internalisation de la bactérie. Le mécanisme Zipper : l'interaction entre les invasives Rck exprimées sur la membrane des Salmonella avec les récepteurs au niveau de la membrane cellulaire de l'hôte, entraîne la phosphorylation de tyrosines kinases et une cascade de réactions menant à la polymérisation d'actine du cytosquelette permettant l'internalisation de la bactérie. Adapté de [86].

Les plasmides

Les plasmides de virulence ont également un rôle à jouer dans la multiplication des salmonelles dans les cellules de l'hôte [88]. Ces plasmides de 50 à 100 kb en fonction des

sérotypes sont présents en faible nombre (1 à 2 copies par bactérie) et contiennent un locus de virulence *spv* (pour *salmonella plasmid virulence*) de 7,8 kb [88, 89]. Les gènes de ces plasmides peuvent être facilement transmis d'une bactérie à une autre par transfert horizontal. Une étude a montré que la délétion de *sodCI* et *spvBC*, deux gènes provenant de plasmides de virulence, réduisait la virulence de SE chez des souris BALB/c mais n'avait pas d'impact chez la poule [90].

Les fibrilles

Les fibrilles présentes à la surface des membranes des bactéries jouent également un rôle dans l'adhésion et la colonisation des cellules de l'hôte [91]. Selon les sérotypes, il existe différents opérons, en fonction des gènes qui le composent, codant différents types de fibrilles [92]. Chez la poule, les fibrilles SEF14 présentes chez *S. Enteritidis* semblent être importantes dans l'adhésion des bactéries au niveau des tissus du système reproductif [78], dans la propagation de l'infection au niveau du foie et de la rate [93] et dans l'excrétion des bactéries dans la première semaine après infection chez de jeunes individus [94]. Chez la souris, une étude *in vitro* a montré que l'expression du gène *sefA* de l'opéron codant les fibrilles SEF14 renforce l'adhésion de SE aux cellules épithéliales et la survie dans les macrophages [95].

Autres facteurs

D'autres facteurs de virulence contrôlant par exemple la production de toxines (endo- ou exotoxines), la présence de flagelles ou de différents types de LPS peuvent avoir un impact sur la capacité des salmonelles à se multiplier et à se maintenir dans l'organisme [78].

V. Mécanismes d'infection des cellules intestinales

Une infection par *Salmonella* au niveau des cellules de l'intestin (cellules épithéliales ou cellules M) peut se décrire en trois étapes [60, 78, 87] : (1) l'attachement et l'invasion (2) la survie et la multiplication intracellulaire dans les SCVs (*Salmonella*-containing vacuoles) et (3) la dissémination dans l'organisme (Figure 9). Tout d'abord, les salmonelles doivent résister aux faibles valeurs de pH de l'environnement gastrique et à la bile. Arrivées dans l'intestin, elles doivent « l'emporter » face aux bactéries du microbiote intestinal et traverser la muqueuse intestinale pour pouvoir s'attacher à l'épithélium intestinal grâce à leurs flagelles,

leurs fibrilles et leurs adhésines. Une fois attachées, la production du complexe T3SS-1 à partir de l'expression des gènes de SPI-1 leur permet de passer la membrane épithéliale par internalisation dans des SCV. Dans le cytoplasme des cellules, les salmonelles dans des SCV survivent et prolifèrent grâce aux complexes T3SS-2 codés par SPI-2. Les SCV migrent vers la membrane basale et la traversent. Dans le milieu intérieur de l'intestin, elles peuvent être phagocytées par des macrophages dans lesquels elles peuvent survivre et se multiplier comme dans les cellules épithéliales. Elles peuvent également être phagocytées par des cellules dendritiques dans lesquelles elles peuvent survivre mais ne peuvent pas se multiplier. Elles échappent ainsi au système immunitaire et peuvent se disséminer rapidement dans l'organisme, *via* la circulation sanguine ou *via* la lymphe vers principalement le foie et la rate [60, 83, 96].

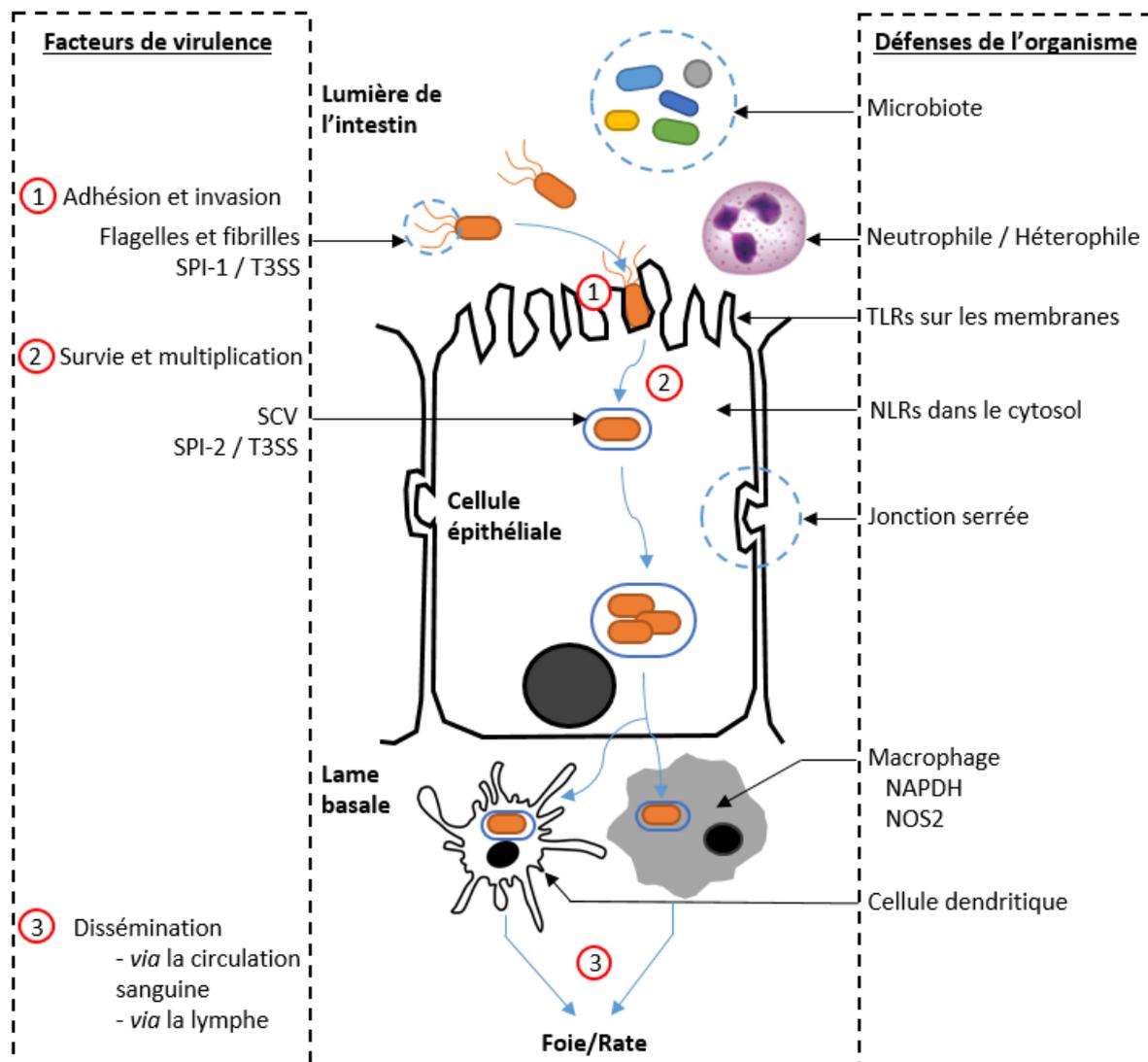


Figure 9 : Le mécanisme d'infection par *Salmonella* et les défenses de l'organisme. Inspiré de [60].

Partie 2 : Impact de la génétique de l'hôte sur la réponse à SE

Plusieurs facteurs influencent la réponse à une infection par *Salmonella* : l'environnement (nourriture, oxygène, lumière, température), la pathogénicité du sérotype (facteurs de virulence et dose) mais aussi l'âge, le sexe et la génétique de l'hôte infecté. En travaillant dans un environnement contrôlé, des variations sont encore observables entre individus et peuvent être associées à leur génétique. Dans cette partie, nous allons décrire les modèles, souris et poule, qui ont été utilisés au cours de cette thèse pour l'étude génétique de la réponse à *S. Enteritidis*. Nous décrivons ensuite les méthodes de génétique utilisées pour l'identification de régions associées à des variations phénotypiques quantitatives mesurables, appelées *Quantitative trait locus* (QTLs), et des gènes candidats responsables de ces variations. Enfin, nous décrivons les QTLs et gènes candidats associés à la résistance à *S. Enteritidis* identifiés à ce jour chez la souris et la poule.

VI. Les modèles expérimentaux utilisés

Les expérimentations sur des modèles animaux permettent de travailler dans un environnement contrôlé, mais également souvent avec une génétique contrôlée grâce à l'utilisation de lignées plus ou moins consanguines. Ces lignées sont issues de croisements consanguins (frère-sœur) pendant au moins vingt générations. Les individus sont homozygotes et stables dans l'expression des caractères d'intérêt. Ces caractères ou phénotypes sont des variables mesurables sur les individus, par exemple la quantité de salmonelles dans un organe suite à une infection. Pour étudier l'impact de la génétique sur le caractère, différentes stratégies peuvent être mises en place : (i) l'utilisation d'individus F2 ou N2 (Figure 10) issus d'un croisement entre deux lignées consanguines divergentes pour le caractère d'intérêt afin d'identifier des QTLs et des gènes candidats ; (ii) des croisements plus complexes, par exemple des N2F1 (Figure 10) ou des lignées congéniques, afin de valider un gène ou de réduire une région particulière du génome identifiée suite à une analyse sur des F2 ou des N2 ; enfin, (iii) l'utilisation de populations présentant une diversité génétique

élevées tel que les lignées du Collaborative Cross ou des populations non consanguines (Outbred) telles que les souris du Diversity Outbred (DO) permettant les analyses de QTL mapping équivalentes au Genome-Wide Association Study (GWAS) chez l'Homme.

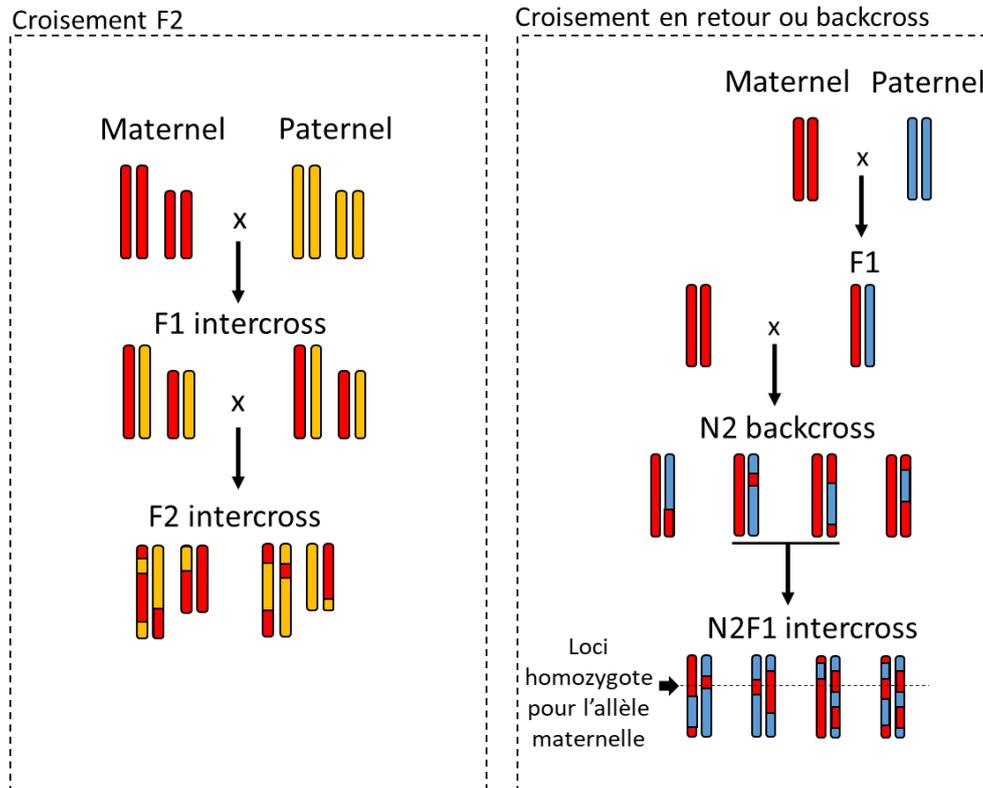


Figure 10 : Schéma des stratégies de croisement pour l'obtention de souris F2 (à gauche) et de souris N2 et N2F1 (à droite).

1) Le modèle « souris »

Le modèle souris est largement utilisé en recherche afin d'identifier et de comprendre des phénomènes biologiques impliqués par exemple dans des maladies infectieuses. Les découvertes faites avec ce modèle peuvent être transposables à d'autres espèces notamment à l'Homme (mammifère). L'utilisation de lignées consanguines, les facilités d'élevage (temps de génération courts, petite taille, faible coût), ainsi que les possibilités de manipulation à façon du génome (Knock-out, Knock-in...), font de la souris un très bon modèle expérimental, notamment pour les études de génétique. Ce modèle a permis d'identifier de nombreux QTLs, gènes et même des fonctions moléculaires et cellulaires impliquées dans la sensibilité à des agents infectieux tels que *Salmonella* [97–99].

Les modèles expérimentaux développés pour l'étude des infections par *Salmonella*. Plusieurs études ont été menées en utilisant le sérotype *S. Typhimurium* [100]. Ce modèle souris se rapproche d'une pathologie induite par *S. Typhi* ou *Paratyphi* chez l'Homme. Il est donc utilisé pour l'étude de fièvres typhoïdes [101]. Une infection systémique s'installe rapidement dans les 4 jours suivant l'infection, pouvant mener à la mort de certains individus, puis la bactérie est éliminée dans les 2 à 3 semaines suivant l'infection (Figure 11). Néanmoins, certains individus peuvent porter à plus long terme la bactérie et la transmettre à leurs congénères.

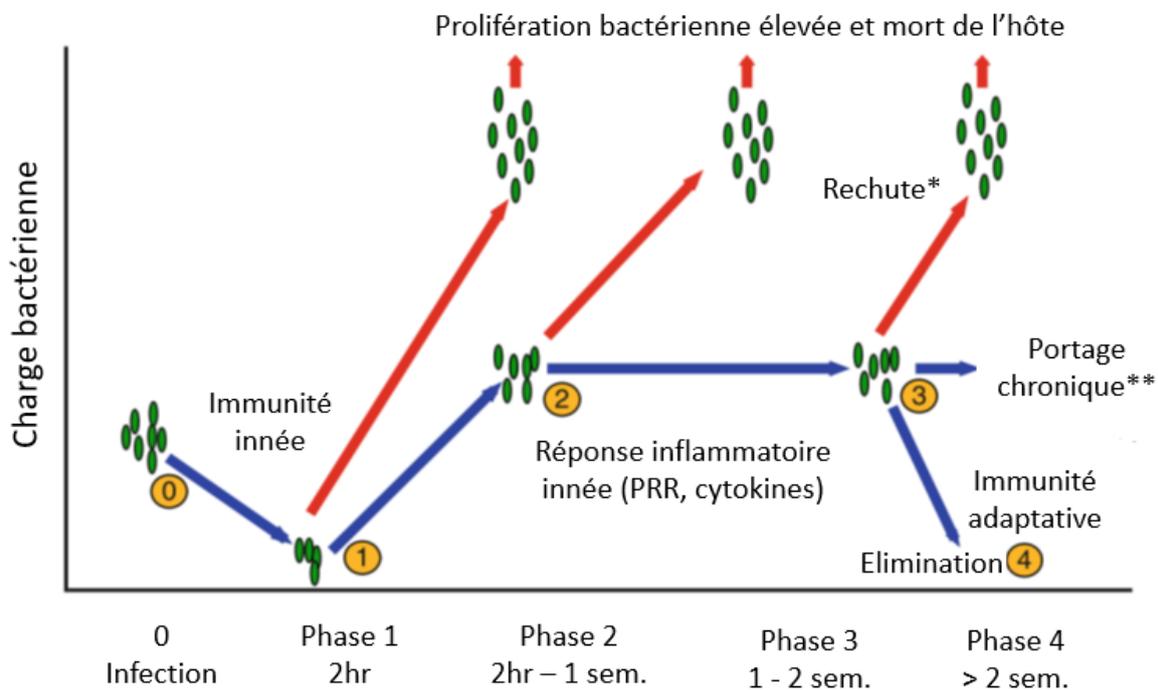


Figure 11 : Les quatre phases d'une infection sub-létale par *S. Typhimurium*. La ligne bleue représente la réponse des souris immunocompétentes de type sauvage (WT), tandis que la ligne rouge correspond à l'absence de réponse de l'hôte aux différentes phases. Dans la première phase (1), les bactéries sont rapidement éliminées du sang. Dans la deuxième phase (2), les bactéries commencent une croissance exponentielle et l'hôte initie une réponse immunitaire (PPRs et cytokine). Dans la troisième phase (3) les bactéries sont éliminées. Dans la quatrième phase (4) la réponse immunitaire adaptative se met en place, essentielle pour prévenir les rechutes (*) ou l'établissement d'un état de portage chronique (**). Traduit et adapté de [102].

Ce portage chronique a été étudié en utilisant deux modèles d'infection : soit une infection avec une forte dose, environ 10^8 unités formant colonies (UFC), de *S. Typhimurium* (ST) dans des 129Sv [103], soit une infection avec une dose classique (10^3 UFC) de *S. Enteritidis* (SE) [97] (Figure 12). Les animaux sont infectés par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou orale entre

9 et 12 semaines d'âge, le temps d'acquérir un système immunitaire mature. Quelques jours après l'infection, 4 jours pour un modèle d'infection systémique (ST) ou 21 à 48 jours pour un modèle de portage à long-terme (SE), des échantillons de foie, rate ou d'intestin sont prélevés sur les animaux pour mesurer les charges bactériennes.

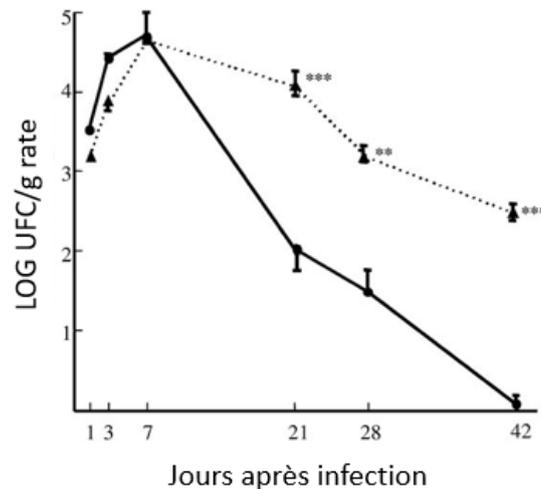


Figure 12 : Charges bactériennes dans la rate dans un modèle d'infection par SE (portage chronique) dans deux lignées consanguines C57BL/6J (point, ligne continue) et 12956/SvEvTac (129Sv) (triangle, ligne pointillée).

Une première phase de croissance exponentielle des bactéries est observée dans les premiers jours après l'infection. Puis les bactéries sont éliminées progressivement. Une différence significative de portage est identifiée entre les deux lignées dès 21 jours après infection. Les individus de la lignées 129sv sont capables d'éliminer complètement les bactéries 42 jours après l'infection [97].

Les lignées génétiques utilisées

L'étude génétique de la réponse à *Salmonella* a été réalisée dans un premier temps en utilisant des lignées de souris consanguines classiques de laboratoire telle que C57BL/6 (B6) ou 12956/SvEvTac (129Sv) [97, 104, 105]. Ces dernières années de nouvelles populations murines génétiques de référence (GRPs) ont vu le jour et ont permis d'optimiser ce type d'études en augmentant la diversité génétique prise en compte dans les analyses [106]. Nous allons décrire ici deux populations de référence que nous avons utilisées lors de cette thèse.

Le Collaborative Cross

Le Collaborative Cross (CC) est un panel de lignées de souris consanguines développé à partir de 2004 par un consortium de chercheurs intéressés par l'étude de caractères quantitatifs : le *Complex-Trait Consortium*. Le but de la création de ces lignées était de produire une

population de référence présentant une grande diversité génétique tout en évitant les effets de structure de population [107].

Les souris du CC sont dérivées de huit lignées parentales issues des trois sous-espèces majeures de *Mus musculus* : *M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, et *M. m. castaneus*. Trois lignées parentales dérivées d'individus sauvages (CAST/EiJ, PWK/PhJ et WSB/EiJ) et cinq lignées parentales de laboratoire (C57BL/6J, A/J, 129S1/SvImJ, NOD/LtJ et NZO/H1LtJ) ont été croisées selon un schéma bien établi (Figure 13). Chaque lignée parentale est représentée par une couleur. La première étape consiste en un croisement des lignées parentales deux à deux afin d'obtenir quatre hybrides de première génération G1. Lors de cette étape, il existe 40 320 (factorielle 8) possibilités de croisement. La deuxième étape est un croisement des souris G1 deux à deux pour l'obtention des souris G2. Il y a donc 576 possibilités de croisement. Puis, un croisement des souris G2 permet l'obtention de souris G2:F1, souris hétérozygotes ayant 1/8 du matériel génétique de chacune des huit lignées parentales. Enfin, un croisement consanguin entre frère et sœur (inbreeding) pendant 20 générations permet d'obtenir des souris consanguines ayant 1/8 du matériel génétique de chacune des huit lignées parentales. Aujourd'hui, 73 lignées du CC sont maintenues et disponibles pour la recherche. Un chiffre bien inférieur à l'objectif initial de 1000 lignées du CC ! Cela peut être expliqué par l'extinction de lignées durant le processus de croisement suite à l'infertilité de certains mâles ou bien à une incompatibilité génomique entre allèles sauvages [108].

L'introduction de génomes d'origine sauvage dans le schéma de croisement a permis d'obtenir une grande diversité génétique avec près de 90% des variations du génome de la souris représentées [109]. Cette variabilité génétique, associée à une large variabilité phénotypique (physiologique, morphologique ou comportementale) a permis d'augmenter la puissance des analyses génétiques et d'identifier des QTLs, gènes ou variations génétiques d'intérêt [110]. Le séquençage complet des huit lignées parentales et le génotypage à très haute densité des lignées du CC facilitent les analyses de type QTLs et permettent une homogénéisation des résultats entre laboratoires de recherche. De plus, les lignées du CC étant consanguines (génétiquement identiques à >99%), les expérimentations sont reproductibles dans le temps et l'espace.

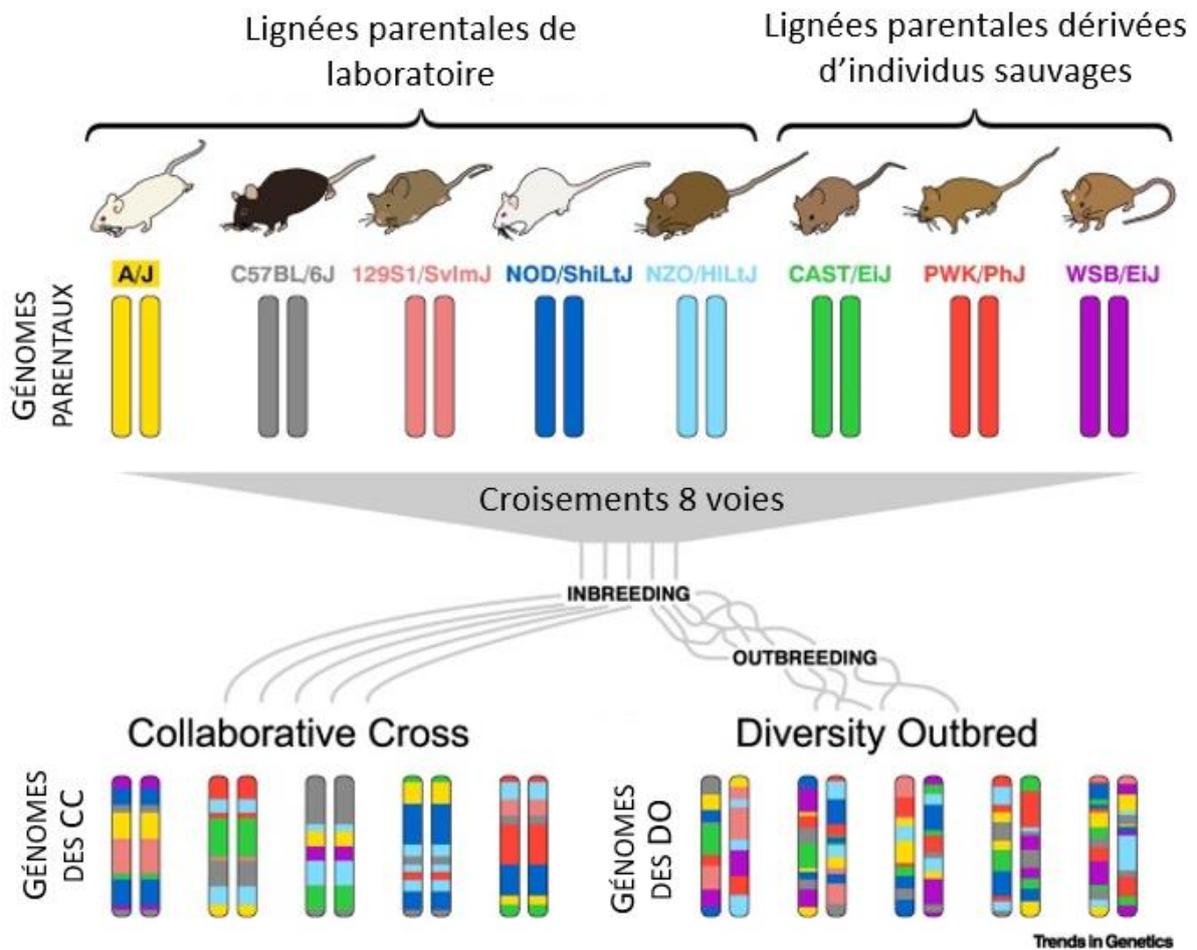


Figure 13 : Stratégies utilisées pour l'obtention des souris du Collaborative Cross et du Diversity Outbred. Traduit et adapté de [111].

Le Diversity Outbred

Le Diversity Outbred (DO) a été développé en complément du CC. C'est une population non-consanguine dérivée de 160 pré-CC (outbreeding), maintenue par croisement aléatoire au Jackson Laboratory (Etats-Unis). Chaque individu est unique et hétérozygote (Figure 13). Le DO est un très bon outil de cartographie génétique à très haute résolution [112–114]. C'est le modèle génétique qui se rapproche le plus de ce qu'on peut observer chez l'Homme avec les études GWAS (Genome-wide association studies). Il nécessite néanmoins le génotypage de chaque individu, ceux-ci étant génétiquement tous différents les uns des autres.

2) Le modèle « poulet »

Les modèles expérimentaux développés pour l'étude d'infections par *Salmonella* Comme pour la souris, différents types de modèles expérimentaux peuvent être décrits chez la poule : des modèles de résistance à la colonisation ou au portage chronique par *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium*, ou bien des modèles de résistance à une infection systémique par *S. Gallinarum* par exemple. Nous nous intéresserons ici aux modèles expérimentaux développés pour les études d'une infection par *S. Enteritidis*. Après une rapide infection systémique qui se résout entre 3 et 4 semaines (élimination des bactéries dans la rate après 4 semaines), un portage chronique peut se déclarer avec une charge bactérienne observée dans les caeca plus de 9 semaines après infection (Figure 14) [15, 115].

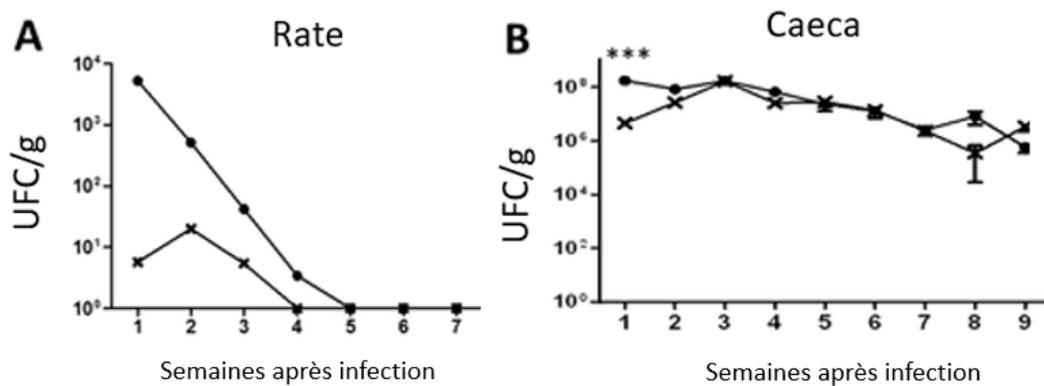


Figure 14 : Infection systémique chez la poule PA12 par SE type LA5 sauvage (point) ou isogénique pour la mutation bamB (croix).

Charges bactériennes (UFC/g) dans la rate (A) et le contenu caecal (B). Elimination des bactéries dans la rate dans les 4 à 5 semaines après infection. Charges bactériennes pouvant persister dans le caeca plus de 9 semaines après infection (portage chronique) [15].

Dans les études génétiques menées, l'inoculum est généralement administré par voie orale, mais peut l'être aussi par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. L'âge des individus dépend des objectifs de l'étude : il peut aller de 1 jour après éclosion pour des études d'infection chez de jeunes poussins, à plusieurs semaines pour des études d'infection chez la poule pondeuse et le mode de contamination des œufs de consommation. Les dates d'échantillonnages peuvent aller de 3 jours après infection pour l'étude de la résistance à la colonisation, jusqu'à plusieurs semaines pour l'étude de la résistance au portage chronique. Les caractères observés sont les charges bactériennes dans le foie, la rate et le contenu caecal ou fécal, ainsi que la survie des jeunes individus [116]. Il est important de bien adapter le modèle

expérimental aux objectifs de l'étude. Par exemple l'âge est un facteur très important. Une étude génétique menée sur des lignées divergentes a montré que la résistance génétique chez de jeunes individus est négativement corrélée à la résistance chez l'adulte [117].

Les lignées génétiques utilisées

Les analyses ont été menées sur différents fonds génétiques de poule pondeuse, principalement des lignées de White Leghorn ou de Rhode Island Red. Ces lignées peuvent être des lignées consanguines expérimentales (*inbred*) ou des lignées commerciales non-consanguines (*outbred*) [116]. Contrairement à la souris, chez la poule, les lignées que l'on appelle *inbred* sont nettement moins consanguines. Le maintien de ces lignées se fait par croisements entre frères et sœurs, en utilisant plusieurs individus par génération. Il peut ainsi rester des variabilités génétiques résiduelles au sein d'une même lignée. C'est le cas des lignées N et 6₁, divergentes pour la résistance à *Salmonella*, que nous avons utilisées dans les expérimentations de cette thèse. Des croisements (F2 ou backcross) entre ces lignées ont permis d'identifier des QTLs et des gènes candidats associés à la résistance à *Salmonella* (cf. paragraphe VIII). De plus, chez la poule, des lignées « divergentes » ne sont pas forcément consanguines. De telles lignées sont sélectionnées génétiquement sur plusieurs générations pour un caractère d'intérêt. Ces lignées sont à la fois une démonstration de l'existence d'un contrôle génétique du caractère et un outil d'étude de l'architecture génétique de ce caractère. C'est le cas par exemple des lignées divergentes « R+ » et « R- » qui ont été sélectionnées sur la consommation alimentaire « résiduelle » des oiseaux adultes [118]. Des lignées congéniques ont également été développées et utilisées dans les expérimentations chez la poule. Par exemple, les lignées congéniques pour le MHC B produites par backcross entre une femelle de la lignée fortement consanguine UCD 003 (lignée receveuse) et des males présentant une variabilité génétique au niveau du complexe MHC-B (lignées donneuses). Ces lignées ont été utilisées pour l'étude de la résistance à SE [119].

Les lignées N et 6₁, contrastées pour leur résistance à *Salmonella*

Dans cette partie, nous allons présenter les deux lignées *inbred* de White Leghorn que nous avons utilisées lors de cette thèse : les lignées N et 6₁. La lignée 6₁ a été développée à l'origine dans les années 40 à 60 pour l'étude de tumeurs, de la maladie de Marek et des leucoses aviaires au Regional Poultry Research Laboratory, aujourd'hui ADOL pour Avian Disease and Oncology Laboratory (East-Lansing, MI, USA). La lignée N a été développée pour l'étude de la

résistance à maladie de Marek par Cole à l'université de Cornell dans les années 60 puis a été introduite au ADOL dans les années 70 [120]. Lors d'une collaboration dans les années 2000 avec l'Institute for Animal Health (Compton, UK), ces deux lignées ont été importées en France à l'INRAE. Elles sont aujourd'hui maintenues au Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (PEAT, Nouzilly, France). Ce sont des lignées fortement consanguines produites par croisements entre frères et sœurs pendant plusieurs générations. De nombreuses études ont été menées sur ces deux lignées, en particulier sur la résistance à des pathogènes tels que *Salmonella* [76, 121–123] et *Campylobacter* [124, 125]. La lignée 6₁ et la lignée N sont respectivement sensible et résistante à *S. Enteritidis*, c'est l'inverse pour *Campylobacter*.

VII. Les méthodes de génétique quantitative

Gregor Johann Mendel est considéré comme le « père » de la génétique moderne. En travaillant sur les plantes, il instaure les trois lois de l'hérédité génétique : la loi de ségrégation, la loi d'indépendance des assortiments et la loi de dominance. Ces travaux portent sur des caractères expliqués par une seule région du génome : un seul gène. On peut parler de contrôle monogénique. Cependant, dans la plupart des cas, plusieurs gènes ou régions sont impliqués dans le contrôle du caractère. On parle alors de contrôle polygénique et on travaille sur des caractères quantitatifs.

1) Les caractères quantitatifs

Un caractère quantitatif aussi appelé phénotype (P), peut être défini comme une variable observable et mesurable chez un individu. Il est dépendant d'une composante génétique (G) et d'une composante environnementale (E) :

$$P = G + E$$

Théoriquement, dans des conditions environnementales contrôlées (E stable), les variations du phénotype (P) peuvent être expliquées par des variations du génotype (G). Les études génétiques cherchent à identifier les facteurs responsables de ces variations génétiques en utilisant des populations pour lesquelles les individus présentent une large variabilité de phénotypes. L'objectif est d'identifier des régions ou locus (leur nombre et leur position sur le

génomique) appelés Quantitative Trait locus (QTLs), associés au phénotype. Lorsque plusieurs locus sont impliqués, ils peuvent interagir les uns avec les autres : on parle d'effet additif ou d'effet épistatique. Ces locus peuvent également avoir un effet plus ou moins important sur le phénotype ; on peut alors définir le pourcentage de variation du phénotype dans la population qui est expliqué par le locus. La Figure 15 reprend la notion de relation entre effets des gènes et nombre de gènes impliqués.

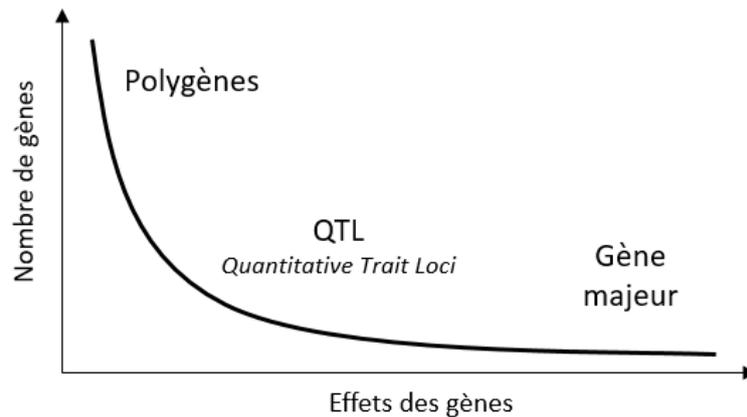


Figure 15 : Nombre de gènes et effet des gènes expliquant un caractère quantitatif : contrôle polygénique ou monogénique.

2) Les variants génétiques

Les variants génétiques correspondent à des variations de la séquence d'ADN pouvant ou non avoir un impact sur le phénotype. Ces variants génétiques peuvent être choisis et utilisés comme marqueurs génétiques dans une étude quantitative. Ces études génétiques nécessitent de connaître le génotype des individus, c'est-à-dire les allèles de différents marqueurs génétiques pour chaque individu, en général répartis sur l'ensemble de leur génome. Il existe différents types de marqueurs génétiques, dont par exemple les SNPs ou les microsatellites (Figure 16). Les plus utilisés sont de loin les SNPs.

Les SNPs

Les SNPs (*single-nucleotide polymorphism*) sont des variations d'une seule paire de base dans une séquence génétique entre individus d'une même espèce. Chez l'Homme, ils représentent plus de 90% des variations observées dans les génomes [126]. Un SNP se différencie d'une mutation ponctuelle lorsque la fréquence de l'allèle minoritaire est supérieure à 1% dans la population [127]. Les SNPs sont des marqueurs génétiques très abondants et distribués

uniformément dans le génome (tous les 100 à 1000 paires de bases). Ils peuvent être situés dans les régions codante ou non-codante des gènes, ou entre les gènes, dans les régions inter-géniques. Un SNP dans une région codante peut avoir un impact sur la structure de la protéine traduite et donc sur la fonction de cette protéine. C'est le cas pour certaines maladies telle que la drépanocytose où un seul SNP explique la maladie [128]. Dans ce cas, le SNP identifié est dit causal ; il est directement lié au phénotype. Néanmoins, les régions codantes ne représentent qu'une faible proportion du génome entier (2% chez l'Homme) et il a été estimé que 90% des SNPs associés à une pathologie humaine sont situés dans une région non-codante [129]. Un SNP dans une région non codante ou inter-génique peut avoir un impact sur le niveau d'expression d'un gène ou sur la stabilité d'un ARN messager. Il est plus difficile dans ce cas d'identifier le SNP causal. Les SNPs sont des variants génétiques très utilisés dans les analyses d'association pour l'identification de QTLs associés au phénotype. Les SNPs identifiés lors de ces analyses sont en général en déséquilibre de liaisons avec le SNP causal. Il existe plusieurs méthodes pour identifier l'allèle d'un SNP dans un échantillon d'ADN, par exemple l'utilisation de puces à ADN ou microarrays en anglais (cf. VII 3-Les puces à ADN).

Les microsatellites

Les microsatellites sont des séquences répétées d'ADN de 2 à 5 paires de bases présentes dans les génomes des Eucaryotes, en abondance chez les Mammifères comme la souris, mais beaucoup moins abondant chez les oiseaux comme la poule [130]. Les microsatellites sont présents dans des régions non-codantes du génome et sont stables de génération en génération. Le nombre de répétitions de ces microsatellites peut être très variable entre individus, leur conférant un intérêt en tant que marqueurs génétiques. Une amplification de ces régions polymorphiques par PCR suivie d'une migration sur gel d'agarose par une électrophorèse permet de les caractériser facilement.

Autres polymorphismes

Les insertions ou délétions d'une séquence d'ADN de petite taille, les translocations réciproques ou Robertsoniennes ou bien les CNV pour *copy number variation* ou variations du nombre de copies sont également des polymorphismes pouvant être associés à un caractère quantitatif.

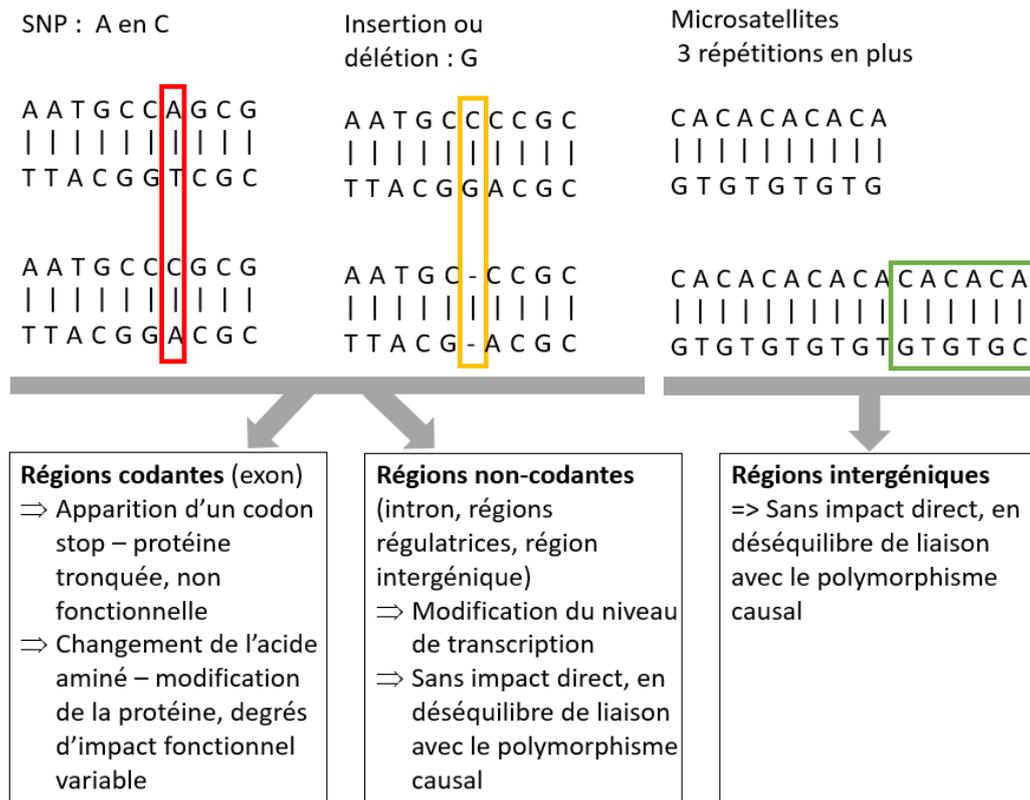


Figure 16 : Exemples de variations génétiques pouvant avoir un impact sur des caractères quantitatifs.

3) Les puces à ADN

L'utilisation de puces à ADN permet le génotypage à plus ou moins grande échelle de SNPs dans un échantillon d'ADN, c'est-à-dire la caractérisation des allèles des différents SNPs testés, en général répartis sur l'ensemble du génome. Ces puces sont des lames de verre sur lesquelles sont fixées des fragments d'ADN spécifiques des allèles de chaque SNP à tester, appelés sondes. L'ADN à génotyper est marqué par un fluorochrome. Il s'hybride sur la sonde lorsqu'il y a une complémentarité des séquences. La fluorescence est ensuite détectée et quantifiée. Plusieurs sociétés commerciales proposent ce genre de puces à ADN (principalement Illumina et Affymetrix).

Chez la souris, les nouvelles techniques de séquençages et la production des nouvelles GRPs tel que le CC, ont permis le développement de nouvelles puces à ADN. Par exemple, la puce MUGA pour Mouse Universal Genotyping Array (Première génération, 2012), la puce MegaMUGA (Deuxième génération, 2015) et la puce GigaMUGA (Troisième génération) sont des puces de génotypage à faible coût développées par la société Illumina [131–133]. Les SNPs

présents sur ces puces ont été choisis pour représenter au mieux les populations de souris utilisées en laboratoire et notamment les 8 lignées parentales du Collaborative Cross. MUGA contient 7851 SNPs avec une couverture du génome environ tous les 300 kb. MegaMUGA contient 77808 SNPs espacés en moyenne de 33 kb, incluant le chromosome mitochondrial et le chromosome Y. Enfin, GigaMUGA contient plus de 141090 SNPs espacés d'environ 10 kb incluant le chromosome X et Y et le génome mitochondrial [132]. Les lignées du Collaborative Cross ainsi que les 8 lignées parentales ont pu être génotypées avec ces puces hautes densité. Les données sont disponibles en ligne.

4) Le QTL mapping

Un QTL est une région du génome ou un haplotype dont les allèles sont associés à la variation d'un caractère (phénotype) quantitatif. La détection de QTLs est basée sur des analyses statistiques permettant d'associer des informations phénotypiques et des informations génotypiques. La puissance de détection d'un QTL est fonction de plusieurs facteurs : i) la génétique de la population utilisée (fond génétique) et le nombre de recombinaisons génétiques qu'elle présente (type de croisement, structure de la population) ; ii) le nombre et les effets des QTLs sur le caractère d'intérêt ainsi que leurs interactions ; iii) le nombre d'individus et la profondeur de génotypage des individus utilisés dans l'analyse.

Deux approches : l'analyse de liaison ou d'association

Il existe plusieurs méthodes pour identifier des QTLs : les analyses de liaison, les analyses d'association ou une combinaison de ces deux types d'analyses. Les analyses de liaison sont effectuées sur le principe de l'observation de la descendance d'un individu hétérozygote (souvent un F1) pour de nombreux marqueurs génétiques (Figure 17). Pour chaque marqueur, en fonction de l'allèle qui a été transmis, si des différences de phénotype sont observées dans la descendance, on peut conclure à la présence d'un QTL à proximité du marqueur étudié. Ces analyses nécessitent une descendance en ségrégation, par exemple des populations F2 ou BC, au sein desquelles beaucoup de marqueurs seront hétérozygotes. La carte génétique doit être de bonne qualité ; les marqueurs doivent être régulièrement répartis sur le génome.

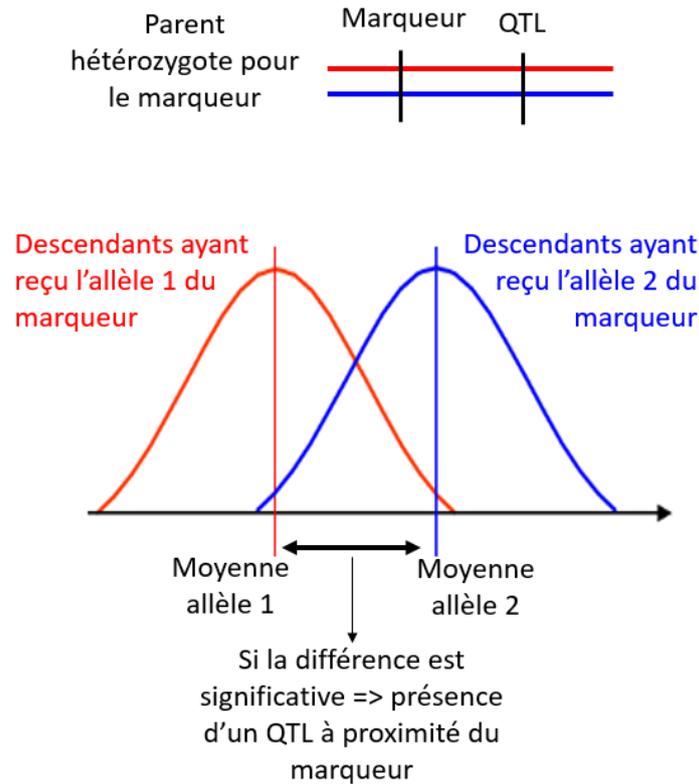


Figure 17 : Principe d'une analyse de liaison.

Un parent hétérozygote transmet l'allèle 1 ou l'allèle 2 à sa descendance. Le phénotype est mesuré dans cette descendance. Si la différence entre les moyennes des deux groupes (Allèle 1 ou 2) est significative, alors un QTL se situe à proximité du marqueur étudié.

Les analyses d'association, quant à elles, se basent sur le principe de déséquilibre de liaison (association préférentielle entre deux allèles à deux loci différents). C'est un haplotype qui est pris en compte dans l'analyse, soit plusieurs SNPs situés à proximité en déséquilibre de liaison (Figure 18). Ces analyses sont réalisées sur une population dont la diversité génétique est importante, par exemple les souris du DO. Ces populations présentent un grand nombre de recombinaisons génétiques.

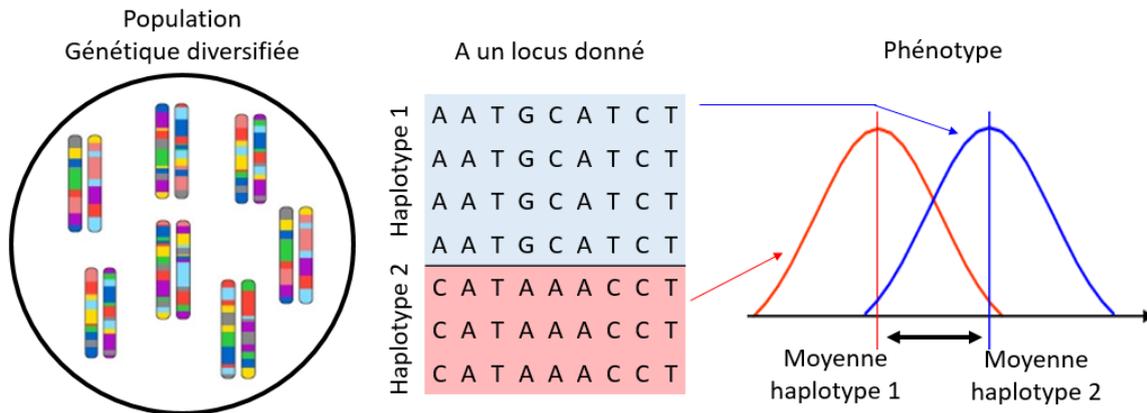


Figure 18 : Principe d'une analyse d'association.

A partir d'une population génétique diversifiée, des haplotypes sont pris en compte dans l'analyse, soit plusieurs SNPs situés à proximité en déséquilibre de liaison. Si la différence entre les moyennes des deux groupes (Haplotype 1 ou 2) est significative, alors un QTL se situe à proximité du locus étudié.

Quel que soit le type d'analyse, pour définir si la différence entre les moyennes des deux groupes est significative, des tests statistiques sont utilisés, tels que des analyses de la variance (ANOVA) ou des tests de Student (t-test). Les valeurs de $\log_{10}(P)$ ou de \log_{10} of the odds (LOD score) sont calculées sur l'ensemble du génome et peuvent être représentées sur un graphique tel que présenté sur la Figure 19. Le LOD score est un indicateur statistique permettant d'estimer la probabilité de liaison entre deux marqueurs. C'est le logarithme du rapport de vraisemblance entre deux hypothèses :

$$\log_{10} \frac{H_0 : \text{vraisemblance "présence d'un QTL"}}{H_1 : \text{vraisemblance "absence de QTL"}}$$

Les pics de LOD score représentent des régions où une association peut être faite entre le génotype et le phénotype. Les seuils de significativités peuvent être définis de différentes manières. La méthode la plus utilisée est un test de permutation. Ces seuils sont représentés par des lignes horizontales (Figure 19). Ils définissent les limites du QTL. Le test de permutation est une approche statistique robuste qui permet de réaliser des régressions linéaires sans avoir à vérifier les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des résidus, en se basant sur des méthodes de ré-échantillonnage aléatoire.

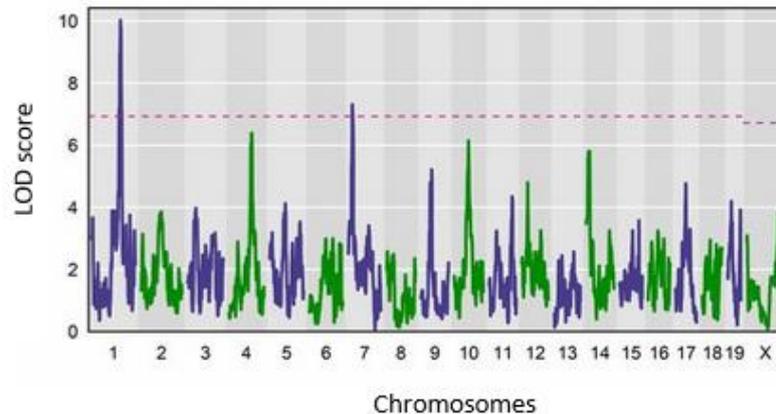


Figure 19 : Cartographie d'association sur le nombre de neutrophiles dans 742 souris DO. La ligne horizontale en pointillés représente le seuil de significativité à 5%. Deux QTLs ont été identifiés, le premier sur le chromosome 1 et le deuxième sur le chromosome 7 [134].

Comparaison des deux approches

Dans une analyse de liaison et l'utilisation de populations F2 et BC par exemple, le faible nombre de recombinaisons génétiques permet la détection de QTLs, mais avec une faible résolution. Les QTLs sont identifiés avec de larges intervalles de confiance. Il est donc difficile d'identifier un gène candidat unique sous ces QTLs. Néanmoins, du fait de ce faible nombre de recombinaisons, peu de marqueurs sont nécessaires à l'identification de QTLs. Ainsi, augmenter le nombre de marqueurs ne permet pas d'augmenter la résolution de détection [135]. Cependant, augmenter le nombre d'individus dans l'analyse permet d'augmenter la puissance de détection. Par exemple, pour la détection d'un QTL avec un effet faible sur le phénotype (environ 5%), un espacement de 20 cM entre marqueurs et 300 animaux F2 sont suffisants pour détecter le QTL sur un intervalle de confiance de 40 cM, tandis que 1000 animaux sont nécessaires pour un intervalle de 10 cM [135–137]. Enfin, l'utilisation de seulement deux lignées consanguines expérimentales à la base des croisements F2 ou BC ne permet pas de représenter la diversité génétique de l'espèce dans laquelle les études sont menées [138]. Ainsi, tous les QTLs ne peuvent pas être identifiés dans ce type d'approche, d'où l'intérêt du Collaborative Cross (cf. §2).

Dans une analyse d'association, les populations utilisées sont génétiquement beaucoup plus diversifiées. L'existence d'une structuration de la population peut avoir un impact sur les résultats mais les populations telles que les DO de par leur schéma de croisement, permettent de s'affranchir de ces difficultés [107]. Le grand nombre de recombinaisons génétiques permet d'obtenir une résolution d'analyse beaucoup plus fine. L'utilisation d'un grand nombre

de marqueurs est néanmoins nécessaire pour obtenir cette haute résolution. Chez la souris, le développement des nouvelles générations de puces de génotypage (MUGA, MegaMUGA et GigaMUGA) permet d'obtenir cette résolution [133].

Les approches utilisées avec les lignées du CC

La caractérisation des génomes des lignées des CC a été réalisée initialement avec des puces à ADN MUGA puis MegaMUGA. Récemment, le séquençage complet et le génotypage GigaMUGA d'un mâle pour les 69 lignées du CC ont été réalisés [139]. Les données produites sont partagées entre tous les utilisateurs des CC. A partir des données de génotypage, une reconstruction des génomes des lignées du CC en fonction des allèles des huit lignées parentales a été réalisée. Le génome des lignées du CC reconstruit est une mosaïque de segments hérités des huit lignées parentales (Figure 20, A). Chaque couleur représente une lignée parentale. Pour reconstruire les haplotypes, le modèle statistique HMM, pour Hidden Markov model utilisant les probabilités qu'une lignée parentale contribue à l'allèle pour chaque marqueur, a été utilisé. La puce MegaMUGA a été conçue pour distinguer les huit lignées parentales dans n'importe quelle fenêtre de trois marqueurs [133]. La Figure 20B représente la reconstruction entre une région héritée de la lignée parentale A/J et une région héritée de CAST/EiJ. La position de la transition entre les deux régions, représentant un événement de « crossover », reste incertaine (région grise).

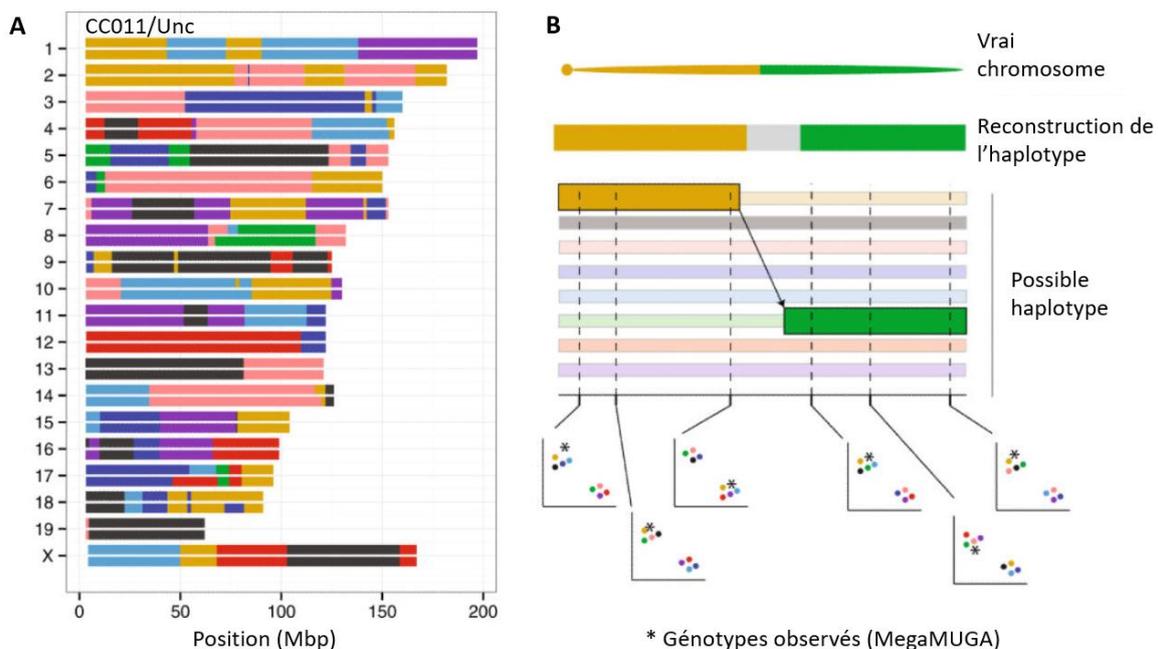


Figure 20 : Reconstruction des haplotypes dans une population CC
 (A) Exemple de reconstruction pour la lignée CC011/Unc, (B) Représentation schématique d'une reconstitution par un modèle HMM [133].

Deux modèles statistiques de régression linéaire peuvent être utilisés pour faire du QTL mapping. Le premier est un modèle additif (additive model) prenant en compte 8 probabilités, soit les 8 combinaisons homozygotes des allèles des 8 lignées parentales. Dans ce modèle, l'hypothèse est que les allèles des 8 lignées parentales ont un effet additif. A chaque locus, les allèles des 8 lignées fondatrices sont testés pour identifier leur contribution au phénotype. Tester la présence d'un QTL revient donc à tester si la contribution génétique des fondateurs est significativement différente. Le deuxième est un modèle dit complet (full model) prenant en compte les 36 probabilités, soit 8 homozygotes et 28 hétérozygotes. Dans ce modèle, les effets de dominance sont pris en compte. Quel que soit le modèle, des covariables tels que l'expérimentation, le sexe ou l'âge peuvent également être pris en compte. Des outils informatiques tels que R/QTL2 sous R permettent le calcul des LOD score ou $\log_{10}(P)$, l'identification des QTLs, le calcul des seuils de significativités (0.9, 0.5, 0.99), les intervalles de confiance de localisation des QTLs et les effets des allèles des lignées parentales.

Une simulation avait montré que l'utilisation de 500 lignées CC permettrait une puissance de 67% pour détecter un QTL d'effet faible (5%) [140]. Cependant le nombre de lignées du CC disponibles aujourd'hui est bien inférieur. Néanmoins, plus récemment, des études ont montré qu'un nombre limité de lignées reste suffisant pour la détection de QTLs et l'identification de gènes candidats [106, 141, 142]. De plus, de nombreux autres facteurs influencent l'identification de gènes candidats par ces analyses QTLs tels que la diversité des haplotypes des lignées fondatrices présentes dans les CC testées, les effets des covariables, la nature multigénique du caractère testé, le niveau d'effet du gène sur le caractère [143]. Les stratégies mises en place en combinant l'utilisation de CC, DO et F2 permettent d'optimiser l'identification de ces gènes candidats [111].

Les approches utilisées avec les souris du DO

Le DO est une population non-consanguine (outbred) présentant un fort degré de diversité génétique et phénotypique. Le grand nombre de recombinaisons génétiques permet d'augmenter la résolution des analyses QTLs, se rapprochant de celles qui peuvent être obtenues en GWAS chez l'Homme. Les puces à ADN haute densité utilisées pour le génotype (MegaMUGA ou GigaMUGA) permettent la reconstruction des génomes soit 36 combinaisons génétique (8 homozygotes et 28 hétérozygotes). Comme pour les CC, un modèle additif ou complet peut être utilisé et des outils informatiques tels que R/QTL2 permettent le calcul des

LOD score ou $\log_{10}(P)$, l'identification des QTLs, le calcul des seuils de significativité, les intervalles de confiance de localisation des QTLs et les effets des allèles des lignées fondatrices.

Les analyses menées jusqu'à présent avec des souris DO ont permis de valider la capacité de détection des QTLs avec une très haute résolution. Par exemple, une étude sur le cholestérol avec 150 souris du DO a permis d'identifier 1 QTL avec un intervalle de confiance de 2 Mb contenant seulement 11 gènes [112]. Une récente étude sur le taux de filtration glomérulaire dans le rein a permis d'identifier 1 QTL de 1 Mb d'intervalle de confiance contenant 32 gènes et pseudo-gènes avec seulement 120 femelles du DO [144].

5) L'identification des gènes candidats

Une fois le QTL identifié et positionné, l'objectif est d'identifier sous ce QTL, des gènes ou des SNPs candidats associés au phénotype d'intérêt. Les récentes avancées en matière de séquençage et de bioinformatique permettent de mieux estimer aujourd'hui l'impact d'un grand nombre de SNPs sur les gènes et les phénotypes associés. Par exemple, il est possible de savoir si un SNP altère la structure d'une protéine ou sa fonction (présence dans un exon) ou bien s'il modifie l'expression d'un gène (présence dans un promoteur ou un amplificateur) [145]. Chez la souris, ces informations sont en accès libre (open access) en ligne.

Un autre moyen permettant l'identification de gènes candidats est l'analyse transcriptomique. Il est en effet possible qu'un caractère quantitatif soit associé à une altération de l'expression d'un gène. Ainsi, de nombreuses études de transcriptomiques ont permis l'identification de gènes candidats associés à un phénotype d'intérêt [146–150]. Cependant, le niveau d'expression d'un gène est souvent lié aux tissus dans lequel il est exprimé. Ces différences entre tissus rendent donc les résultats difficiles à interpréter. Il est donc important de bien choisir le tissu dans lequel mener l'analyse.

Finalement, les gènes candidats identifiés peuvent être validés par différentes méthodes comme par exemple l'utilisation de lignées N2F1, de lignées congéniques ou de lignées Knock-out (Ko) ou mutées pour les gènes candidats. Avec le développement des méthodes d'édition du génome tel que la technologie CRISPR/Cas9, il est de plus en plus facile de produire des

lignées transgéniques Ko ou mutées pour un gène candidat. Chez la souris, certaines de ces lignées sont déjà disponibles à l'achat en ligne.

VIII. La résistance à SE : les QTLs chez la souris et la poule

Les modèles expérimentaux et les méthodes de QTL mapping présentés précédemment ont permis, chez la souris et la poule, d'identifier des QTLs et des gènes candidats associés à la réponse à *Salmonella* Enteritidis. Aucun gène majeur n'a été identifié, quel que soit le modèle. Néanmoins, certains de ces gènes candidats sont communs aux deux modèles souris et poule.

1) Les QTLs chez la souris

Jusqu'à aujourd'hui, dix QTLs nommés *Ses* pour *Salmonella* Enteritidis susceptibility ont été identifiés chez la souris (Tableau 2).

Phénotype	Symbole	Chromosome	Localisation (bp)	Références
Comptage SE dans la rate 42 jours post-infection	Ses1a	1	73726922- 73727077	[98]
	Ses1b	1	Synténique	[98]
	Ses2	7	84290094- 84290240	[97]
	Ses3	15	74117005- 74117153	[97]
	Ses4	X	Synténique	[98]
	Ses5	7	Synténique	[98]
	Ses6	9	2 cM	[98]
	Ses7	2	133306330- 133306474	[98]
	Ses8	4	25683240- 25683429	[98]
	Ses9	3	136057332- 136057456	[98]
Ses10	13	99739968- 99740106	[98]	

Tableau 2 : Liste des QTLs associés à la réponse à *Salmonella* Enteritidis chez la souris.

Ses1, *Ses2* et ont été identifiés dans une analyse sur des F2 entre C57BL/6J (B6) et 129Sv/SvEvTac (129Sv) [97]. B6 est une lignée capable d'éliminer rapidement SE alors que 129Sv est une lignée pouvant présenter un portage à plus long terme. Dans cette étude, le gène *Slc11a1* (anciennement *Nramp1*) présent sous *Ses1* a été mis en avant. Ce gène avait déjà été identifié dans de précédentes études comme étant associé à la résistance à *S. Typhimurium* (cf. *Slc11a1*, page 43). *Ses1* a été ensuite validé en utilisant des souris backcross entre 129Sv et B6 [98]. Cette étude a permis de restreindre *Ses1* en deux régions distinctes,

Ses1a et *Ses1b*, mais n'a pas permis de valider *Ses2* et *Ses3*. Finalement, une analyse d'association séparant mâles et femelles a permis d'identifier 7 nouveaux QTLs : de *Ses4* à *Ses10* [98]. Plus récemment, des validations fonctionnelles de ces QTLs ont été menées dans des lignées congéniques (entre B6 et 129Sv) et des interactions entre ces QTLs ont été montrées [151].

2) Les QTLs chez la poule

Chez la poule, trois études ont permis d'identifier des QTLs associés à la résistance au portage après une infection par *Salmonella* Enteritidis (Tableau 3). Ces trois études ont reposé sur des croisements F2 ou backcross entre la lignée N et la lignée 6₁. Certains de ces QTLs ont pu être validés dans des études *a posteriori* dans un autre fond génétique [152]. Des travaux similaires ont également été menés sur la résistance à *S. Typhimurium* sur ces mêmes lignées N et/ou 6₁ et ont également identifié des QTLs [121, 123, 153], dont très peu sont localisés au même endroit que pour SE. Ces résultats révèlent des différences de mécanismes d'infection et d'interaction avec l'hôte entre les différences serotypes au sein du même genre bactérien *Salmonella*.

Phénotype	Chromosome	Croisement	Références
Comptage SE issus d'un écouvillon cloacal ou dans le contenu caecal	1, 2, 5, 11, 16	(N × 6 ₁) × (N × 6 ₁) ou (N × 6 ₁) × 6 ₁	[123] [152]
	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 14, 18, 22, 24, 27	(N × 6 ₁) × (N × 6 ₁)	[154]
	2, 3, 5, 9, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 26	(N × 6 ₁) × (N × 6 ₁)	[155]

Tableau 3 : Liste des études ayant identifiées des QTLs associés à la réponse à *Salmonella* Enteritidis chez la poule.

3) Les gènes identifiés

Les analyses « gènes candidats » permettent de valider des gènes potentiellement associés à un phénotype. L'utilisation de lignées congéniques, Ko ou recombinantes permet ce type d'analyses. Ce paragraphe décrit les gènes d'intérêt associés à la résistance à *S. Enteritidis* qui ont pu être identifiés à la fois chez la souris et la poule ou dans l'un des deux modèles.

Slc11a1

L'un des gènes identifiés est *Nramp1* (Natural resistance-associated macrophage protein 1), renommé aujourd'hui *Slc11a1* (Solute carriers family 11 member 1). Chez la souris, localisé sur le chromosome 1, il a d'abord été associé à la résistance à ST en utilisant des backcross F1 et des F2 entre des C57BL/6J résistantes et des BALB/c sensibles à ST [100, 156]. Plus tard, un séquençage du gène chez des souris B6 et 129 a montré qu'une seule mutation en position 169 (Asp -> Gly) était responsable de la perte de fonction de la protéine [157]. Dans l'étude de Caron et ses collaborateurs, le locus *Ses1* contenant le gène *Slc11a1*, expliquant 20% de la variabilité, a été associé à l'infection par SE [97]. Chez la poule, un homologue à *Slc11a1* a été identifié sur le chromosome 7 [158, 159]. En utilisant différents fonds génétiques (lignées expérimentales ou lignées commerciales non-consanguines), des polymorphismes ont été identifiés comme ayant un impact significatif sur la charge bactérienne dans le caecum et la rate sans pour autant représenter plus de 3 à 6% de la variation phénotypique dans les caecum et 18% dans la rate [160–163]. Par ailleurs, dans les croisements F2 entre les lignées N et 6₁, aucun QTL à proximité du gène n'a été identifié [154]. Ce gène ne semble donc pas être impliqué dans tous les fonds génétiques.

Des études physiologiques et fonctionnelles ont montré le rôle de *Slc11a1* dans le contrôle de la réplication intracellulaire des salmonelles dans les phagosomes ou les SCV. *Slc11a1* code pour une protéine transmembranaire jouant le rôle de pompe au niveau des phagosomes dans les macrophages et les neutrophiles (transport de l'intérieur des phagosomes vers l'extérieur) pour des métaux divalents tels que Fe²⁺, Zn²⁺ et Mn²⁺ [164]. Or, ces métaux divalents sont nécessaires à la bactérie pour sa survie dans les phagosomes. Ainsi, une diminution de la disponibilité de ces ions ralentirait la multiplication des salmonelles [165, 166]. Une étude d'expression du gène chez la poule, a montré qu'une sur-expression précoce chez des poussins pouvait être associée à la résistance à SE [167]. De nouvelles analyses ont montré que *Slc11a1* aurait un impact sur la réponse adaptative avec un impact sur la différenciation des lymphocytes T auxiliaires pouvant expliquer le portage chronique de SE [99].

Finalement, une étude chez la souris sur le modèle de portage chronique a montré que *Slc11a1* muté (allèle de B6 ou 129 Ko) permettait une élimination plus rapide des bactéries [97], contrairement au modèle d'infection par ST où l'allèle muté est associé à une sensibilité.

Ainsi, la résistance à un portage chronique et la résistance à une infection systémique seraient des caractères négativement corrélés.

Tlr4

Un autre gène identifié comme étant impliqué dans le contrôle génétique de la résistance à SE est *Tlr4* (Toll-like receptor 4). Comme expliqué dans la partie 1, TLR4 est impliqué dans la reconnaissance des LPS (lipo-polysaccharides) des bactéries Gram négatives. Il a d'abord été identifié chez la souris sur le chromosome 4 avec *S. Typhimurium* [168, 169]. Une mutation ponctuelle chez les souris C3H/HeJ, et une délétion chez les souris C57BL/10ScCr seraient responsables dans les 2 cas d'une diminution de la reconnaissance des LPS bactériens [170]. Le gène homologue chez la poule se situe sur le micro-chromosome 17. Des études sur différents fonds génétiques (lignées expérimentales ou lignées commerciales non-consanguines) ont permis d'identifier des polymorphismes dans *Tlr4* directement ou indirectement associés à la résistance à *S. Enteritidis* chez la poule [42, 160, 171]. Comme pour *Slc11a1*, aucun QTL à proximité de *Tlr4* n'a pourtant été identifié dans des croisements F2 entre les lignées N et 6₁. Il est possible que ces lignées soient homozygotes pour le même allèle de *Tlr4*, ne permettent donc pas l'identification de son implication dans la résistance au portage. Des études sur les niveaux d'expression de *Tlr4* ont également été menées. Néanmoins, une étude sur l'expression du gène a montré que, dans trois populations cellulaires (entérocytes, lymphocytes et mélange cellulaire), la lignée N résistante à SE exprime plus fortement *Tlr4* que la lignée 6₁ sensible [172]. De même, l'expression de *Tlr4* est bien plus faible dans les leucocytes de White Leghorn sensibles à SE comparé à des individus résistants ; une sur-méthylation des promoteurs de *Tlr4* après infection serait à l'origine de cette différence [173].

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Un locus identifié à la fois chez la souris et la poule est le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce locus complexe, très polymorphe, contient des gènes de l'immunité. Il existe trois sortes de CMH : les CMH de classe I, dont les molécules sont exprimées sur toutes les cellules nucléées, les CMH de classe II, exprimées seulement au niveau des cellules présentatrices d'antigènes et les CMH de classe III, exprimées sous forme soluble dans le plasma. Chez la

poule, le CMH est localisé sur le micro-chromosome 16. Son implication dans la résistance au portage de SE a été identifiée par QTL mapping sur des croisements F2 entre les lignées N et 6₁ [123]. Avant cela, des études d'infection par SE avaient montré l'association entre CMH et réponse à l'infection : une première étude a montré l'association entre les haplotypes du complexe CMH B et la mortalité de jeunes poussins suite à une infection intrapéritoneale de SE dans 12 lignées congéniques [119] ; une deuxième étude travaillant sur les haplotypes du complexe CMH de classe I et CMH de classe II a montré l'association entre un polymorphisme dans le domaine CMH I α_2 (A->T) et la charge bactérienne dans la rate après une infection par SE [70, 174]. Finalement, une étude sur l'efficacité vaccinale contre SE a montré que certains haplotypes au niveau des domaines a1, a2 du complexe CMH I et b1 du complexe CMH II permettent une meilleure réponse à la vaccination avec une augmentation du nombre d'anticorps [175]. Chez la souris, le complexe majeur d'histocompatibilité est localisé sur le chromosome 17. Le complexe a été identifié dans une étude sur des souris C57BL/10 congéniques pour la sensibilité à *S. Typhimurium*. Les haplotypes H2b et H2d expliquent une diminution de la valeur de LD50 comparés aux haplotypes H2a, H2k et H2f [176].

Une réponse multigénique

La réponse à *S. Enteritidis* reste multigénique. Aucun gène majeur n'a été identifié chez la poule comme chez la souris. Selon une analyse d'association menée sur des individus White Leghorn croisés entre deux lignées expérimentales (W1, résistante et C, sensible), NRAMP1 et TLR4 expliqueraient seulement 35% de la variation de réponse à *S. Typhimurium* [177]. Comme expliqué précédemment, les études menées sur la réponse à une infection par SE sur les individus F2 entre lignées N et 6₁, n'ont pas montré de QTLs au niveau des régions de *Slc11a1* et *Tlr4* [152], mais de nombreux autres gènes relatifs à la réponse immunitaire ont été identifiés, bien qu'avec des modèles d'infection différents. Par exemple, CD28, IAP1, TGF- $\beta_{2,3,4}$, Gal_{11,12,13}, TRAIL, IL-_{2,10}, PSAP, IGL, CASP1, iNOS, PIGR, et MAPKAPK12 chez la poule, ont été associés avec la charge bactérienne dans les caeca et la rate après infection par SE [116]. D'autres gènes chez la souris ont également été identifiés comme par exemple le gène IL-12. Il a été montré que des individus IL-12a^{-/-} et IL-12b^{-/-} sont plus sensibles à une infection par SE que des souris sauvages et que la sensibilité plus accrue dans les souris IL-12b^{-/-} serait liée à une réduction de la réponse T_{H2}, inadéquate avec une réponse immunitaire adaptée contre SE dans les cellules [151, 178]. Ainsi, selon les modèles d'infection, les fonds génétiques

utilisés et les types de phénotype évalués, ce ne sont pas forcément les mêmes gènes qui sont identifiés et les effets de ces gènes identifiés ne semblent pas majeurs et stables.

Partie 3 : L'impact du microbiote sur la résistance à SE

Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, est composé de différents types de microorganismes tels que les archées, les bactéries, les champignons et les virus. Il joue un rôle important dans de nombreux processus de l'hôte comme les fonctions métabolique, immunitaire et neurologique. Que ce soit chez l'Homme ou les animaux d'élevage, les avancées technologiques en matière de séquençage ces dernières années ont permis de mieux caractériser les espèces qui le composent et leurs fonctions. Dans cette partie, nous définirons le microbiote intestinal et ses fonctions. Puis nous décrirons les principales méthodes utilisées pour son étude. Enfin, nous détaillerons les connaissances acquises sur le microbiote intestinal de la poule et sur les mécanismes de résistance à *S. Enteritidis* liées au microbiote intestinal. Dans une dernière partie, nous développerons les connaissances acquises sur l'impact de la génétique de l'hôte sur le microbiote intestinal.

IX. Le microbiote intestinal

Selon les domaines d'application, comme l'écologie ou la génomique, les définitions décrivant un microbiote et son environnement peuvent être très différentes [179]. Nous allons donner quelques définitions de ce microbiote :

- Un **microbiote** est une communauté de micro-organismes (bactéries, archées, champignons et virus), ou encore écosystème microbien, vivant dans un environnement spécifique, dans un hôte (animal ou végétal) ou dans un écosystème tel que le sol, l'eau, l'air, la litière, un aliment, ...
- Un **microbiome** est composé du microbiote et de l'ensemble de ses activités et des interactions avec l'environnement de son hôte (Figure 21) [179].
- Un **écosystème** est un ensemble formé par une communauté d'espèces (biocénose) en interaction avec son environnement (biotopie).
- L'**écologie microbienne** consiste à caractériser la biodiversité microbienne d'un écosystème et à caractériser les interactions entre les micro-organismes, entre les

micro-organismes et l'écosystème ou entre les micro-organismes et l'hôte (symbiose, commensalisme, parasitisme, agent pathogène...).

- Une **symbiose** est une association intime et durable entre deux ou plusieurs organismes hétérospécifiques (espèces différentes).
- Un **holobionte** est un hybride entre les cellules d'un hôte et d'une communauté microbienne qui ensemble, synergiquement et coopérativement, régulent la balance entre santé et maladie [180] et qui peut être considéré comme une unité ultime sur laquelle l'évolution et la sélection agissent [181].

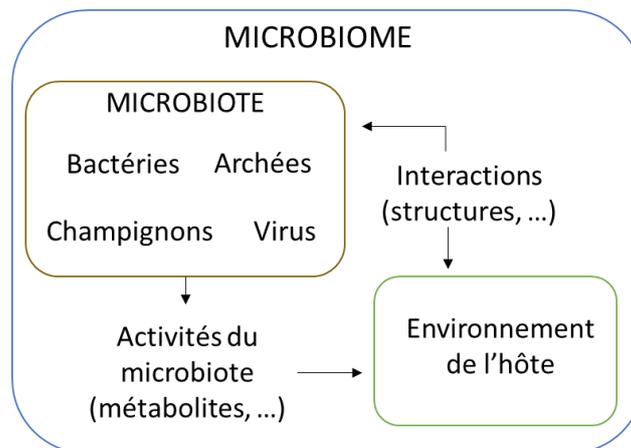


Figure 21 : Microbiome, microbiote et environnement de l'hôte.

Sur un même hôte, plusieurs microbiotes peuvent être étudiés en fonction de l'endroit colonisé : par exemple, au niveau de la peau, de la bouche, du vagin, des poumons ou des glandes mammaires chez les mammifères. Le microbiote intestinal est le plus étudié. Il est le plus important en quantité de micro-organismes. Chez l'Homme, le nombre de microorganismes dans l'ensemble du tractus digestif est compris entre 10^{12} et 10^{14} , soit entre 1 à 10 fois plus que le nombre de cellules qui composent le corps humain [182, 183]. Le microbiote intestinal est également, sans doute, le plus important fonctionnellement. Il contribue à un très grand nombre de fonctions de l'hôte si bien qu'on considère aujourd'hui que l'hôte et le microbiote intestinal forment une symbiose et qu'ils constituent ensemble un holobionte. Le séquençage du métagénome intestinal humain (ensemble des génomes toutes espèces confondues contenues dans le microbiote intestinal) a permis d'identifier près de 10 millions de gènes bactériens non-redondants, soit 400 fois plus que le nombre de gènes chez l'Homme [184, 185].

1) Les fonctions du microbiote intestinal

De nombreuses fonctions sont exercées par le microbiote intestinal (Figure 22). Tout d'abord, une fonction métabolique. Les micro-organismes du tube digestif sont capables de fermenter certains carbohydrates complexes que l'hôte n'est pas capable de dégrader, comme la cellulose. Les produits de cette fermentation, par exemple les acides gras à chaîne courte (SCFA en anglais pour « short chain fatty acids ») peuvent ensuite être absorbés et utilisés pour répondre à une partie des besoins énergétiques de l'hôte [186]. Chez les ruminants et la poule, respectivement 80% et 8% des besoins énergétiques sont assurés par les SCFAs produits par le microbiote [187, 188]. Les SCFA sont également des régulateurs des fonctions physiologiques de l'intestin en modulant la prolifération et la différenciation des cellules intestinales, en influençant la motilité intestinale et en renforçant les fonctions barrière de l'intestin [189]. La production d'enzymes, de vitamines et d'acides aminés et le métabolisme de xénobiotiques sont également des fonctions importantes du microbiote intestinal dans la régulation de la physiologie de l'hôte [186, 190].

Le microbiote intestinal joue également un rôle essentiel dans le développement et la maturation du système immunitaire [190, 191], favorisant ainsi la protection de l'hôte contre les pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons et évitant le développement de maladies inflammatoires de l'intestin telle que la maladie de Crohn [192–194]. Il permet également le maintien de l'homéostasie intestinale, de la fonction barrière de l'épithélium et de l'équilibre entre réponses pro- et anti-inflammatoire [190–192]. Il est aussi une barrière en lui-même contre les pathogènes de par sa fonction d'exclusion compétitive [195] (Cf. partie XI.2). Des études sur des animaux modèles germ-free (GF), complètement dépourvus de germes, ont ainsi montré que l'absence de microbiote intestinal, notamment lors de son développement à un stade précoce de la vie, était associée à des dysfonctionnements de ces fonctions immunitaires [193]. Chez la poule par exemple, il a été montré que dès l'éclosion, l'interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire mène à la production d'Interleukine 8 (IL-8), activant l'infiltration des hétérophiles et des lymphocytes au niveau de la *lamina propria* et au niveau de l'épithélium intestinal [195].

Enfin, une dernière fonction du microbiote intestinal est sa fonction neurologique. On parle aujourd'hui de l'axe entre le microbiote intestinal et le cerveau : le « brain gut microbiome axis ». Les résultats des recherches chez l'Homme suggèrent qu'une altération des interactions entre le microbiote intestinal et le cerveau pourrait être à l'origine de maladies neurologiques telles que Parkinson ou Alzheimer [196, 197]. Chez les animaux d'élevage, il a été montré que l'axe microbiote intestinal – cerveau pouvait avoir un impact sur les émotions, la mémoire et le comportement alimentaire et social des animaux, montrant qu'une amélioration de la santé et du bien-être des animaux est possible par une sélection, une nutrition et un management des élevages prenant en compte ce rôle du microbiote intestinal [198].

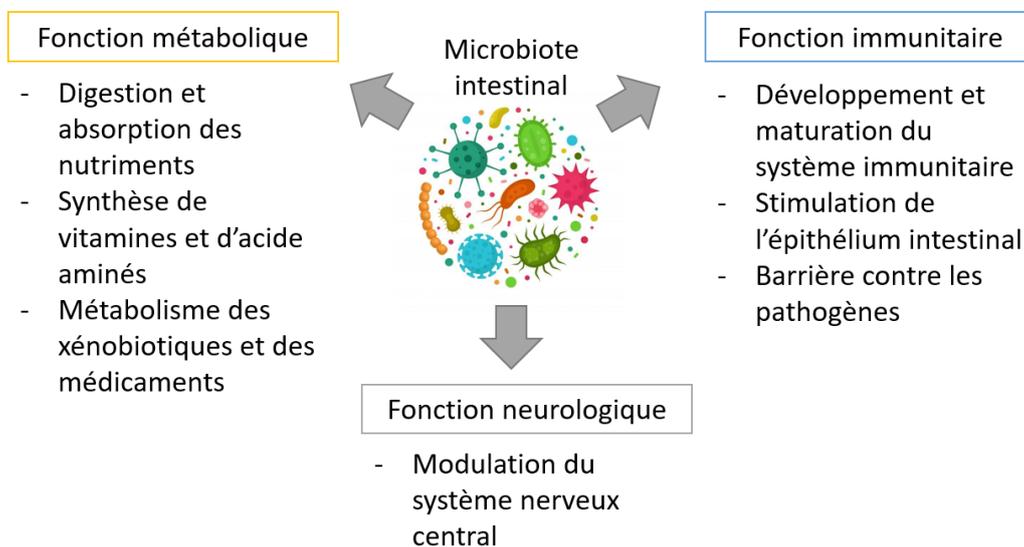


Figure 22 : Principales fonctions du microbiote intestinal.

2) La diversité du microbiote intestinal

Chez l'Homme, le microbiote intestinal est extrêmement dynamique et peut être influencé par de nombreux facteurs dont l'âge, le mode de vie, le régime alimentaire, les cycles hormonaux, les maladies ou les traitements thérapeutiques [199]. Chez les animaux d'élevage, d'autres facteurs tels que les systèmes de production, les niveaux de sécurité sanitaire ou la sélection génétique des individus, peuvent impacter le microbiote intestinal [200]. De plus, le microbiote peut varier en quantité et en qualité (composition et diversité) en fonction de la partie du tractus digestif dans lequel il se trouve. En effet, les gradients physiologiques (pH, peptides antimicrobiens, oxygène) le long du tractus digestif, mais également les localisations au niveau des tissus (mucus, crypte intestinale, ...) déterminent un

environnement favorisant l'installation de certains microorganismes plutôt que d'autres (Figure 23) [192, 197, 201, 202]. La composition du microbiote varie également entre individus d'une même espèce. En dépit de cette variabilité individuelle, chez l'Homme, les différents microbiotes peuvent être classés en trois entérotypes (ETs), en fonction de la variation de trois phylums bactériens : *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*, avec des fonctions propres à chacun des groupes [203]. Un projet à l'INRAE a également permis d'identifier deux ETs chez le porc dominés respectivement par *Ruminococcus* et *Treponema* ou par *Prevotella* et *Mitsuokella* [204]. Dans une étude plus récente, trois ETs ont été décrits chez le porc en fonction des genres *Lactobacillus*, *Clostridium sensu stricto 1* et *Bacteroides* [205]. Les liens identifiés entre ces différents types de microbiote et des caractères de performances suggèrent que ce concept d'entérotipe pourrait avoir un rôle important dans l'industrie de production porcine [204]. Chez le poulet de chair, une étude a permis d'identifier trois ETs en fonction de l'abondance relative des genres *Bacteroides* et *Escherichia-Shigella* (ET1), *Ochrobactrum* et *Rhodococcus* (ET2) et enfin *Bacillus* et *Akkermansia* (ET3) et a permis de montrer l'influence de ces ETs sur la régulation du métabolisme au niveau du duodénum [206]. Comme pour le porc, il serait intéressant d'utiliser ce concept d'entérotipe pour améliorer les performances en industrie de production aviaire.

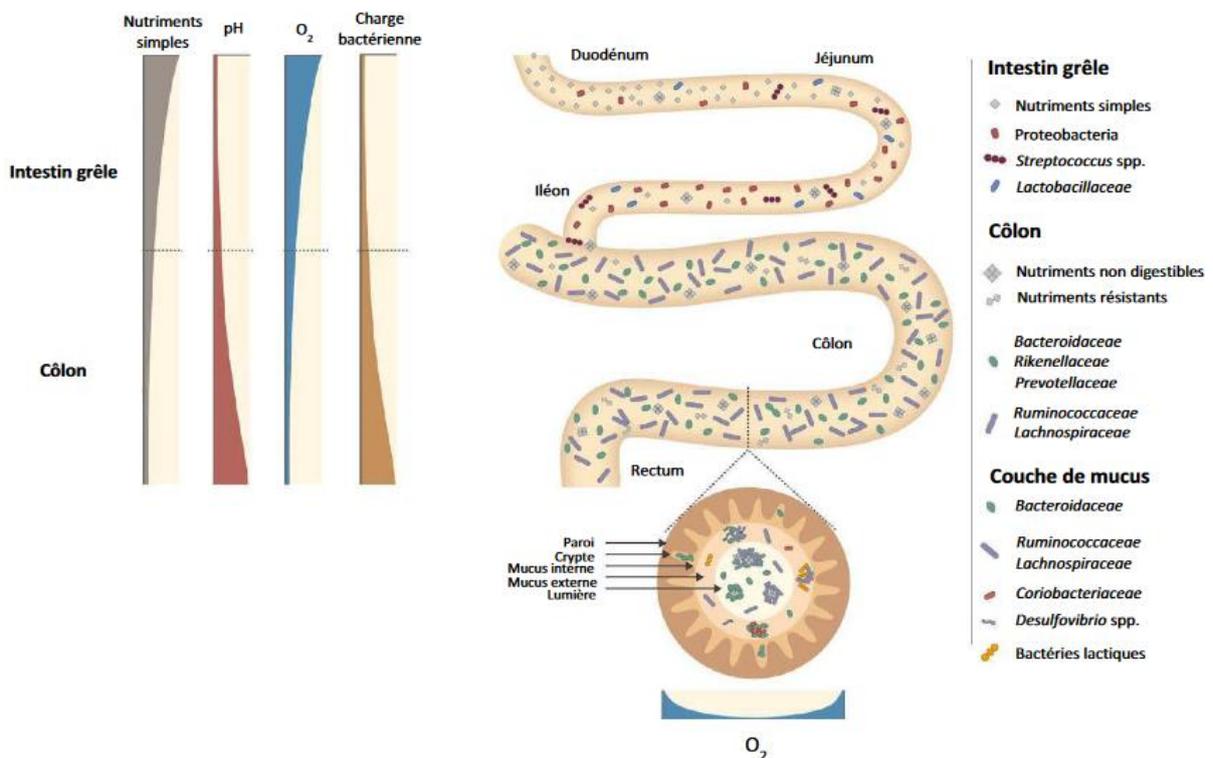


Figure 23 : Hétérogénéité du microbiote intestinal le long du tractus digestif chez l'Homme [207].

3) Eubiose, dysbiose et santé de l'hôte

Les fonctions du microbiote intestinal ne peuvent être assurées que si celui-ci est dit en eubiose, terme d'écologie microbienne signifiant que le microbiote est en « bonne santé » : riche, diversifié, équilibré et résilient [208]. Dans le cas contraire, on parle de dysbiose ; dans ce cas, le microbiote est soit pauvre en micro-organismes, soit peu diversifié, soit déséquilibré avec par exemple une augmentation du nombre de bactéries pathogènes. Une altération de la composition du microbiote a été associée à de nombreuses maladies chez l'Homme telles que des maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn par exemple), le cancer du colon ou l'obésité [197]. Dans les élevages, des facteurs comme l'utilisation d'antibiotiques ou l'infection par un pathogène peuvent modifier cette balance écologique et avoir des conséquences sur la santé et sur les performances des animaux. Par exemple chez la poule, l'utilisation d'antibiotiques suite à une infection par *Brachyspira pilosicoli*, modifie le métabolisme énergétique contribuant à une réduction du poids de l'animal et modifie la santé de l'hôte [209]. Une déficience en zinc chez la poule entraîne une dysbiose intestinale pouvant perturber la perméabilité intestinale, modifier la réponse immunitaire et augmenter la sensibilité à un pathogène [210].

Ainsi, ces dernières années, l'étude du microbiote intestinal devient indispensable dans les recherches en sciences animales [211], notamment dans les études d'infectiologie [191, 194]. Mieux comprendre les mécanismes d'interactions entre l'hôte et son microbiote permet d'identifier de nouvelles solutions pour répondre aux enjeux sociaux, environnementaux et économiques dans nos filières d'élevage.

X. Les méthodes d'analyses du microbiote

Avant le développement des nouvelles technologies de séquençage de l'ADN à haut débit, les études de microbiotes étaient basées sur des techniques de culture bactérienne. Ces méthodes ne permettaient pas d'identifier l'ensemble des microorganismes dans un échantillon, notamment les bactéries anaérobies, difficilement cultivables. Aujourd'hui, à partir d'ADN extrait d'un échantillon de microbiote, deux principales approches sont utilisées : le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S des bactéries ou bien le séquençage complet du métagénome (Figure 24).

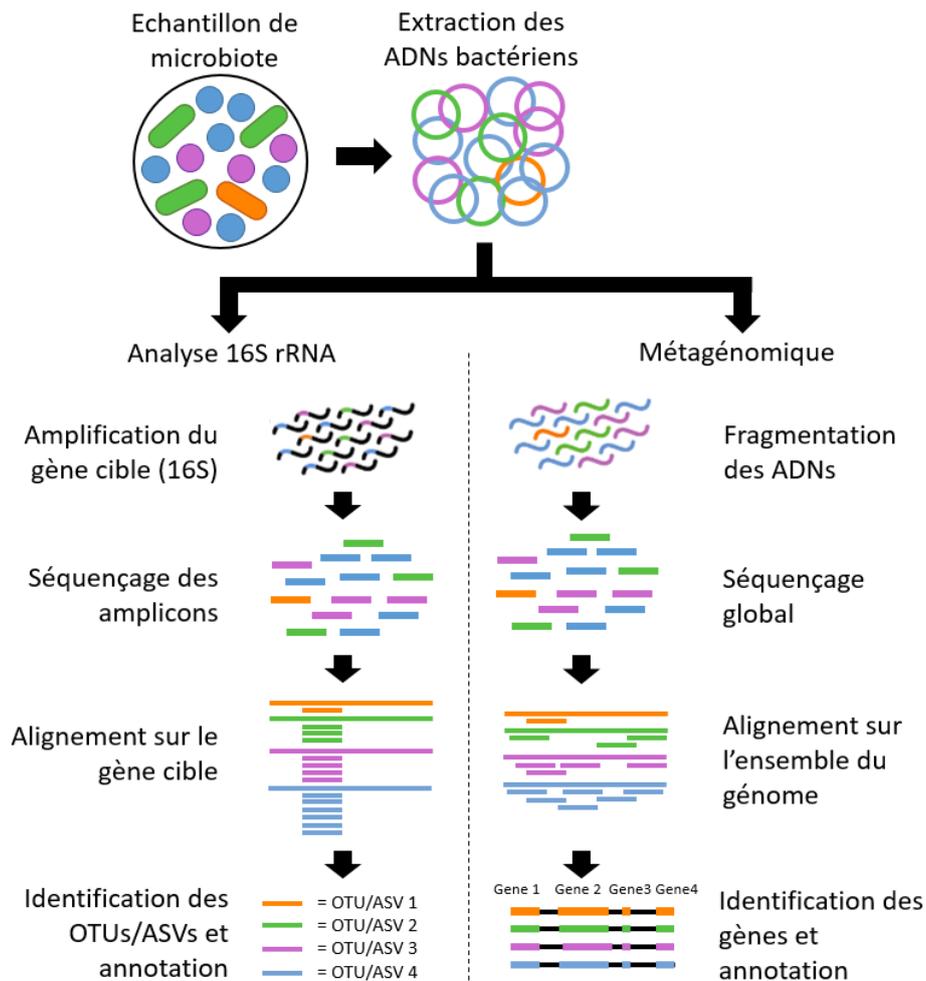


Figure 24 : Les deux principales approches pour l'étude du microbiote intestinal : les analyses 16S rRNA ou la métagénomique.

1) Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

Les études de séquençage 16S, 18S ou ITS (*internal transcribed spacer*) permettent la caractérisation et la quantification de l'abondance relative des microorganismes dans un échantillon. La technique se base sur une amplification de la petite sous-unité du gène ribosomal 16S pour les bactéries et les archées, la petite sous-unité de l'ARNr 18S pour les eucaryotes ou la région ITS pour les champignons [212]. Le séquençage de ces régions très variables permet de différencier facilement les différents types de microorganisme (les taxons) présents dans un échantillon. Les gènes ciblés sont des marqueurs taxonomiques.

La plupart des études du microbiote intestinal, notamment chez la poule [192], emploient le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S et donc s'intéressent aux bactéries uniquement. Cette région est composée de neuf régions hypervariables, de V1 à V9 [213]. Les régions amplifiées peuvent être différentes en fonction des études, par exemple V3/V4 ou

bien V4-V6 ou seulement V3 [212]. Différentes technologies de séquençage peuvent être utilisées, telles que Roche 454-pyrosequencing, Illumina MiSeq ou Illumina HiSeq [214]. De nombreux outils bio-informatiques existent pour traiter les séquences brutes générées par ces technologies. Les plus employés sont mothur [215] ou QIIME 2 [216] utilisables en ligne de commande. D'autres outils tel que FROGS [217] permettent les analyses sous Galaxy, une interface plus facile d'utilisation pour des non spécialistes de bio-informatique. Ces outils permettent d'effectuer les assignations taxonomiques en s'appuyant sur des bases de référence de données publiques telles que GreenGenes [218] ou SILVA [219]. Les séquences sont classées en unités taxonomiques opérationnelles, OTU en anglais pour *Operational Taxonomic Units*, sur la base de la similarité de séquences (généralement plus de 98% de similarité) ou en ASV en anglais pour *Amplicon Sequence Variant*, sur la base d'une parfaite similarité de séquences (100% de similarité). Les avantages et inconvénients des deux types de classification sont présentés en Tableau 4.

OTU	ASV
Sujet à des biais de référence (sauf pour l'identification des OTUs <i>de novo</i>)	Pas de référence nécessaire avant assignement taxonomique
Des tables d'OTU ne peuvent pas être combinées entre études	Des tables d'ASV peuvent être comparées entre études
Représenté par une séquence consensus (98% de similarité)	Représenté par une séquence exacte (100% de similarité)
Peut représenter plusieurs espèces	Ne représente qu'une seule espèce, sauf si les différentes espèces possèdent exactement les mêmes séquences
Représentation biaisée de la diversité	Bonne représentation de la diversité
Meilleure prise en compte des séquences faiblement représentées	Possible perte des séquences faiblement représentées

Tableau 4 : Différences entre une OTU et un ASV.

Les OTUs ou ASVs sont ensuite affectées à un groupe bactérien (famille, genre ou tout autre niveau taxonomique). Une table d'OTU/ASV permet de décrire, quantitativement et qualitativement, la composition microbienne d'un ensemble d'échantillons analysés. A partir de cette table, il est possible de calculer des indices qualifiant l'écosystème, tels que la

diversité alpha ou beta (Figure 25). Les outils de prédiction fonctionnelle tels que PICRUSt [220] peuvent ensuite être utilisés pour prédire à partir de données *in silico* les fonctions attribuées aux bactéries identifiées à partir de la table d'OTU/ASV. Il convient d'être prudent car ces analyses ne sont que des prédictions basées sur des informations très indirectes. L'un des biais importants est qu'un certain nombre d'OTUs/ASVs ne peuvent pas être assignés à un genre voire même à une famille spécifique [212]. Un autre biais est que les fonctions identifiées se limitent à celles qui sont déjà connues et recensées.

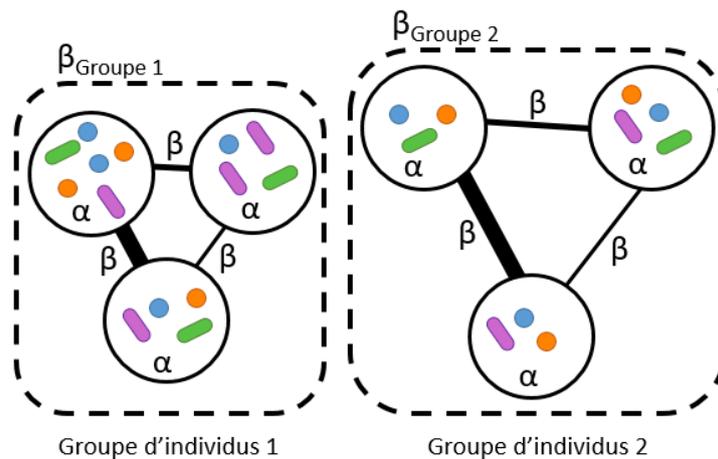


Figure 25 : Différence entre β -diversité et α -diversité.

Chaque cercle représente le microbiote d'un individu pouvant être décrit par une α -diversité, c'est à dire le nombre et le type de bactéries qui le composent. Les différences entre les microbiotes (entre cercles) peuvent être décrites par une β -diversité. Dans un groupe d'individus (carré en pointillé), une β -diversité totale (ici β_{Groupe1} ou β_{Groupe2}) permet de décrire le degré de différence qu'il existe intra-groupe. Ici, la β -diversité totale du groupe 1 semble inférieure à celle du groupe 2.

Cette approche 16S peut être utilisée sur n'importe quel échantillon microbien et est relativement facile à mettre en œuvre. Le nombre de séquences nécessaires pour mener une analyse étant relativement faible, cette technique est abordable en terme de coût. Néanmoins, l'approche 16S présente des biais de quantification du fait de la présence de plusieurs copies du gène 16S dans certaines espèces bactériennes, de la variabilité de séquence intra-espèce et des manques d'informations dans les bases d'assignation taxonomique pour de nombreuses bactéries. De plus, cette approche ne donne aucune information directe sur les autres gènes bactériens et sur leurs potentielles fonctions au niveau du microbiote [185].

2) Le séquençage du métagénome intestinal

L'approche métagénomique permet l'étude de l'ensemble des génomes des organismes constituant le microbiote intestinal et donc l'étude des fonctions potentiellement réalisées par ce microbiote sans biais de quantification majeur. Le métagénome de référence, ou catalogue de référence, est constitué d'une liste de gènes des organismes composant le microbiote étudié. Le premier métagénome de référence a été obtenu chez l'Homme en 2010. Depuis, d'autres catalogues ont été publiés pour des animaux modèles ou d'élevage : la souris en 2015 ou le porc en 2016 [184, 221–223]. Pour la poule, un premier métagénome de référence a été publié récemment en 2018 [224]. Un autre catalogue a été construit dans le cadre du projet INRAE METACHICK à partir d'un grand nombre d'individus d'origine et de génétique diverses comprenant des lignées expérimentales et commerciales [225]. Ces catalogues de référence permettent une étude plus rapide et complète du profil métagénomique et métatranscriptomique d'individus. Le séquençage complet d'un métagénome apporte beaucoup plus d'informations qu'un simple séquençage 16S. En effet, il apporte à la fois des informations sur la diversité du microbiote, sa composition (les bactéries mais également les virus, les archées et les champignons) et ses fonctions (les gènes). Cependant, la profondeur de séquençage étant beaucoup plus importante que celle utilisée en analyse 16S, les coûts de production des séquences sont bien plus élevés. Par ailleurs, les analyses bio-informatiques sont beaucoup plus complexes. Cette approche ne peut donc pas être encore utilisée en routine sur un grand nombre d'échantillons.

XI. Microbiote intestinal chez la poule et mécanismes de résistance à SE

1) Composition du microbiote intestinal chez la poule et facteurs de variation

De nombreuses études ont été menées pour caractériser le microbiote intestinal chez la poule ; tout d'abord par des techniques de culture classiques puis par des analyses de séquençage 16S [187, 192]. Malgré l'amélioration des outils d'analyse, des différences de composition entre études et même intra-études ont été reportées [200]. Il est en effet difficile de comparer des résultats entre études à cause de la diversité des méthodes employées : techniques d'échantillonnage, traitements des échantillons, analyses informatiques, choix du

niveau de description (classe ou genre bactériens) et à cause des différences de conditions relatives à l'expérimentation, notamment les conditions environnementales (nourriture, température, niveau sanitaire, traitement ...) et les spécificités des individus (sexe, âge, lignée, ...). L'âge semble être l'un des facteurs le plus important jouant sur la composition du microbiote : un individu adulte présente une composition et une diversité de microbiote très différente de celle d'un poussin [226]. Au-delà de ces difficultés de comparaison entre études, il existe également des difficultés de comparaison entre essais d'une même étude. En effet des répétitions expérimentales dans des conditions strictement identiques ne donnent pas forcément les mêmes résultats [227]. Ces différences seraient liées aux importantes mesures d'hygiène lors de l'éclosion, avec une séparation immédiate des œufs et de la mère : une exposition faible et aléatoire à différentes bactéries entre essais, provenant par exemple des boîtes de transport, de la première alimentation ou des personnes qui les manipulent, pourraient expliquer la colonisation intestinale des individus par un microbiote inhabituel [227]. Ainsi, une faible variation à l'éclosion pourrait avoir des conséquences importantes sur les résultats expérimentaux. Ces fortes variations individuelles entre essais et même intra-essai suggèrent l'utilisation d'un grand nombre d'individus afin d'obtenir des résultats représentatifs.

Une composition « type » du microbiote le long du tractus digestif de la poule a néanmoins été décrite chez la poule adulte [226, 228]. La partie proximale du tube digestif est largement dominée par les *Lactobacilli* puis la diversité augmente considérablement dans les caeca et le colon (Figure 26).

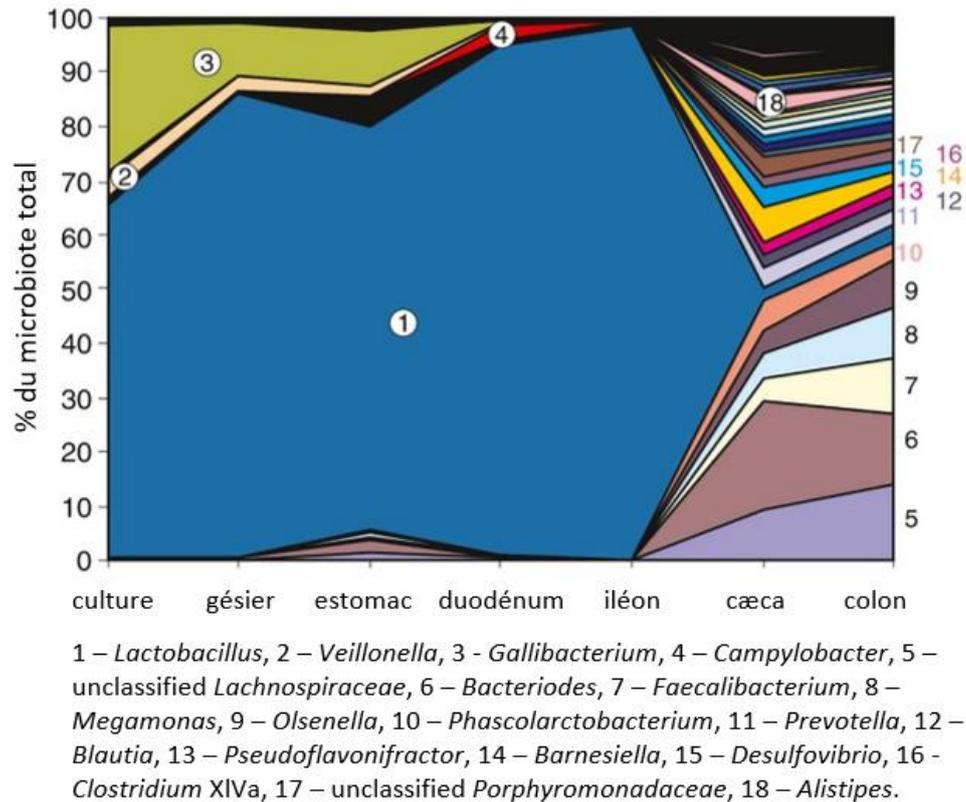


Figure 26 : Composition du microbiote le long du tractus digestif chez la poule adulte. Seuls les genres bactériens les plus fréquents ont été représentés [228].

Les bactéries dans les caeca sont très abondantes avec près de 10^{10} CFU par gramme de contenu caecal, et très diverses avec plus de 1000 espèces différentes [226]. Les deux principaux phyla chez l'adulte en bonne santé sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* [192] suivis par les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* [226]. Cette composition de base au niveau des phyla (*Firmicutes* et les *Bacteroidetes*) est similaire à celle des autres omnivores à sang chaud comme les Hommes ou les porcs du fait de la température constante de l'hôte entre 37 et 42°C [226]. Il est également vraisemblable que l'ancêtre commun des amniotes (reptile, oiseau et mammifère) présentait cette même dominance microbienne [187].

Facteurs de variations du microbiote intestinal chez la poule

La colonisation du tube digestif par les premières bactéries est déterminante dans l'établissement et dans le développement du microbiote intestinal. Selon certains auteurs, les micro-organismes peuvent être acquis avant même l'éclosion, directement dans l'oviducte de la mère [18, 229] ou bien dans l'environnement à travers les pores de la coquille de l'œuf [230]. L'environnement dans lequel les poussins vont naître est également déterminant [226].

Par exemple, des poussins élevés en présence d'un animal adulte auront une composition du microbiote caecal différente de celle d'individu élevé seul [231]. La diversité du microbiote va augmenter fortement dans les premières semaines après l'éclosion, tandis que les variations individuelles de composition diminueront avec l'âge [195, 200, 232]. Ainsi, l'âge et l'environnement ont un impact sur la composition du microbiote.

De nombreux autres facteurs tel que le sexe [233], la génétique [234–236], l'alimentation [237–239], le système d'élevage [240–242], la température [243, 244] ou l'utilisation d'antibiotique [228], ont un impact sur la composition et la diversité du microbiote (Figure 27). Des modifications, voire des altérations de ce microbiote par ces facteurs peuvent influencer la santé, le bien-être et les performances des individus [212].

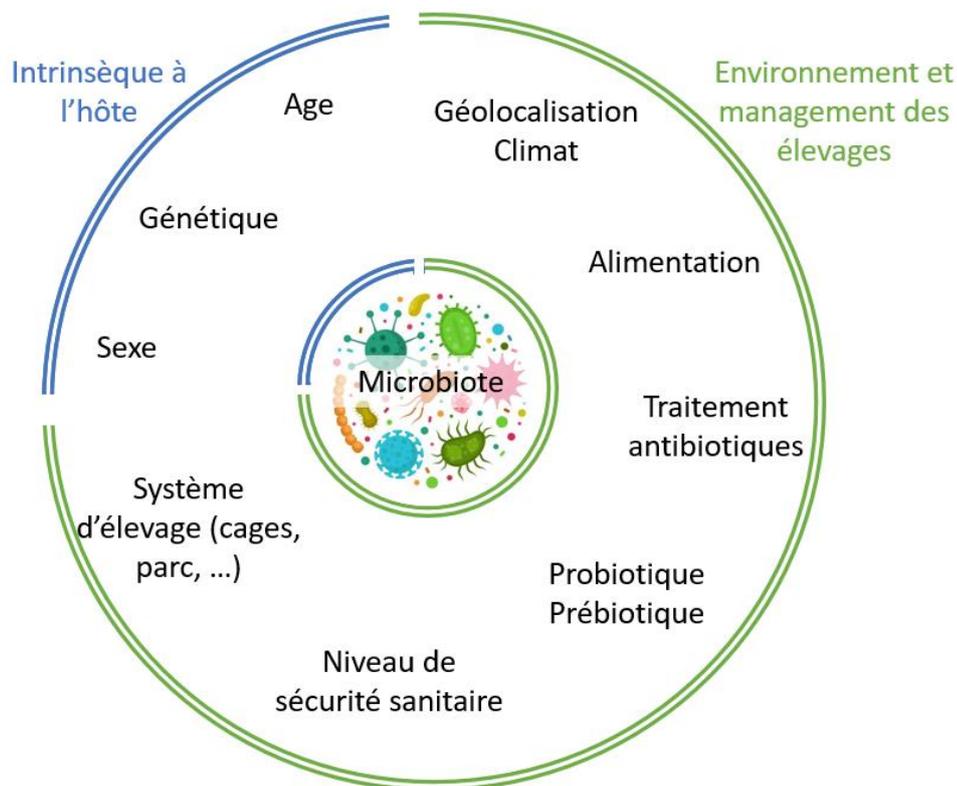


Figure 27 : Les facteurs intrinsèques à l'hôte et environnementaux pouvant influencer le microbiote et donc la santé, le bien-être et les performances des poules.

Impact d'une infection par SE sur la composition du microbiote chez la poule

Des études ont été menées afin d'identifier l'impact d'une infection par SE en comparant des animaux infectés et non-infectés à différents temps chez la poule. Plusieurs études ont montré que SE aurait un très faible impact sur la composition du microbiote caecal [245–248], même

si quelques différences d'abondance en taxa ont été identifiées entre individus infectés et non infectés [248, 249]. Ces faibles différences ne sont pas observées juste après l'infection mais plusieurs jours après soit environ une semaine [248, 249]. Selon Videnska *et al.*, ces changements mineurs devraient être compris comme une conséquence indirecte de l'infection et de l'inflammation [245].

Dans ces études, le facteur ayant l'impact le plus significatif sur la composition et la diversité du microbiote est l'âge. En effet, avec le temps, une augmentation importante de la diversité et l'apparition de nombreux taxa sont observés [245, 247–249]. Selon Juricova *et al.*, une infection chez de jeunes individus ayant un microbiote peu développé pourrait avoir des conséquences plus importantes sur la composition du microbiote qu'une infection chez des individus plus âgés [246]. Cette hypothèse n'a pourtant pas été validée dans l'étude de Videnska *et al.* [245]. Ainsi, une infection par SE n'aurait pas un impact significatif sur la composition et la diversité du microbiote chez la poule.

2) Impact du microbiote dans la résistance à SE chez la poule

Chez la poule, des études de la composition du microbiote intestinal ont permis de mettre en évidence l'impact du microbiote sur les capacités de résistance des individus à une infection par *S. Enteritidis* [250]. Ainsi, chez une lignée expérimentale de poule pondeuse, il a été démontré que la composition du microbiote avant infection détermine le phénotype faible ou fort porteur de *S. Enteritidis* après infection [251]. Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de ces observations : le phénomène d'exclusion compétitive, la production de métabolites antimicrobiens ou la capacité du microbiote à moduler le système immunitaire de l'hôte.

Exclusion compétitive

L'exclusion compétitive est la capacité des bactéries commensales (naturellement présentes dans le microbiote et non-pathogènes) à utiliser les ressources de l'habitat (espace et nutriments), empêchant les bactéries pathogènes de s'installer ou de se multiplier. Dans les élevages de production, l'environnement quasi-stérile dans lequel les jeunes poussins vont naître ne facilite pas le développement de leur microbiote intestinal (bactéries commensales), ce qui offrirait une niche écologique pouvant faciliter le développement d'un pathogène tel

que *Salmonella* [195]. Dès les années 1970, le phénomène d'exclusion compétitive a été démontré par le transfert de microbiote de l'adulte vers le jeune, augmentant la résistance de ces derniers à une infection par *S. Enteritidis* [226, 231, 250, 252, 253]. De plus, il a été montré également chez la souris que l'utilisation d'antibiotiques, détruisant une partie du microbiote intestinal et donc sa fonction d'exclusion compétitive, augmentait la colonisation intestinale par *Salmonella* [254, 255].

Certaines bactéries commensales comme *Lactobacillus salivarius* ou *Bacillus subtilis* ont été identifiées comme étant impliquées dans le phénomène d'exclusion compétitive contre *Salmonella* [256, 257]. Dernièrement, Litvak et ses collègues ont montré que la présence de bactéries commensales sporulées et des *Enterobacteriaceae* chez l'adulte protège contre *S. Enteritidis* du fait d'une compétition pour l'habitat et pour l'oxygène [258] (Figure 28). Néanmoins, les mécanismes d'exclusion compétitive et les bactéries qui en sont responsables sont encore mal connus.

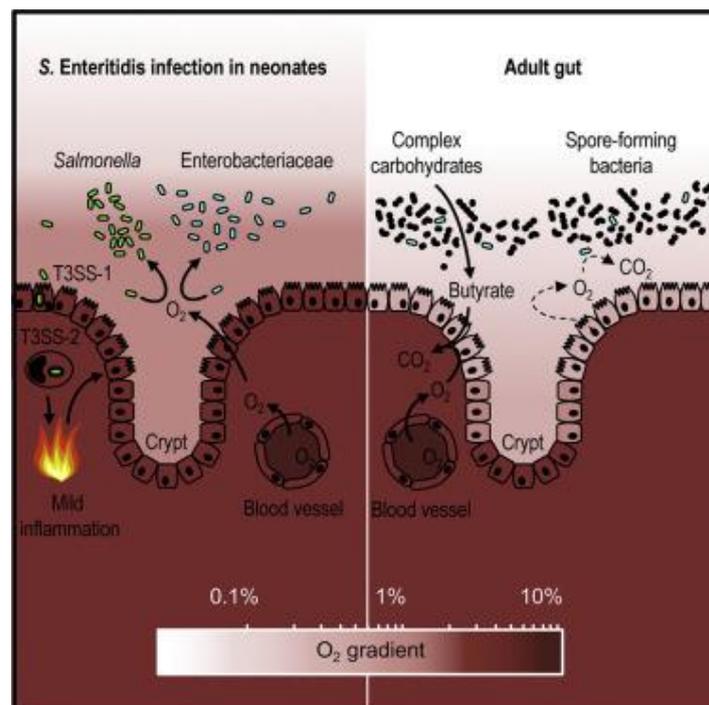


Figure 28 : Exemple de mécanismes d'exclusion compétitive pour l'habitat et l'oxygène par les bactéries commensales (bactéries sporulées et *Enterobacteriaceae*) du microbiote chez la poule adulte [258].

Production de métabolites antimicrobiens

L'acidification et la production de peptides antimicrobiens tels que les bactériocines ou les SCFAs comme l'acétate, le propionate ou le butyrate par les bactéries du microbiote intestinal pourraient avoir un effet sur la résistance à *S. Enteritidis* [226, 259]. Chez la souris, il a été montré qu'une infection par *Salmonella* diminuait la quantité de butyrate du fait d'une diminution de l'abondance de bactéries productrices telles que les *Clostridia* [260]. Chez la poule, une étude *in vitro* a montré une diminution de l'invasion de *S. Enteritidis* dans des cellules épithéliales avec des bactéries pré-incubées avec du propionate ou du butyrate [261].

Modulation du système immunitaire

Le microbiote intestinal participe au développement et au maintien d'un système immunitaire effectif [191], comme expliqué dans la partie IX-1, permettant une meilleure réponse à une infection par SE. Il a été montré chez la poule que l'induction de cytokines pro-inflammatoires par le microbiote intestinal dans les premiers jours après éclosion entraîne une activation et un maintien du système immunitaire inné modifiant la réponse immunitaire et la résistance à *S. Enteritidis* [195]. De plus, des études ont montré qu'une modification de la composition du microbiote intestinal, par exemple suite à l'utilisation de pré- ou pro-biotiques (cf. partie XI-3), pouvait modifier le système immunitaire menant à une meilleure réponse à une infection par SE [262–265].

3) La modulation du microbiote intestinal comme levier contre SE

Une modification du microbiote afin de favoriser les bactéries bénéfiques pour la résistance à *Salmonella* serait intéressante pour contribuer au contrôle des infections dans les élevages. L'utilisation de produits d'exclusion compétitive, de prébiotiques ou de probiotiques pouvant modifier le microbiote a déjà montré son efficacité dans la réponse à *S. Enteritidis* chez la poule. Même si les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore bien connus, il est admis que ces produits, en modifiant l'équilibre du microbiote intestinal, améliorent leurs fonctions d'exclusion compétitive, de production de métabolites antimicrobiens et de modulation du système immunitaire (Figure 29).

Produits d'exclusion compétitive

Les produits d'exclusion compétitive sont des cultures anaérobies de bactéries définies ou non-définies utilisées en élevage pour établir une protection intestinale contre des bactéries pathogènes, par la mise en place d'un microbiote intestinal ayant une fonction d'exclusion compétitive chez de jeunes individus [266]. De nombreuses études ont pu montrer l'efficacité de ces produits sur la réduction du portage de salmonelles dans les élevages [267, 268]. Des produits sont déjà commercialisés tels que aviguard, avifree ou Broilact [269–272]. Néanmoins, des différences d'efficacité pouvant aller de 0% à près de 90% de réduction de la colonisation peuvent être reportées en fonction des types d'élevage (poule pondeuse ou poulet de chair de consommation) et en fonction des pathogènes ciblés (*Salmonella* ou *Campylobacter*) [266]. Ces produits sont composés des mêmes types de bactéries que celles qui sont transférées lors du contact d'un adulte avec des jeunes individus, soit en plus des Lactobacillales et des Clostridiales : des Bacteroides, Megamonas, Megasphaera, Dialister, Phascolarctobacterium, Sutterella, Parasutterella, Bifidobacterium, etc [226, 231]. Néanmoins, la caractérisation incomplète de la composition et de la qualité de ces produits, ainsi que les risques de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques devront être résolus pour pouvoir continuer à utiliser ces produits sans danger [266]. L'utilisation de produits mieux définis comme les probiotiques ou les prébiotiques pourrait être une solution alternative.

Probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, le plus souvent des bactéries. Contrairement aux produits d'exclusion compétitive, les probiotiques sont composés d'un nombre limité de bactéries bien définies. Leur efficacité a également été montrée pour limiter la colonisation de *S. Enteritidis* dans les élevages et dans la modulation du système immunitaire de l'hôte. Par exemple, deux études ont montré respectivement que l'utilisation de *C. butyricum* ou de *P. pentosaceus* permet de limiter la colonisation de SE dans le foie, la rate et les caeca en modulant le système immunitaire de jeunes individus, *via* la régulation de l'expression de cytokines et de molécules pro-inflammatoires [273, 274]. D'autres probiotiques utilisant des bactéries pouvant produire des acides lactiques comme *Bacillus subtilis*, ont montré leurs efficacités sur la diminution du nombre de SE dans le contenu caecal mais également sur la diminution de l'excrétion dans les fientes, diminuant ainsi les risques

de re-contaminations entre individus [257, 275]. Cependant, des différences d'efficacité de ces bactéries lactiques ont été démontrées selon les études. Elles pourraient limiter la colonisation des salmonelles dans le foie et la rate, sans pour autant limiter leur multiplication dans les caeca, par des mécanismes d'atténuation des facteurs de virulence du pathogène [276]. Une autre étude testant le probiotique *Lactobacillus plantarum* ne montre pas de différence de colonisation de SE entre individus traités et non-traités, même si des modulations du système immunitaire sont identifiées [277]. Ainsi, les probiotiques limitent mais n'éliminent pas l'infection par SE et peuvent agir différemment en fonction des organes, en limitant la colonisation ou la multiplication des salmonelles. Il est important de remarquer que l'utilisation de probiotiques en une seule prise ne semble pas être une solution pérenne. En effet, les probiotiques couramment utilisés sont composés de Lactobacilli, d'Enterococci ou de Bacilli [226], or ces espèces, utilisées en culture pure, ne semblent pas pouvoir coloniser durablement le tractus des jeunes individus inoculés [278]. Une étude sur l'effet de *Bacillus subtilis* a montré qu'un traitement journalier avec le probiotique augmentait son efficacité d'en moyenne 34% contre SE (excrétion dans les fientes) comparé à une seule prise avant infection [279]. Il semblerait donc intéressant d'utiliser les probiotiques en tant que compléments alimentaires de manière journalière.

Prébiotiques

Les prébiotiques sont des additifs alimentaires pouvant être utilisés par certaines bactéries du microbiote intestinal. L'objectif est de favoriser le développement des « bonnes » bactéries, c'est-à-dire celles qui pourront avoir un effet d'exclusion compétitive ou qui pourront moduler favorablement le système immunitaire, augmentant ainsi la résistance de l'hôte contre des pathogènes tel que *Salmonella*. Par exemple, l'utilisation de prébiotiques tels que les galactooligosaccharides (GOS), les mannanoligosaccharides (MOS), les xylooligosaccharides (XOS), les petits peptides cationiques ou les composés comme le 2-nitroethanol (NE) ou le 2-nitropropanol (NP), a montré son efficacité dans la diminution de la charge bactérienne de *S. Enteritidis* et dans la modulation de l'expression de gènes de l'immunité [262–265]. Des études cherchent à identifier l'effet de ces composés sur la composition du microbiote caecal, afin de mieux comprendre les interactions entre microbiote, système immunitaire et performances des poules pondeuses [262, 280–282].

Finalement, l'utilisation de **synbiotiques**, produits contenant à la fois des probiotiques et des prébiotiques, semble être efficace à la fois pour protéger contre une infection par SE, et pour augmenter les performances des animaux [283, 284].

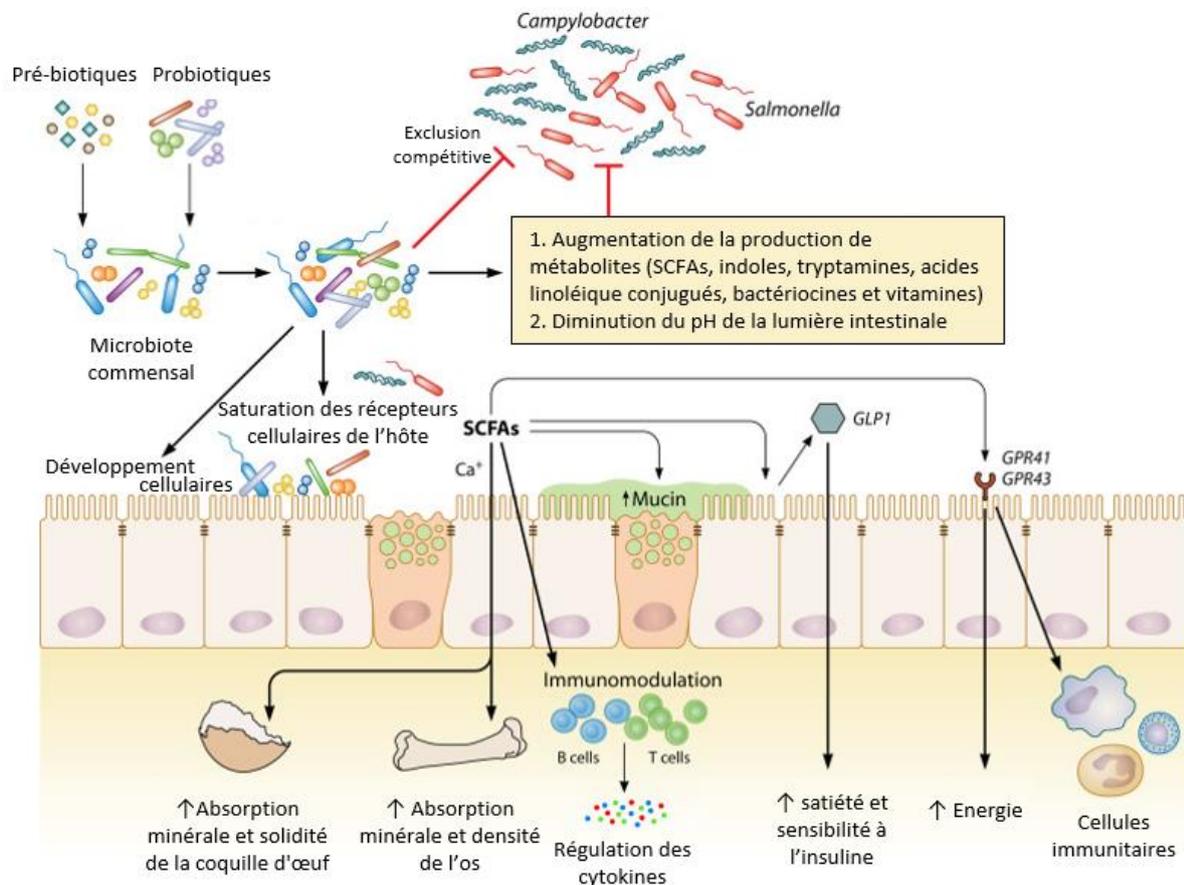


Figure 29 : Aperçu des mécanismes d'action des pro- et pré-biotiques. Traduit de [285].

XII. Le contrôle génétique de la composition du microbiote chez la poule

La composition du microbiote intestinal pouvant influencer la résistance à *Salmonella* chez la poule, il est intéressant d'étudier l'impact de la génétique de l'hôte sur cette composition. En comparant des lignées expérimentales ou des lignées commerciales, ou bien encore sur des croisements F2 entre ces lignées, des études ont été menées pour identifier dans quelle mesure la génétique pouvait avoir un impact sur le microbiote chez la poule (Tableau 5).

Lignées/Souches	Performances étudiées	Résultats génétique-microbiote	Références
Deux lignées - X - Y	Différences de réponse à l'infection par des pathogènes	Différences de composition de microbiote du contenu jéjunal entre les deux lignées à 0, 4 et 16 jours d'âge	[234]
Deux souches indiennes - Aseel - Kadaknath Deux lignées commerciales - Cobb 400 - Ross 308	Pas de performances associées	Impact significatif du fond génétique sur la composition du microbiote caecal à 42 jours d'âge	[236]
Trois souches commerciales: - Cobb 500 - Hubbard JA87 - Ross 308	Pas de performances associées	Différences significatives de la composition du microbiote caecal à 42 jours d'âge	[235]
Deux lignées expérimentales: - N - 6 ₁	Résistance à <i>Campylobacter jejuni</i>	Différences d'abondance de certains OTUs entre les deux lignées mais pas de différence significative sur l'ensemble du microbiote caecal à 3 semaines d'âge	[124]
Deux lignées : - UCD077 - UCD254	Résistance à <i>S. Enteritidis</i>	Peu d'impact de la génétique sur l'établissement du microbiote caecal	[249]
Deux lignées : - LW - HW	Poids de carcasse	Impact de la génétique sur la composition du microbiote fécal à 245 jours d'âge. Calcul de valeurs d'héritabilité pour des familles de bactéries	[286] [287]
Deux lignées commerciales - MP - HY Une race canadienne - ACR	Poids de carcasse et BWG (body weight gain)	Impact de la génétique sur la composition du microbiote du contenu iléal de 4 jour à 35 jours d'âge	[288]
Population F2 entre : - Chinese yellow broiler line (TC élevé) - Huiyang Beard chickens (TC faible)	Taux de croissance (TC)	Différences de microbiote fécal entre des individus TC élevé et TC faible à 91 jours. Identification de SNPs associés à la diversité du microbiote et à l'abondance de certaines bactéries	[289]
Population F2 entre : - D + (ED élevé) - D - (ED faible)	Efficacité digestive (ED)	Différences d'abondance de certaines bactéries caecales entre des individus ED élevé et ED faible à 3 semaines d'âge. Calcul d'héritabilité et identification de QTLs associés à l'abondance de certaines bactéries	[290]
Deux lignées - A (faible BWG) - B (fort BWG)	Efficacité alimentaire (EA) et BWG (body weight gain)	Impact de la génétique sur la composition du microbiote fécal de 1 jours à 114 jours.	[291]
Deux lignées - Forte HFP - Faible HFP	Piquetage des plumes (HFP)	Différence de diversité et de composition du microbiote entre lignées à 60 semaines d'âge	[292]

Tableau 5 : Articles scientifiques ayant étudié l'impact de la génétique sur la composition du microbiote chez la poule.

Dans la majorité des études, des différences significatives de composition du microbiote (caecal, iléal ou fécal) et/ou de taxa différentiellement abondants ont été identifiées entre lignées. Ces différences de microbiote et ces taxa pouvant être associées à des différences de performances des individus.

L'abondance des taxa dans un microbiote intestinal peut être considérée comme un caractère quantitatif dans des études génétiques. Les études menées sur les populations F2 ont permis de calculer des valeurs d'héritabilité modérées (environ 0,2) pour certains taxa, montrant qu'une sélection génétique des animaux sur la composition de leur microbiote est théoriquement possible [290]. L'identification de QTLs contrôlant l'abondance de ces taxa confirme l'existence d'un contrôle génétique de la composition du microbiote [289, 290]. Ces calculs d'héritabilité et l'identification de QTLs et de gènes candidats ont été menés également chez l'Homme et la souris [293–295], ainsi que dans différentes espèces d'élevage en dehors de la poule. La composition du microbiote intestinal reste néanmoins un caractère polygénique très complexe, fortement influencé par de nombreux facteurs environnementaux [296].

Récemment, l'utilisation de nouveaux modèles « souris » expérimentaux comme les souris du Collaborative Cross permettent de mieux comprendre les interactions entre microbiote, génétique de l'hôte et caractère d'intérêt. En effet, l'abondance de bactéries intestinales, sous le contrôle génétique de l'hôte, a été par exemple associée au sommeil [297], à la toxicité de molécules cancérigènes [298] ou à l'anxiété [299].

OBJECTIFS DE LA THESE, MATERIEL ET METHODES

I. Objectifs de la thèse

Premier objectif

Le premier objectif de cette thèse est l'étude de l'impact de la génétique de l'hôte sur la réponse à une infection par *Salmonella* Enteritidis (SE). Pour cela, nous utiliserons deux modèles : le modèle « souris » et le modèle « poulet ». Le modèle « souris » sera utilisé pour l'étude de l'impact de la génétique sur le portage chronique de SE (22 jours après infection). Nous utiliserons de jeunes adultes (7-12 semaines) issus des populations génétiques murines de référence : les lignées CC et les souris DO. La structure génétique de ces populations permettra d'effectuer la cartographie génétique de QTL et d'identifier des gènes candidats. Le modèle « poulet » sera utilisé pour l'étude de l'impact de la lignée génétique sur la résistance de jeunes individus à une infection par SE (12 jours après infection). Nous utiliserons de jeunes individus (7 jours d'âge) issus des lignées N (résistante) et 6₁ (sensible). Une étude de l'expression des gènes dans les tonsilles caecales de ces deux lignées sera réalisée pour identifier des gènes candidats associés à la résistance à SE.

Deuxième objectif

Le deuxième objectif de cette thèse est l'étude de l'impact du microbiote intestinal sur la résistance à une infection par *Salmonella* Enteritidis. Pour cela, nous utiliserons le modèle « poulet », et les lignées N et 6₁. L'objectif est d'identifier si des différences de composition du microbiote (caecal ou fécal) pourraient être associées à des différences de portage de SE dans ces deux lignées.

Troisième objectif

Le troisième objectif est l'étude de l'impact de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote. Pour cela, nous utiliserons le modèle « poulet » et les lignées N et 6₁. L'objectif est d'identifier si des différences de composition du microbiote (caecal ou fécal) entre les deux lignées expérimentales existent.

En conclusion, la comparaison des architectures génétiques et des composantes microbiennes chez la Poule et la Souris nous conduira à une meilleure compréhension des mécanismes en jeu dans le contrôle de la colonisation et de la persistance de *S. Enteritidis*. A partir de ces résultats, des perspectives d'applications dans les élevages de poules pourront être discutées.

II. Matériel et méthodes

Dans cette partie, nous allons décrire rapidement les expérimentations animales menées, les méthodes d'analyse expérimentale des échantillons et les méthodes de bio-statistique et de bio-informatique employées pour l'analyse des données. Pour plus de détails sur ces méthodes, se référer aux parties « Methods » des articles scientifiques de la partie Résultats.

1) Le modèle « poulet »

Un résumé schématique du matériel et des méthodes employées pour le modèle « poulet » est représenté par la Figure 30.

Design expérimental et échantillonnages

Les études ont été menées sur deux lignées expérimentales consanguines de White Leghorn : la **lignée 6₁**, sensible au portage de SE et la **lignée N**, résistante au portage de SE. Deux expérimentations identiques ont été conduites successivement en janvier et en février 2017 au centre INRAE de Nouzilly pour un total de **240 animaux**. Pour chaque expérimentation, 120 individus de chaque lignée comprenant des mâles et des femelles ont éclos puis ont été élevés ensemble au sol avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Sept jours après éclosion, ils ont été infectés par la souche LA5 de SE avec 5.10⁴ UFC/0.2mL/individu [300] et ont été directement transférés dans quatre isolateurs, deux par lignée, avec 30 individus par isolateur. Les animaux ont été euthanasiés au CO₂, 12 jours après infection (J19). Pour les 240 individus, des échantillons de fientes ont été prélevés 1 jour avant infection (J6) et 7 jours après infection (J14) et ont été congelés et conservés à -80°C. Des échantillons de contenu caecal et de tonsilles caecales ont été prélevés le jour de l'euthanasie (J19) et ont été congelés et conservés à -80°C. Un prélèvement de sang a été effectué et conservé à -20°C.

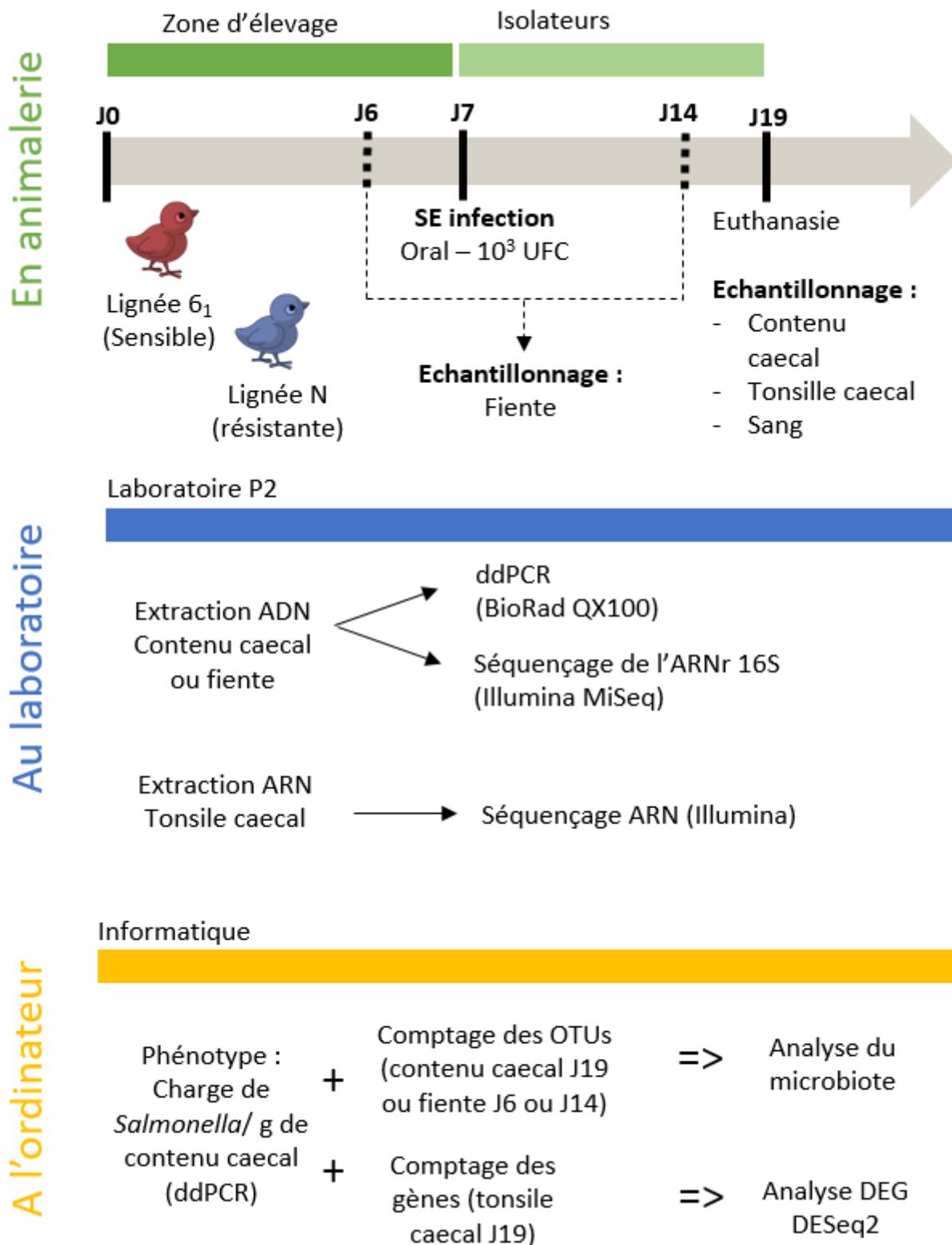


Figure 30 : Schéma récapitulatif des méthodes employées pour le modèle « poulet ».

Analyses des échantillons

Des extractions d'ADN ont été réalisées sur l'ensemble des **240 échantillons de contenu caecal**. Ces ADN ont servi à la quantification des salmonelles par ddPCR (*droplet digital PCR*) du gène *InvA* spécifique à *Salmonella* Enteritidis et au séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S (Illumina MiSeq) pour l'étude du microbiote caecal.

Des extractions d'ADN ont également été réalisées sur **96 échantillons de fientes** (48 à J6 et 48 à J14), sélectionnés en fonction de la quantité de salmonelles dans le contenu caecal des individus à J19 (faibles ou forts porteurs de salmonelles). Le choix a été fait en équilibrant les facteurs expérimentaux : lignée, sexe, isolateurs, expérimentation et date de prélèvement (J6 ou J14) pour pouvoir mener des analyses statistiques. Ces ADN ont servi à la quantification des salmonelles par ddPCR à J14 pour le gène *InvA* spécifique à *Salmonella* Enteritidis et au séquençage des ARN ribosomique 16S (Illumina MiSeq) pour l'étude du microbiote caecal.

Des extractions d'ARN ont été réalisées sur **48 échantillons** de tonsilles caecales, sélectionnés en fonction de la quantité de salmonelles dans le contenu caecal des individus (faibles ou forts porteurs de salmonelles). Le choix a été fait en équilibrant les facteurs expérimentaux : lignée, sexe, isolateurs et expérimentation pour pouvoir mener des analyses statistiques. Ces ARNs ont été rétro-transcrit en cDNA et séquencés (Illumina) pour l'étude de l'expression des gènes dans les tonsilles caecales.

Analyses bio-informatiques et bio-statistiques

Les résultats de ddPCR ont permis de calculer le nombre de salmonelles par gramme de contenu caecal (J19). Les données ont été transformées en log₁₀ et une analyse de la variance (ANOVA) de type II (hétéroscédasticité ; non homogénéité des variances) a été menée pour étudier l'impact des facteurs expérimentaux (lignée, sexe, isolateurs et expérimentation). Les analyses ont été menées sous R (version 3.5.1).

L'identification des OTUs (*Operational Taxonomic Units*) et l'élaboration des tables d'abondance à partir des séquences 16S des contenus caecaux (J19) ou des fientes (J6 et J14) ont été réalisées avec le pipeline **FROGS** (*Find Rapidly OTU with Galaxy Solution*) et la base de données **SILVA**. Les analyses statistiques ont été menées sous R en utilisant les packages **phyloseq** (1.24.2) et **vegan** (2.5-3) pour les analyses de diversité (alpha- et beta-) et pour la normalisation des données. Une analyse de la variance (ANOVA) a été menée pour étudier

l'impact des facteurs expérimentaux (lignée, sexe, isolateurs et expérimentation). Le package **metagenomeSeq** (1.24.1) a été utilisé pour identifier les OTUs différemment abondants entre les lignées N et 6₁ et entre les faibles et forts porteurs de salmonelles intra-lignées. Enfin, le package **PICRUST2** (2.2.0-b) a été utilisé pour prédire les fonctions et voie de signalisation à partir des tables d'abondance et de la base de données MetaCyc, et le package **DESeq2** (1.26.0) a été utilisé pour identifier les fonctions différemment abondantes entre lignées N et 6₁ et entre faibles et forts porteurs intra-lignée (Figure 31).

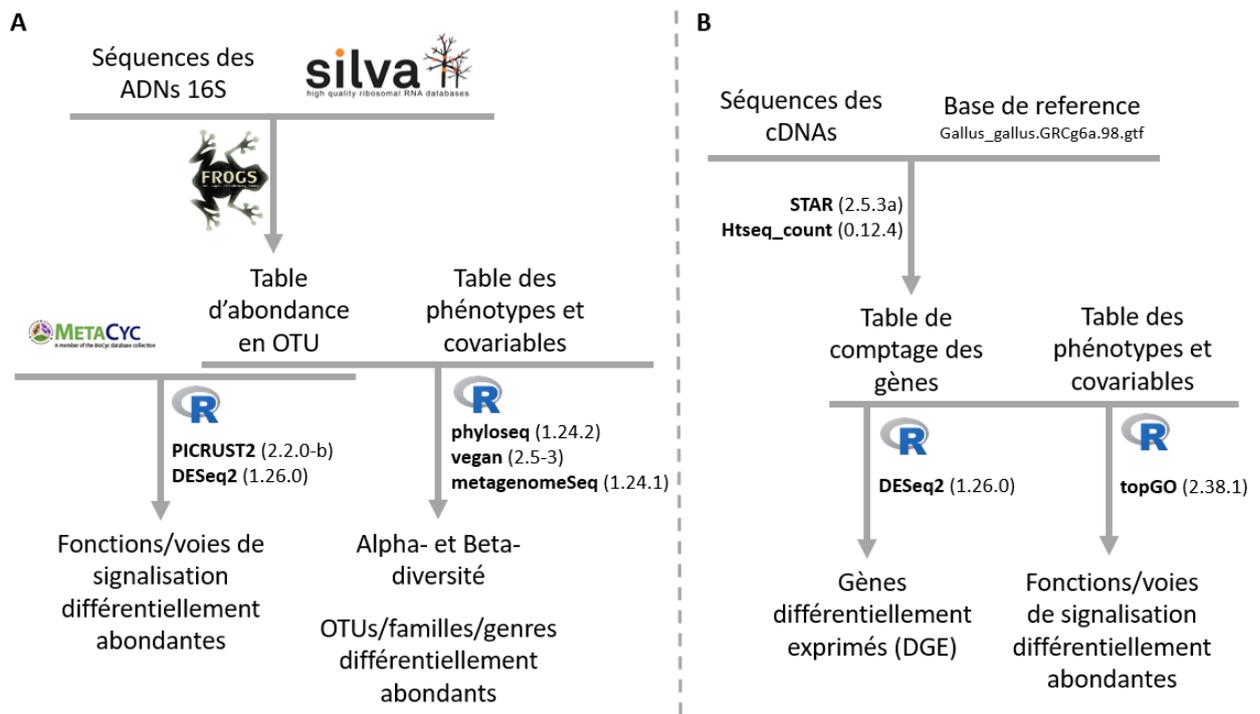


Figure 31 : Etapes des analyses réalisées pour l'étude du microbiote (A) et pour l'étude de l'expression des gènes (B) pour le modèle « poulet ».

L'identification des gènes et l'élaboration de la table de comptage à partir des résultats de séquençage des ARNs des tonsilles caecales (J19) ont été réalisés avec **STAR** (2.5.3a), la base de référence **Gallus_gallus.GRCg6a.98.gtf** et **htseq-count** (0.12.4). Les analyses statistiques ont été menées sous R en utilisant le package **DESeq2** pour identifier les gènes différemment exprimés entre lignées et entre faibles et forts porteurs intra-lignée. Une analyse de la variance (ANOVA) a été menée pour étudier l'impact des facteurs expérimentaux (lignée, sexe, isolateurs et expérimentation). Enfin, une analyse d'enrichissement sur les gènes différemment exprimés a été réalisée avec le package **topGO** (2.38.1) (Figure 31).

2) Le modèle « souris »

Un résumé schématique du matériel et des méthodes employées dans le modèle souris est représenté dans la Figure 32.

Design expérimental et échantillonnages

Les études ont été menées sur deux populations de souris : le **CC** et le **DO**. Avant infection, les souris ont été élevées en cage (2-7 souris) dans une animalerie SPF (*specific-pathogen-free*) de l'institut Pasteur à Paris avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Après 7 à 11 semaines (obtention d'un système immunitaire mature), les souris ont été transférées dans une animalerie A2 et ont été infectées par la souche LA5 de SE avec 10^3 UFC/0.2mL/souris [300]. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale 22 jours après infection. Au total, **208 souris** issus de 35 lignées du CC comprenant des mâles et des femelles et **192 femelles du DO** ont été prises en compte dans l'étude. Des échantillons de foie et de rate ont été prélevés le jour de l'euthanasie, placés dans 2mL de PBS 1X et analysés le jour même. Des échantillons de queue ont été prélevés et congelés à -20°C .

Analyses des échantillons

L'ensemble des échantillons de foie et de rate des CC ou des DO ont été broyés (Ultra-Turrax T25), dilués dans du PBS 1X et étalés sur boîte TSA (*Trypticase Soy Broth*) pour le comptage du nombre d'UFC 24h après incubation à 37°C . L'ADN de chaque souris DO a été extrait à partir de biopsies caudales et utilisé pour les génotyper avec la puce à ADN MUGA (*Mouse Universal Genotyping Array*) chez un prestataire de service (Neogen/Geneseek, Lincoln, NE, USA).

Analyses bio-informatiques et bio-statistiques

Les comptages d'UFC sur boîte TSA ont permis de calculer le nombre de salmonelles par gramme d'organe (foie ou rate). Les données ont été transformées en \log_{10} et une analyse de la variance (ANOVA) de type I a été utilisée afin d'identifier les facteurs expérimentaux (lignée, sexe, âge, expérimentation) ayant un effet sur le phénotype. Un test de Pearson a permis de déterminer la présence ou l'absence de corrélation entre les charges bactériennes dans le foie et les charges dans la rate. Les analyses ont été menées sous R (version 3.5.1).

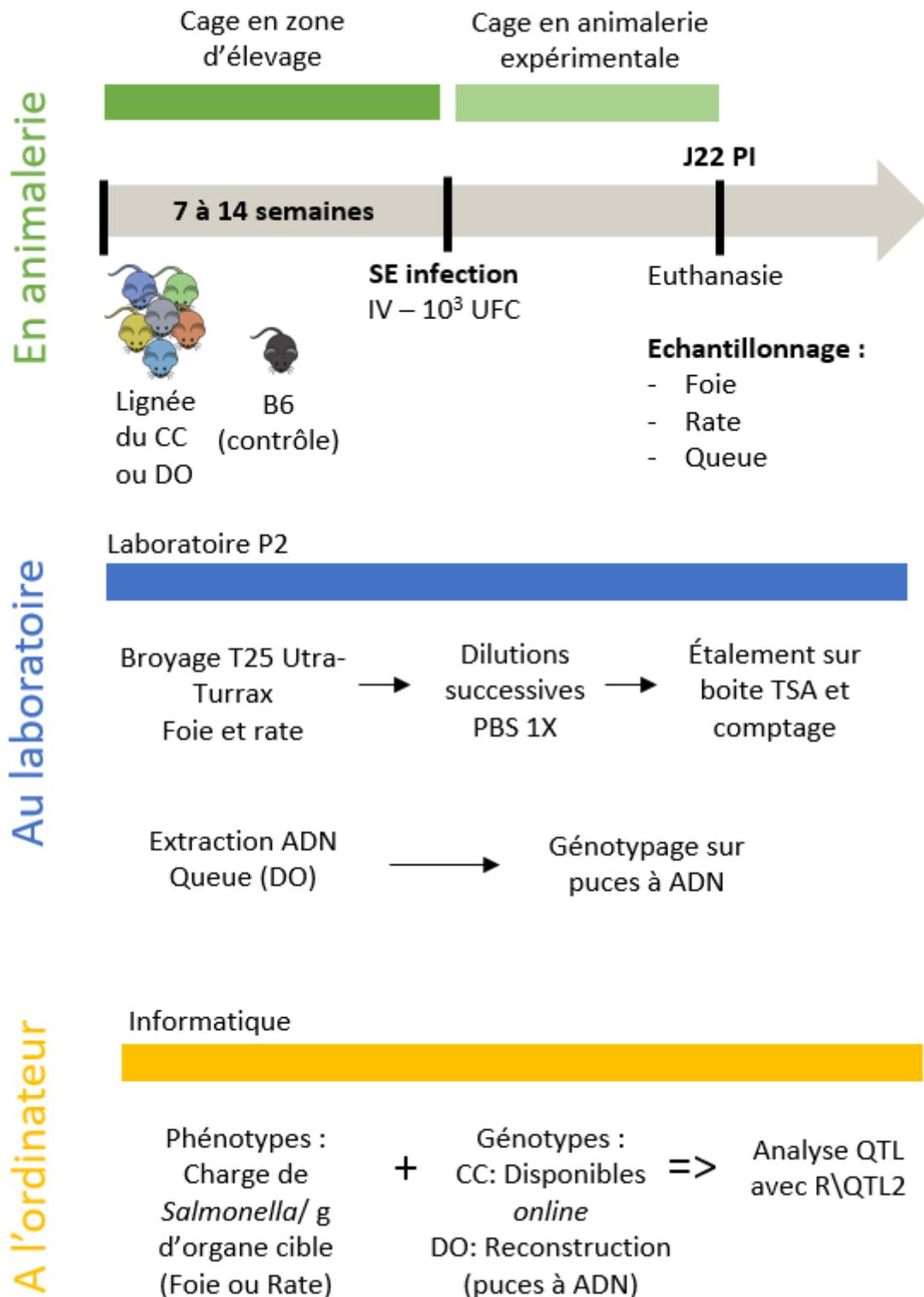


Figure 32 : Schéma récapitulatif des méthodes employées dans le modèle « souris ».

Les analyses de recherche de QTLs ont été réalisées avec le package **R/QTL2** version 0.24 (Figure 33) avec un modèle linéaire mixte (LMM) comportant une matrice de parenté (kinship matrix) afin de prendre en compte les effets de structure des populations. Les seuils de significativité ont été calculés par des tests de permutation. Les contributions des allèles des lignées parentales ont été déterminées à l'aide d'un modèle additif. L'identification des gènes et mécanismes associés, sous les QTLs identifiés, a été réalisée à l'aide des logiciels en ligne MGI et MouseMine (<http://www.informatics.jax.org/marker>).

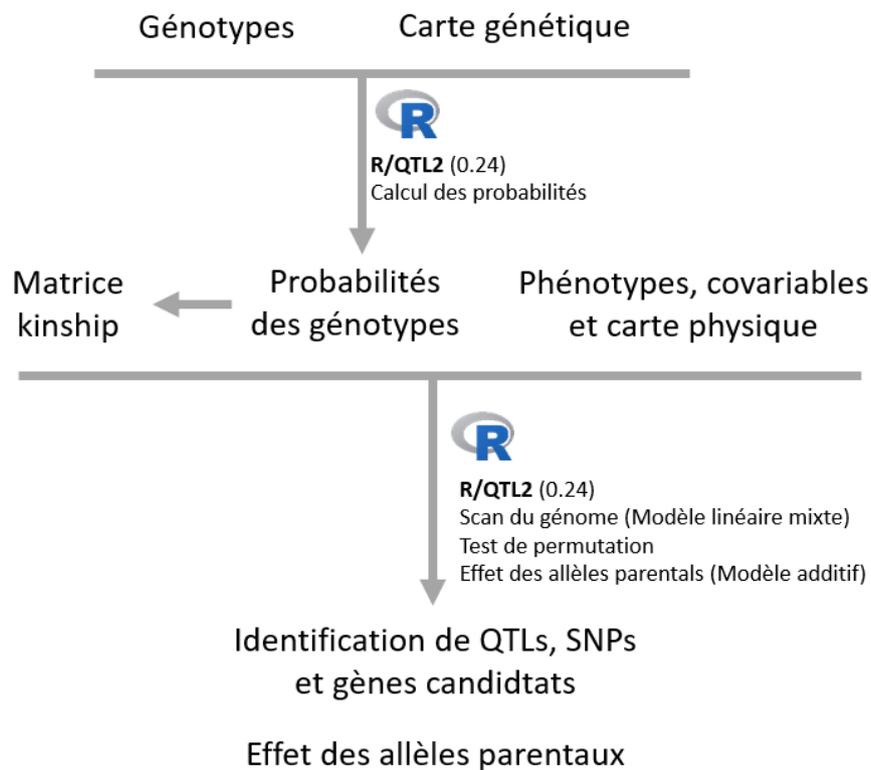


Figure 33 : Etapes des analyses de détection de QTLs avec R/QTL2 dans le modèle « souris ».

RESULTATS

I. Article 1 : Impact de la lignée génétique sur la composition du microbiote et le portage de *Salmonella* Enteritidis chez la poule

Cette première étude a été menée à l'INRAE sur le modèle « poulet ». Au total, 240 individus issus de deux lignées expérimentales de White Leghorn : la lignée N et la lignée 6₁ ont été infectés par SE selon un nouveau modèle d'infection en isolateur. Pour chaque individu, une extraction d'ADN sur contenu caecal à J19, soit 12 jours après l'infection, a été utilisée pour l'analyse 16S du microbiote et le comptage des salmonelles par ddPCR. Les objectifs de cette étude sont :

- De comparer le portage de salmonelles et la composition du microbiote caecal entre les deux lignées expérimentales, afin d'évaluer l'existence d'un potentiel contrôle génétique de ces deux paramètres ;
- D'évaluer la variabilité individuelle, au sein d'une même lignée, du portage de salmonelles et de la composition du microbiote caecal ;
- D'identifier les bactéries et les voies métaboliques potentiellement associées à la résistance ou à la sensibilité à SE.

Les résultats ont montré que dans ce modèle d'infection en isolateur, la lignée N était en moyenne plus résistante à *Salmonella* que la lignée 6₁, et que la variabilité intra-lignée était plus élevée pour la lignée 6₁. De plus, l'analyse 16S a montré une forte différence de composition du microbiote caecal entre les deux lignées. Sur les 617 unités taxonomiques opérationnelles (OTU) identifiées, plus de 390 étaient différenciellement abondantes entre les deux lignées. De plus, au sein de la lignée 6₁, nous avons identifié une différence dans la composition du microbiote entre les faibles et les forts porteurs de *Salmonella*, avec 39 OTUs différenciellement abondantes. Enfin, la prédiction fonctionnelle du métagénome, basée sur les données 16S, a permis d'identifier plusieurs voies de signalisation potentiellement associées à la résistance ou à la sensibilité à SE. Globalement, cette étude démontre que la composition du microbiote caecal des lignées N et 6₁ diffère, ce qui est probablement dû aux différences génétiques entre ces lignées. Cela pourrait être l'une des raisons pour lesquelles ces lignées présentent des niveaux de portage de *Salmonella* différents dans ces conditions expérimentales.

Cette première étude a fait l'objet d'un article scientifique en cours de soumission au journal scientifique Genetics Selection Evolution (GSE).

1 Impact of the genetic line on caecal microbiota composition and on 2 *Salmonella* carriage in experimentally infected chickens

3 Authors:

4 Anaïs CAZALS^{1,2}, Jordi ESTELLÉ¹, Nicolas BRUNEAU¹, Jean-Luc COVILLE¹, Pierrette MENANTEAU³, Marie-
5 Noëlle ROSSIGNOL¹, Deborah JARDET¹, Claudia BEVILACQUA¹, Andrea RAU¹, Bertrand BED'HOM¹,
6 Philippe VELGE³, Fanny CALENGE^{1*}

7 Institutions:

8 ¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

9 ² Mouse Genetics Laboratory, Department of Genomes and Genetics, Institut Pasteur, Paris, France

10 ³ Université François Rabelais de Tours, INRAE, UMR ISP, 37380, Nouzilly, France

11

12 *Corresponding Author:

13 Fanny Calenge: fanny.calenge@inrae.fr

14

15 ABSTRACT

16 *Salmonella* Enteritidis (SE) is one of the major causes of human foodborne intoxication through the
17 consumption of contaminated poultry products. Genetic selection of animals more resistant to
18 *Salmonella* carriage and the modulation of gut microbiota are two promising ways of decreasing
19 individual *Salmonella* carriage. This study aims to identify the main genetic and microbial factors
20 controlling the individual levels of *Salmonella* carriage in chickens (*Gallus gallus*) in controlled
21 experimental conditions. Two-hundred and forty animals from the White Leghorn inbred lines N and
22 6₁ were infected by SE at 7 days of age. After infection, animals were kept in isolators to reduce the
23 recontamination of birds by *Salmonella*. Caecal contents were sampled at 12 days post-infection and
24 used for DNA extraction. Microbiota DNA was used to measure individual counts of SE by digital PCR
25 and to determine the bacterial taxonomic composition through a 16S rRNA gene high-throughput
26 sequencing approach. Results confirmed that the N line is more resistant to *Salmonella* carriage than
27 the 6₁ line, and that intra-line variability is higher for the 6₁ line. Furthermore, the 16S analysis showed
28 strong significant differences in microbiota taxonomic composition between the two lines. Out of 617
29 Operational Taxonomic Units (OTUs), over 390 were differentially abundant between the two lines.
30 Furthermore, within the 6₁ line, we found a difference in the microbiota taxonomic composition

31 between high and low *Salmonella* carriers, with 39 differentially abundant OTUs. Finally, via
32 metagenome functional prediction based on 16S data, we identified several metabolic pathways
33 potentially associated to microbiota taxonomic differences (*e.g.* SCFA pathways) between high and
34 low carriers. Overall, this study demonstrates that the caecal microbiota composition of the N and 6₁
35 lines differs, which is probably due to genetic differences between these lines. This could be one of the
36 reasons why these lines harbour different *Salmonella* carriage levels in experimental infection
37 conditions.

38 **BACKGROUND**

39 Reducing *Salmonella* carriage in chicken flocks is a challenge to ensure human food safety and enhance
40 breeding viability. The consumption of contaminated raw poultry products can indeed cause human
41 food intoxications. The reported number of human salmonellosis outbreak cases due to the
42 consumption of contaminated chicken meat and eggs in Europe was over 4,000 from 2014 to 2016,
43 with more than 93% due to the Enteritidis serovar (EFSA Journal, 2019). Control of hygiene, detection
44 of several serovars of *Salmonella* and culling of contaminated flocks or vaccination in farms aim to
45 decrease this number. Nevertheless, the economic impact of human salmonellosis remains estimated
46 at approximately 3 billion euros a year (EFSA Journal, 2019). Developing new strategies to improve the
47 control of *Salmonella* propagation in poultry livestock is therefore essential to respond to this
48 challenge.

49 In adult chickens, *Salmonella enterica* Enteritidis (SE) does not induce symptoms and can stay in the
50 organism for a long time [1]. Carrier animals excrete the bacteria in the environment, thus increasing
51 the bacteria propagation and facilitating the contamination of all animals. Previous studies identified
52 several quantitative trait loci (QTL) associated with *Salmonella* carriage in the White Leghorn inbred
53 lines N and 6₁ [2–4], showing the contribution of host genetic variations in the resistance to *Salmonella*
54 carriage. However, the effects associated with the identified loci are weak, which does not allow a
55 direct application in commercial lines by marker-assisted selection of more resistant animals. The weak
56 effects of these loci might also be to the consequence of a biased estimation of individual *Salmonella*
57 carriage, due to the recurrent recontamination of birds by *Salmonella* excreted by other birds within
58 the timeframe of experimental infections. This recontamination probably leads to a homogenization
59 of *Salmonella* carriage in chicken flocks. The use of isolators, strongly reducing this recontamination,
60 actually led to a much increased individual variation among birds in the experimental White Leghorn
61 line PA12 [1], allowing the description of three categories of birds according to their shedding: super-

62 , intermediate- and low-shedders. These isolators allow a control of the air purity and limit faecal-oral
63 recontaminations between birds by the use of grids on the floor and decontamination of faecal drops.

64 In addition to the effect of host genetic variations, many studies demonstrate the importance of the
65 gut microbiota for host health, in poultry as well as in every livestock species and in human. In human,
66 disruptions of the intestinal microbiota can lead to many kinds of diseases by altering the host
67 physiology and metabolism and triggering inflammation [5]. It is now very clear that the host and its
68 intestinal microbiota both contribute to the expression of many phenotypic traits of interest in
69 livestock species [6]. In chicken, it is also well established that intestinal health is the result of complex
70 functional interactions between intestinal microbes and host immunity [7]. In particular, the adult gut
71 microbiota in chicken has been consistently identified as a protective factor to prevent the colonisation
72 of intestines of young chicks by *Salmonella* sp. through a mechanism called competitive exclusion [8–
73 10]. Although the primary site of *Salmonella* invasion in the host is the small intestine, the caecal
74 microbiota plays a key role on susceptibility to SE caecal colonization and on *Salmonella* shedding. Its
75 composition before SE infection determines the *Salmonella* super- or low-shedder phenotype in the
76 chicken lines N and 6₁ [11]. The spraying of an adult microbiota on young chicks or the use of probiotics
77 are already efficiently used in commercial flocks to reduce the *Salmonella* Enteritidis load [12–15].
78 Many studies have also assessed the efficiency of nutritional strategies aiming at reducing the
79 *Salmonella* Enteritidis load by a modulation of the intestinal microbiota leading to an improvement of
80 the host immunity [16–19]. Such strategies include prebiotics or probiotics boosting the production of
81 beneficial metabolites, the modulation of host immunity, and the improvement of intestinal barrier
82 function [20]. To understand the underlying biological mechanisms of such strategies, and to identify
83 the bacterial taxa actually competing with *Salmonella*, it is important to analyse the impact of
84 *Salmonella* infection on the host microbiota composition. Comparing infected and non-infected
85 animals, some studies sought to identify OTU signatures of *Salmonella* infection. For example in pigs,
86 Argüello et al. identified bacteria from the class *Clostridia* that could prevent *Salmonella* Typhimurium
87 colonisation [21]. In chicken, the family *Ruminococcaceae*, which are more abundant in non-infected
88 animals at 4 days post infection (dpi), could be a signature of *Salmonella* infection [22].

89 Overall, both host genetic variations and intestinal microbiota composition could explain variations in
90 individual *Salmonella* Enteritidis carriage in chicken. Furthermore, they may interact. Genetic studies
91 on other phenotypic traits, such as digestive efficiency [23], body weight [24] or feather-pecking in
92 laying hens [25] showed that host genetic variations influence the intestinal microbiota composition
93 in chicken. In these studies, authors identified several QTLs and single nucleotide polymorphisms
94 (SNPs) associated with specific bacterial species that may explain the phenotype and calculated
95 heritabilities of these bacteria abundances.

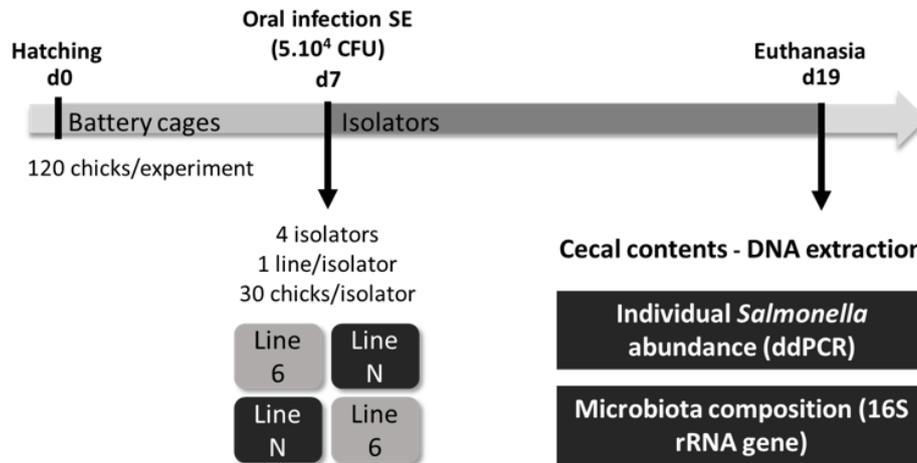
96 In this study, we investigated the combined influence of host genetic variations and gut microbiota
97 composition on caecal *Salmonella* Enteritidis (SE) load. Using the chicken N and 6₁ inbred lines, we
98 studied the impact of genetics on both the *Salmonella* carriage and microbiota composition at the
99 individual level, using the isolator model, which highly decreases the exchanges of gut microbiota
100 between animals [1]. We infected 240 animals with *Salmonella* Enteritidis at 7 days post hatching. We
101 collected caecal contents at 12 dpi to assess both individual microbiota taxonomic composition and SE
102 counts. Our aims were:

- 103 (i) To assess the intra-line individual variability of *Salmonella* load and of the caecal
104 microbiota composition;
- 105 (ii) To compare *Salmonella* load and caecal microbiota composition of the two lines, in order
106 to assess the existence of a genetic control of these two parameters;
- 107 (iii) To identify putative microbial signatures of low/high *Salmonella* carriage within and/or
108 between lines.

109 **METHODS**

110 **Experimental design**

111 Two experiments were conducted one month apart (january and february 2017), with a total of 240
112 animals of the White Leghorn inbred lines N and 6₁ (both males and females, with an equal
113 distribution). For each experiment (Figure 1), chicks from both lines (n=120; 60 animals from each line)
114 hatched together with free access to feed (Composition in additional file 1) and water at the
115 experimental unit PEAT (Pole d'Expérimentation Avicole de Tours, Nouzilly, France). They were
116 immediately transferred to the PFIE unit (Plateforme d'Infectiologie Expérimentale, INRAE, Nouzilly,
117 France) where they were reared together on floor. On day 7, each chick was orally infected with
118 *Salmonella enterica* Enteritidis (Strain 775 [LA5 Nal20Sm500], 5.10⁴ cfu/0.2 mL/chick) and animals
119 were transferred into four isolators to decrease oro-faecal recontaminations as described previously
120 [1]. Two isolators contained chicks from line N and two other isolators contained chicks from line 6₁,
121 with 30 birds per isolator. Sibs and half-sibs were separated into the two isolators available for each
122 line, in order to prevent confounding a putative intra-line genetic effect on *Salmonella* carriage with
123 an environmental effect of the isolator. Isolators with birds from line 6₁ in the first experiment
124 contained birds from line N in the second experiment, in order to prevent confounding isolator and
125 line effects. Then, 12 days post-infection, animals were euthanized with CO₂ according to the French
126 regulation for experimental chickens. Caecal contents were gently collected so as not to remove the
127 intestinal mucosa, weighted, transferred in cryotubes and immediately frozen in liquid nitrogen and
128 stored at -80°C until use. All animal procedures have been approved by the Ethic committee
129 (APAFIS#5833-2016062416362298v3) and authorised by the French Government.



130

131

132

133

134

Figure 1: Experimental design. Two experimentations were conducted following these steps, one in January 2017 and a second in February 2017 for a total of 240 animals of the White Leghorn inbred lines N and 6₁.

135 DNA extraction

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

Individual caecal DNA was extracted from an average of 200 mg of frozen caecal contents as previously described [26]. Samples from experiments 1 and 2 were processed at the same time. In brief, samples were incubated at 70°C for 1 hour with 250 µl of guanidine thiocyanate buffer (4 M guanidine thiocyanate–0.1 M Tris (pH 7.5) and 40 µl of 10% N-lauroyl sarcosine–0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)) and 500 µl of 5% N-lauroyl sarcosine. One volume (750 µl) of 0.1-mm-diameter silica beads (Sigma) was added, and tubes were shaken for 10 min at the maximum speed of a MM200 Mixer Mill (Retsch, Germany). Tubes were vortexed and centrifuged at 14000 rpm for 5 min at 4°C. After recovery of the supernatant, 30 µl of Proteinase K (Chemagic STAR DNA BTS kit, Perkin Elmer, USA) were added and samples were incubated for 10 min at 70°C at 250 rpm in Multi-Therm (Benchmark Scientific, USA), then for 5 min at 95°C for enzyme inactivation. Tubes were centrifuged at 14000 rpm for 5 min at 4°C and supernatants were transferred into a deepwell plate. The plate was loaded on the nucleic acid workstation Chemagic STAR (Hamilton, Perkin Elmer, USA) and the extraction protocol was performed with Chemagic STAR DNA BTS kit (Perkin Elmer, USA) by the @BRIDGe platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France) according to the manufacturer’s instructions. DNA concentration was measured by fluorometric quantification (Qubit) and DNA samples were stored at -20°C.

151 Quantification of *S. Enteritidis* by ddPCR

152 Individual abundances of *Salmonella* Enteritidis in caecal contents at day 19 were obtained by Droplet
153 Digital PCR using the QX200 Droplet Digital PCR system (Bio-Rad) at the @BRIDGE platform (INRAE,
154 Jouy-en-Josas, France). Each DNA sample was diluted at 1:2 and 1:5 in a final volume of 5 µl to be under
155 PCR saturated conditions. Droplets were generated from the 20 µl of the total volume of amplification
156 mix and genomic DNA (15000 to 20000 droplets per sample). The amplification targeted a region of
157 the *InvA* gene specific to *Salmonella* Enteritidis using specific primers, as described by Daum et al. [27]
158 (Additional file 1). PCR cycling condition started with an enzyme activation step at 95°C for 10 min,
159 followed by 40 cycles at 94°C for 30 min and 60°C for 1 min, and ended by an enzyme deactivation step
160 at 98°C for 10 min. For all cycling steps, we used a 2.5°C/sec ramp rate.

161 For each sample, the number of copies of *Salmonella* per gram of caecal content was calculated from
162 the average number of copies of *Salmonella* per µl of the two dilutions, assuming that each amplified
163 copy of the *InvA* gene corresponds to one *Salmonella* bacterium. Data were analysed with a log
164 transformation of the copies of *Salmonella*. A Levene's test was performed to test for differences in
165 variation between groups. Analyses of variance (Anova) were performed to test the significance of
166 differences of the copies of *Salmonella* between conditions (line, sex, or experiment) using the Anova
167 function from the car package (version 3.5-5) in R software version 3.5.1 (Type II sum of squares), with
168 a heteroscedasticity-corrected coefficient covariance matrix (white.adjust = TRUE) to account for
169 differences in variances between groups.

170 PCR and Sequencing of 16S rRNA Genes

171 Samples from experiments 1 and 2 were sequenced at the same time. Amplification of the V3-V4
172 hyper-variable region of the 16S rRNA coding gene was performed at the INRAE @BRIDGE platform.
173 Universal V3-V4 primers (Additional file 1) were used for the first PCR reaction. PCR cycling conditions
174 were as follows: an initial denaturation step (94°C for 10 min), 35 cycles of amplification (94°C for 1
175 min, 68°C for 1 min and 72°C for 1 min) and a final elongation step at 72°C for 10 min. Amplicons were
176 then purified using magnetic beads (Clean NA, GC biotech B.V., The Netherlands). The DNA
177 concentration was controlled using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). In the
178 second PCR, samples were multiplexed and the second pair of primers was used (Additional file 1). An
179 initial denaturation step (94°C for 10 min), 12 cycles of amplification (94°C for 1 min, 65°C for 1 min
180 and 72°C for 1 min) and a final elongation step at 72°C for 10 min were performed. Amplicons were
181 purified and concentration was controlled as described for the first PCR reaction. One run on an

182 Illumina MiSeq was used to sequence amplicons (2 x 250 paired-end reads) according to the standard
183 protocol.

184 Bioinformatic and statistical analyses

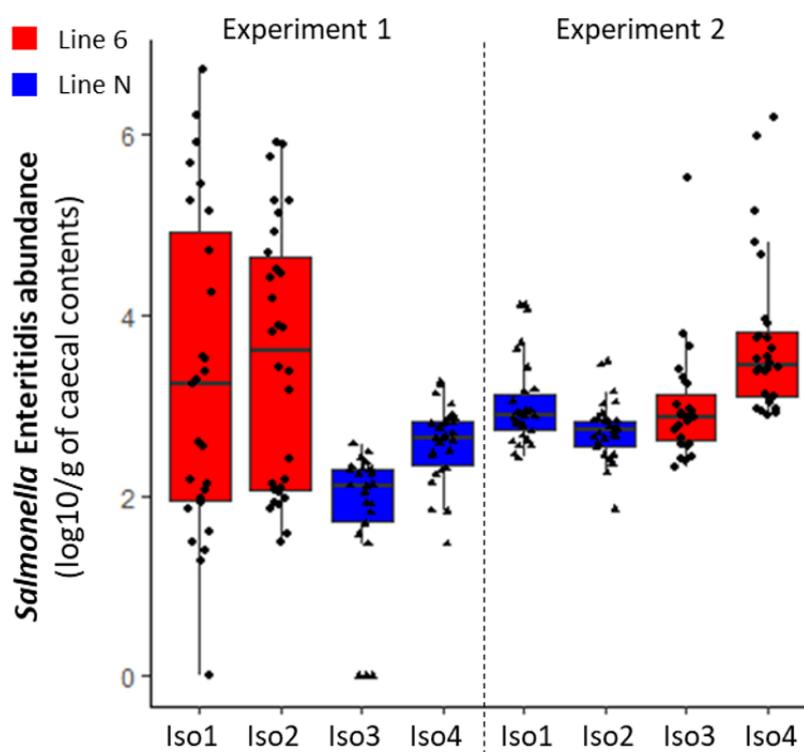
185 Identification of Operational Taxonomic Units (OTUs) was performed by using the FROGS pipeline [28].
186 We used the FastQC program to control quality and the Cutadapt program to find and remove adapter
187 sequences from sequencing reads. R1 and R2 reads were merged and filtered (at Phred \geq Q20) by
188 using the Flash program [29]. OTUs were identified using the Swarm program [30]. Chimera OTUs were
189 removed using the VSEARCH program [31], taxa filtering was performed with a minimum relative
190 abundance threshold of 0.005% as proposed by [32]. Finally, phylogenetic affiliations were identified
191 using the Silva database by using the blastn+ program [33]. OTUs representing less than 0.5% of global
192 reads and samples with less than 10,000 reads were removed and a rarefaction was performed using
193 the rarefy_even_depth function from phyloseq (1.24.2) package.

194 The phyloseq (1.24.2) and vegan (2.5-3) packages were used with R to perform the diversity analysis
195 on rarefied data. Alpha diversity was measured using the Shannon index and beta diversity using the
196 Whittaker index. Analyses of variance (ANOVA) were performed to test the significance of differences
197 of alpha and beta diversity between conditions (line, sex, experiment or isolator). We evaluated the
198 Bray-Curtis dissimilarity using the env_fit method that we plotted in an NMDS (Non-Metric
199 Multidimensional Scaling) representation. Permutational Multivariate Analyses of Variance
200 (Permanova) were used to test for the significance of differences of diversity according to variations in
201 lines, experiments, isolators and sex. The R package metagenomeSeq (1.24.1) was used on unrarefied
202 data for the identification of differentially abundant (DA) OTUs between lines N and 6₁ and between
203 high and low carriers within line 6₁. The OTU table was first normalised, and the model was fitted using
204 the fitZIG method by including experiment, isolator and sex as cofactors. Heatmaps were built using
205 the function plotMRheatmap on significant DA OTUs. Then, OTUs were aggregated by family and genus
206 with the command aggregateByTaxonomy to identify DA families and genera. Functional gene families
207 and MetaCyc pathway were predicted using the PICRUST2 package. DA KEGG ortholog (KO) and DA
208 MetaCyc pathway were identified with the R package DESeq2 (1.26.0). DA MetaCyc pathways were
209 aggregated at the super-pathway level using MetaCyc database [34].

210 Metadata table, unrarefied OTU table, and corresponding taxonomic classifications have been
211 included as Additional files 2, 3 and 4, respectively.

212 **RESULTS**213 **Abundance of *S. Enteritidis* in caecal contents**

214 After oral *Salmonella* infection at 7 days of age, no clinical signs were observed on chicken, as expected
 215 with this dose of *Salmonella* Enteritidis. The SE abundances of two hundred and twenty eight samples
 216 of caecal contents at 12 days post-infection were well characterized by ddPCR. We obtained an average
 217 of 3.38 log₁₀ copies of DNA target sequences per gram of caecal content for line 6₁, and 2.55 log₁₀
 218 copies for line N (Figure 2).



219
 220 **Figure 2: *Salmonella* Enteritidis abundance at 12 dpi in caecal contents.** *Salmonella* Enteritidis
 221 abundance at 12 dpi in caecal contents of chickens from lines N and 6₁ infected with *S. Enteritidis*
 222 (log₁₀/g of caecal contents) according to the experiment and the isolator. We observe a significant
 223 difference of *Salmonella* carriage between lines and between experiments. In line 6₁, the carriage is
 224 more variable between chicks, particularly for the experiment 1.

225

226 Since the Levene's Test showed differences in variations between groups ($P < 0.001$), an ANOVA
 227 (heteroscedasticity-corrected, Type II sum of squares) including genetic line, experiment and sex as
 228 factors was performed and showed a significant difference ($P < 0.001$) of ISC (Individual *Salmonella*
 229 Carriage) between the two lines (Table 1 and Additional file 5, Table 1). This difference between lines
 230 was also significant when considering each experiment separately (Table 1). We also observed that ISC

231 is more variable in line 6₁ than in line N ($P < 0.001$), with standard deviations of 1.3 and 0.7, respectively.
 232 This higher ISC variation in line 6₁ was more marked in experiment 1 than in experiment 2 ($P < 0.001$),
 233 with standard deviations of 1.61 vs. 0.84 (Figure 2). ISC was not significantly different between males
 234 and females (Additional file 5, Table 1). Furthermore, the mean ISC between the two experiments was
 235 significantly different ($P < 0.001$) for line N (2.2 ± 0.7 in experiment 1 vs. 2.9 ± 0.4 in experiment 2) but not
 236 for line 6₁. Finally, within each experiment, there were no significant differences between isolators
 237 containing line 6₁ in experiment 1, but there were significant differences between isolators containing
 238 line 6₁ in experiment 2 and between isolators containing line N in experiment 1 and 2 ($P < 0.01$).

Line	Exp1		Exp2		All Exp	
	Nb	Mean \pm SD	Nb	Mean \pm SD	Nb	Mean \pm SD
N	56	2.21 \pm 0.74	60	2.86 \pm 0.43	116	2.55 \pm 0.68
6	57	3.41 \pm 1.61	55	3.35 \pm 0.84	112	3.38 \pm 1.29
p-value*		2.03e-06		2.12e-04		3.45e-09

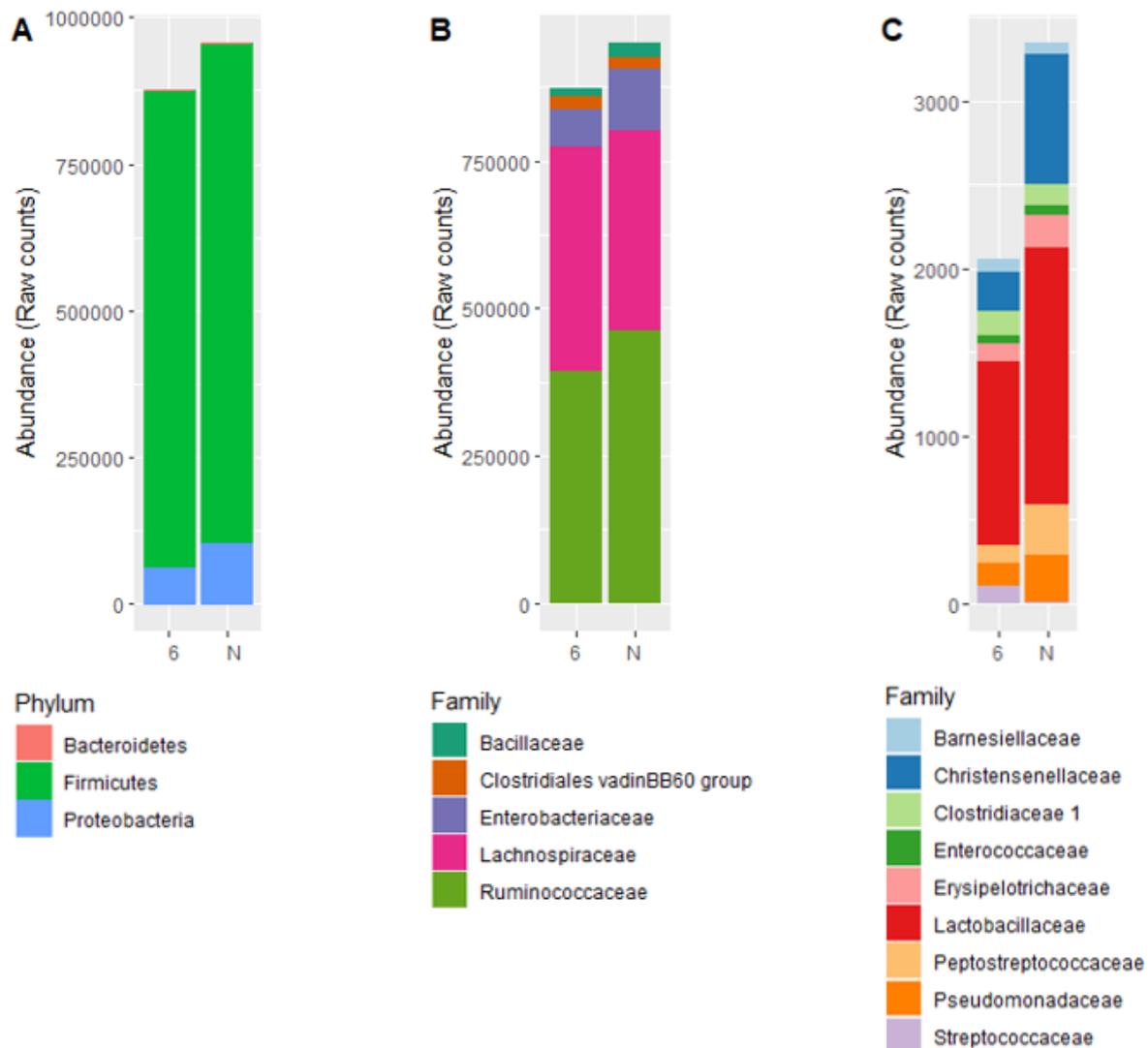
239 Table 1: *S. Enteritidis* abundance in caecal contents of chickens 12 days after oral infection (*ANOVA
 240 Type II sum of squares test using all factors)

241 In line 6₁ for the experiment 1, we were able to identify by hierarchical clustering, two extreme groups
 242 of fifteen samples, for which we have usable information on their microbiota, that were considered to
 243 be low and high carriers. The low-carriers group displayed a mean of 1.8 ± 0.6 log₁₀ copies of DNA per
 244 gram of caecal content, while the high-carriers group had a mean of 5.2 ± 0.6 log₁₀.

245 Structure and diversity of bacterial community

246 Due to strict controls of DNA quality after extraction and amplification, only 228 samples with at least
 247 10 ng of DNA from the 240 initial samples were sequenced. After sequencing, we obtained 8,300,144
 248 reads with an average of 32,464 reads per sample. From these reads, 617 OTUs were identified with a
 249 percentage of affiliation of 99% at the family level and 65% at the genus level. Samples with a total
 250 number of reads lower than 10,000 were removed, so that 182 samples from the 228 sequenced
 251 samples were finally analysed: 86 samples from line 6₁ and 95 from line N. Samples excluded were
 252 distributed in different groups (line, sex, experiment and isolators).

253 At the phylum level, *Firmicutes*, followed by *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* (Figure 3, A), dominated
 254 the bacterial composition. At the family level, we observed a predominance of *Lachnospiraceae* and
 255 *Ruminococcaceae*, followed by the *Enterobacteriaceae*, *Clostridiales* and *Bacillaceae* (Figure 3, B and
 256 Additional file 5, Table 2).



257

258

259

260

261

262

263

264

Figure 3: Microbiota composition at phylum and family levels for lines N and 6₁. Microbiota composition using raw counts after rarefaction at phylum level (A) and family level (B, most abundant and C, least abundant) for lines N and line 6₁. The most abundant phylum is Firmicutes followed by Proteobacteria and Bacteroidetes. We observed no significant difference at this phylum level between lines. At the family level, we observed first, Ruminococcaceae and Lactobacillaceae, followed by Enterobacteriaceae, Clostridiales and Bacillaceae.

265

266

267

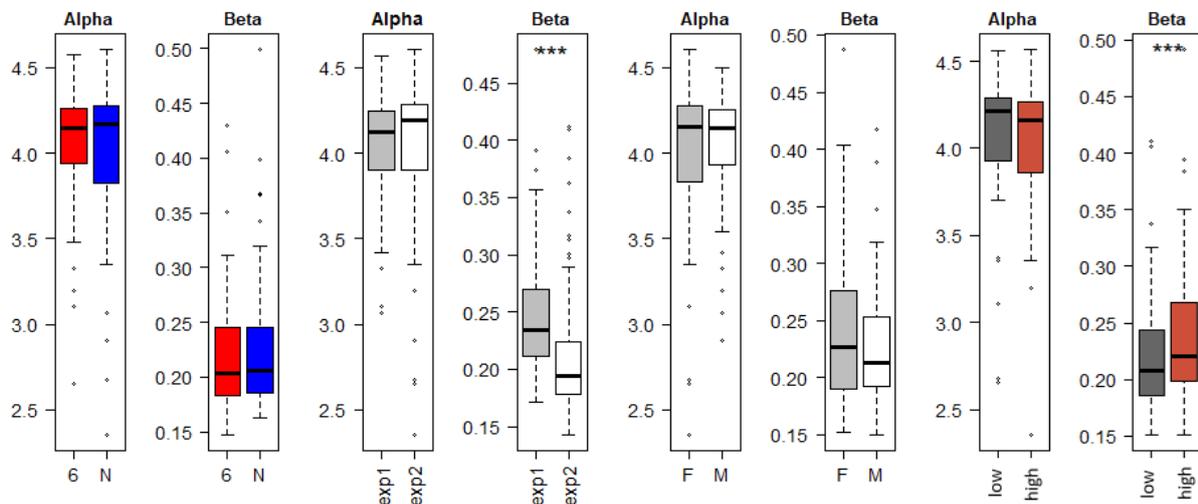
268

269

The analysis of alpha diversity with the Shannon index did not show a significant difference between lines, experiments, or sex (Figure 4 and Additional file 5, Table 3). Using the Whittaker index, we observed a significant difference of beta diversity between experiments ($P < 0.0001$), corresponding to 0.24 for experiment 1 vs. 0.20 for experiment 2. However, we did not observe any difference in beta diversity between lines (0.20 for both). Comparing high- and low-carriers in line 6₁, we identified no

270 significant difference in alpha diversity and richness, but we identified a significant difference in beta
 271 diversity (Figure 4 and Additional file 5, Table 3).

272



273

274 **Figure 4: Alpha- and Beta-diversity between line, exp, sex or high- and low-carriers in line 6₁.** Using

275 the Shannon index, the alpha diversity did not show a significant difference between lines,

276 experiments, sex and high- and low-carriers in line 6₁. Using the Whittaker index, we observed a

277 significant difference of beta diversity between experiments ($P < 0.0001$) and high- and low-carriers in

278 line 6₁ ($P < 0.01$), but not between lines and sex.

279

280 Non-metric multidimensional scaling and differentially abundant OTUs between
 281 lines

282 The analysis of the beta diversity using the Bray-Curtis dissimilarity and an NMDS representation
 283 (Figure 5) showed that the microbiota composition is clearly clustered according to the genetic line.

284 This clustering is observed for each experiment individually but is more contrasted in experiment 1

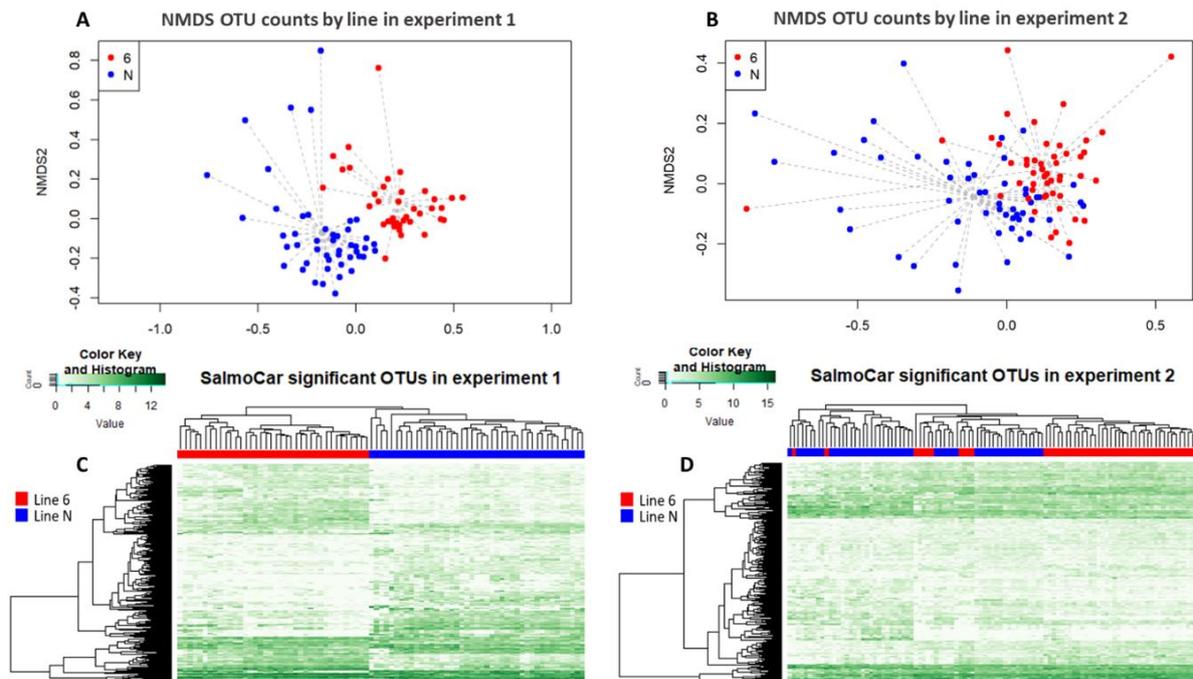
285 (Figure 5). The Permanova analysis confirmed this line effect ($P < 0.001$) after correcting for the

286 experiment, isolator and sex effects, whether merging data from the two experiments or considering

287 each experiment separately (Additional file 5, Table 4). The global microbiota composition was also

288 significantly different between experiments and isolators, but not significantly different between

289 males and females (Additional file 5, Table 4).



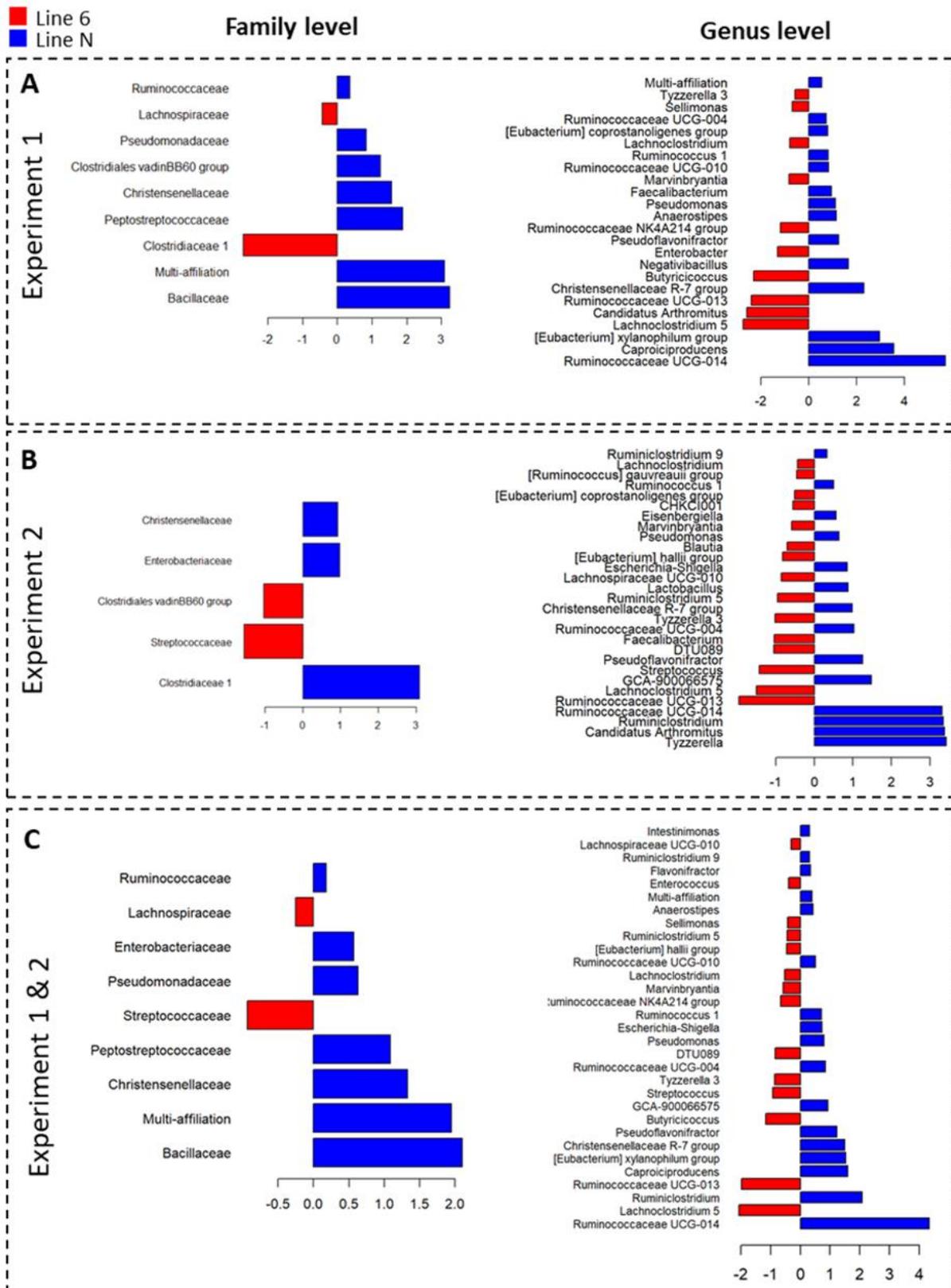
290

291 **Figure 5: Non-metric multidimensional scaling representations and heatmaps comparing lines N**292 **and 6₁ for caecal microbiota composition.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS)293 *representations of the OTU composition of caecal contents using the Bray-Curtis dissimilarity. These*294 *figures compare the composition between samples from lines N and 6₁ in experiment 1 (A) and*295 *experiment 2 (B). We can observe a significant difference of microbiota composition between lines*296 *after correcting for the isolator and sex (Permanova, $P < 0.001$). Heatmaps of the caecal DA OTUs*297 *between lines N (in blue) and 6₁ (in red) in experiment 1 (C) and in experiment 2 (D).*

298

299 Of the 617 OTUs identified, we observed a total of 390 significant DA OTUs between lines over the two
 300 experiments, after controlling for the isolator effect (Additional file 5, Table 5). When analysing
 301 experiments separately, a heatmap showed a more strongly defined clustering for experiment 1, with
 302 388 DA OTUs between lines (Figure 5), whereas for experiment 2, we observed 284 DA OTUs. A total
 303 of 187 DA OTUs were found to be in common between the two experiments.

304 In the following analyses, we aggregated the 617 OTUs in order to compare compositions at higher
 305 taxonomic ranks, which led to 14 families and 51 genera. We identified 9 DA families and 31 DA genera
 306 between lines over the two experiments, after adjusting for the isolator effect (Figure 6 and Additional
 307 file 5, Table 6).



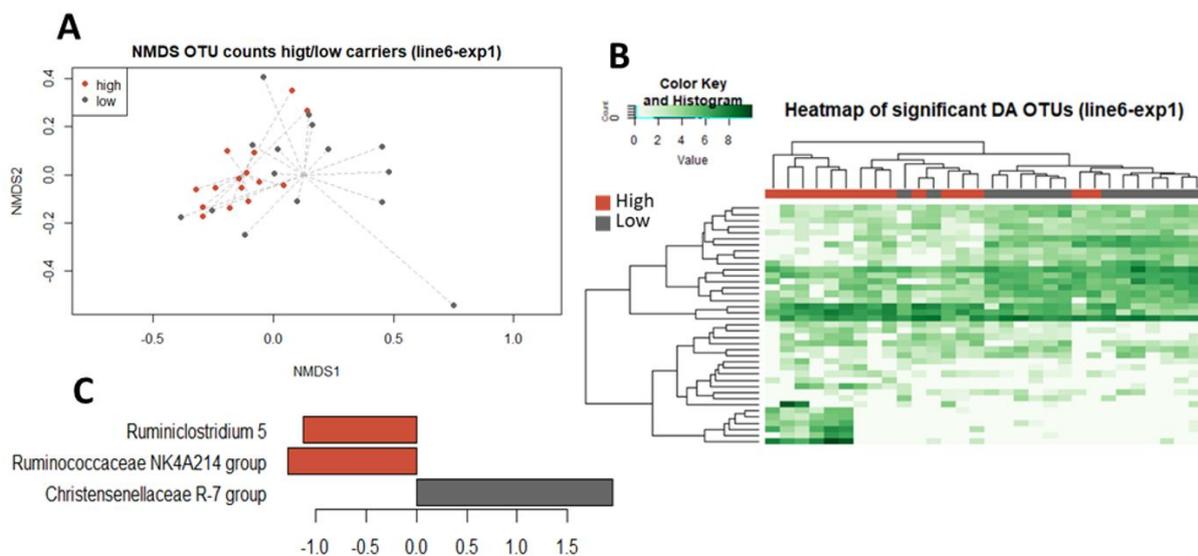
308
 309
 310
 311
 312

Figure 6: Differentially abundant families and genera between lines N and 6₁ according to the experiment. DA families and genera between lines N and 6₁ for experiment 1 (A), experiment 2 (B) and experiments 1 and 2 together (C). Representation of the log₂ fold-changes for the comparison between lines (blue indicates greater abundance in line N, red greater abundance in line 6₁).

313 For experiment 1 and experiment 2, we respectively identified 9 and 5 DA families and 24 and 29 DA
 314 genera (Figure 6). At these levels of aggregation, significant DA families and significant DA genera
 315 between lines are not the same when comparing the two experiments, and some are inversely
 316 abundant. Nevertheless, *Christensenellaceae* is in both cases a family that is more abundant in the
 317 resistant line N. At the genus level, *Tyzzereella 3*, *Lachnoclostridium*, *Marvinbryantia*, *Ruminococcaceae*
 318 *UCG-013* are more abundant in line 6₁ (susceptible) and *Ruminococaceae UGC-004*, *Ruminococcus 1*,
 319 *Pseudomonas*, *Pseudoflavonifractor*, *Christensenellaceae R-7 group* and *Ruminococcaceae UGC-014*
 320 are more abundant in line N (resistant).

321 High and low carriers in line 6₁ and the family *Christensenellaceae*

322 In order to assess a potential difference of microbiota composition between high and low carriers in
 323 line 6₁, we used an NMDS representation for the first experiment (Figure 7, A). We chose experiment
 324 1 because it had the largest variability in individual *Salmonella* carriage, which allowed for the
 325 identification of high and low carriers.



326
 327 **Figure 7: NMDS representation, heatmap and significant DA genera for high and low carriers (line**
 328 **6₁- exp1).** (A) NMDS representation of the caecal microbiota of high and low carriers in line 6₁ (Bray-
 329 Curtis dissimilarity). High and low carriers are significantly different (Permanova, *P*-value < 0.01);
 330 caecal microbiota from different isolators are not significantly different (Permanova, *P*-value > 0.5).

331 (B) Heatmap representation of the 39 DA OTUs between high- and low-carriers in line 6₁ for
 332 experiment 1. (C) The significant DA genera between high and low carriers for line 6₁ in experiment 1
 333 (Log₂ Fold-Changes).
 334

335 In experiment 1, the Permanova analysis showed a significant ($P < 0.01$) difference of microbiota
336 composition between both groups. The differential abundance (DA) analysis using the
337 metagenomeSeq package led to the identification of 39 DA OTUs between high and low carriers (Figure
338 7, B and Additional file 5, Table 7). After aggregation, we obtained one DA family: *Christensenellaceae*,
339 and three DA genera: *Ruminococcaceae* NK4A214 group, *Ruminiclostridium* 5 and *Christensenellaceae*
340 R-7 group (Figure 7, C and Additional file 5, Table 8).

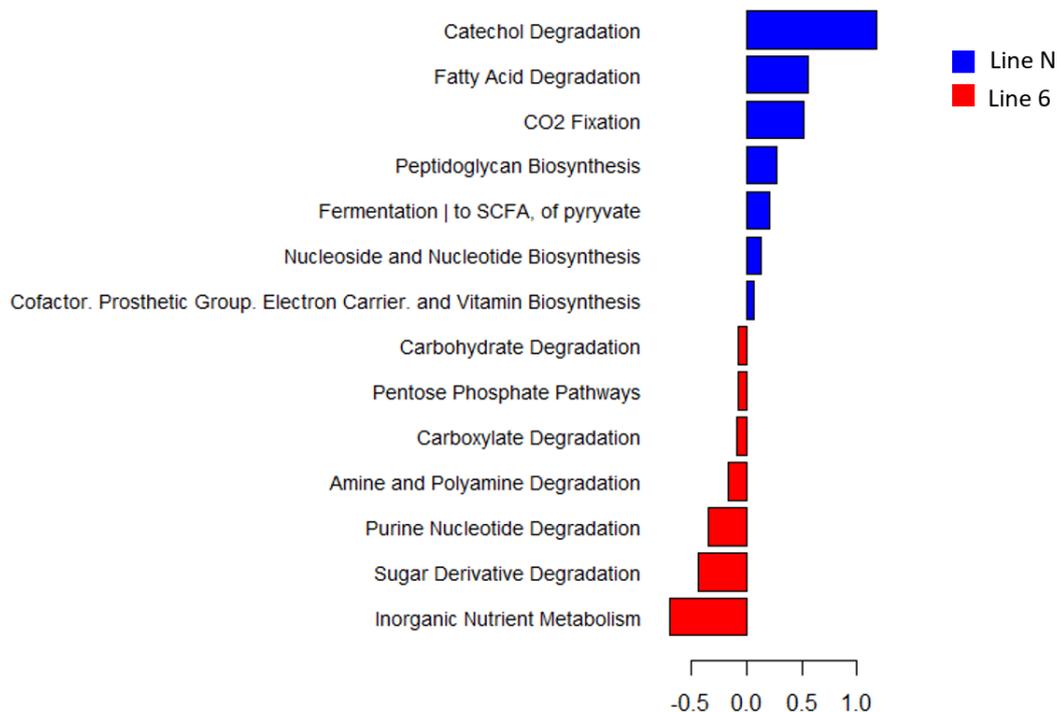
341 A comparison of the results in DA analyses between lines on the one hand, and between high and low
342 carriers on the other hand led to the identification of a common, DA family: the *Christensenellaceae*.
343 *Christensenellaceae* is more abundant in low carriers than in high carriers in line 6₁ and is also more
344 abundant in line N, which is more resistant (i.e. low carrier) to *Salmonella*. The same observation can
345 be made for the DA genus *Christensenellaceae* R7-group, which is more abundant in low carriers as
346 well as in the resistant line N for both experiments. A regression analysis led to a significant correlation
347 (P -value = $4.11e^{-06}$) between ISC and *Christensenellaceae* abundance.

348 Functional gene prediction

349 Using PICRUST2, we predicted 4,954 KEGG Orthologies (KO) and 323 pathways over all lines and
350 experiments. Using DESeq2, we identified 1,590 DA KO between lines N and 6₁, adjusting for the effect
351 of the experiment, and 69 DA pathways (false discovery rate (FDR) < 0.01). In line 6₁, the analysis
352 between high and low carriers in experiment 1, adjusting for the effect of the isolator, led to the
353 identification of 507 DA KO and 75 DA pathways (FDR > 0.01). The 64 DA pathways in common for the
354 comparisons between line N and 6₁, and between high and low carriers within line 6₁ were aggregated
355 at the super-pathway level (Figure 8 and Additional file 5, Table 9).

356 DISCUSSION

357 Using a model of *Salmonella* infection in isolators limiting animal-animal recontaminations and animal
358 reinfection and thus homogenisation of individual *Salmonella* carriage [1], we confirm the existence of
359 a variability of individual *Salmonella* carriage linked to both genetics and microbiota composition. We
360 evidenced gut microbiota differences associated to both the genetic line (N vs 6₁) and the individual
361 *Salmonella* carriage status (high vs. low ISC carriers). Line N had a lower average *Salmonella* abundance
362 than line 6₁, suggesting a possible genetic control of the carriage. In line 6₁, the larger observed
363 variability allowed us to identify contrasted groups of low and high carriers. Finally, through our caecal
364 microbiota taxonomic analysis, we identified taxa and metabolism pathways that may be associated
365 with *Salmonella* carriage.



366

367 **Figure 8: DA super-pathways in common between lines N and 6₁ and high/low carriers in line 6₁. DA**
 368 *super-pathway (MetaCyc database – DESeq2) in common for the comparisons of caecal microbiota*
 369 *between lines N and 6₁ and between high and low carriers in line 6₁. Representation of the log₂ fold-*
 370 *changes for the comparison between lines (blue indicates greater abundance in line N, red greater*
 371 *abundance in line 6₁).*

372

373 In both experiments conducted, line N was more resistant and microbiota taxonomic composition was
 374 significantly different between both lines. Nevertheless, ISC was higher for line N in the second
 375 experiment and the DA OTUs between lines were not strictly the same between experiments.
 376 Differences in microbiota composition between experiments might be due to the impact of the
 377 immediate environment on individual microbiota composition. Although conditions were strictly
 378 controlled to be identical between experiments, slight differences in the environment may occur, and
 379 the microbial composition of the environment may differ, thus affecting the primo-colonisation of the
 380 gut by bacteria in newborn chicks. Some studies report differences in the primo-colonisation of the
 381 intestinal tract between individuals even when chickens are reared together in the same environment
 382 [35, 36]. As a result, a difference in microbiota composition before infection could affect the microbiota
 383 composition after infection. In the following section, since ISC and microbiota composition differed
 384 slightly between experiments, we will focus only on results validated in both experiments.

385 Impact of the chicken genetic line on Individual *Salmonella* Enteritidis carriage
386 and microbiota composition

387 Previous studies showed the impact of host genetics on *Salmonella* carriage, using different infection
388 models. Significant differences in *Salmonella* Enteritidis carriage in commercial or local chicken breeds
389 have already been identified [37–39]. Several candidate genes were associated with resistance to
390 *Salmonella* Enteritidis carriage, such as SLC11A1 and TLR4 [40–42]. Our results with lines N and 6₁
391 confirm previous results obtained without using isolators with the same lines, with on-floor grouped
392 rearing [2, 43], confirming that line N is a lower *Salmonella* Enteritidis carrier than line 6₁. QTLs were
393 previously identified on several chromosomes in different populations derived from [N x 6₁] crosses
394 [2–4]. Nevertheless, due to the highly polygenic control of carrier-state in these lines, with many loci
395 with weak effects involved [44], identification of causal genes at the QTLs has not been possible. The
396 infection of birds in isolators, which would allow for much larger individual variability [1], might be a
397 way to improve future QTL detection studies and identification of causal genes. Interestingly, we
398 observed a larger variability in ISC in line 6₁, confirmed in two independent experiments. This larger
399 variability of ISC generates new hypotheses: could this ISC variability be caused by intra-line genetic
400 variations, or by a variability of the microbiota composition?

401 In both experiments conducted, the significant difference of caecal microbiota composition between
402 lines N and 6₁ at 12 days post-infection suggests the existence of a host genetic control of this
403 composition. For each experiment independently, birds from lines N and 6₁ were hatched in the same
404 environment at the same time, and raised together until the experimental infection, so that the initial
405 microbial environment was similar for all birds tested before infection. Differences in caecal microbiota
406 composition between lines can therefore not be attributed to differential exposures to environmental
407 microbes before infection. Furthermore, for experiment 1, we observed no significant difference of
408 microbiota composition between the two isolators used for the same line ($P > 0.1$, Additional file 5,
409 Table 4). Thus, we cannot associate differences in microbiota composition between lines with an effect
410 of the isolator environment in experiment 1. To the contrary, in experiment 2 we observed a significant
411 difference of microbiota composition between the two isolators used for the same line ($P < 0.01$,
412 Additional file 5, Table 4). It can be argued that isolators might be populated by different microbial
413 populations, which could in turn influence the caecal microbiota composition after infection. However,
414 isolators were sterilized before each experimentation. In addition, we inverted the isolators containing
415 each line in the second experiment, and still observed a similar difference between lines in terms of
416 caecal microbiota composition. Moreover, since the utilisation of isolators decreases the oro-faecal
417 recontamination of commensal microbiota as well as pathogenic bacteria, the caecal microbiota

418 composition of each chicken can mature in isolation from the impact of the other birds once the animal
419 has been put into the isolator.

420 Since we analysed caecal microbiota composition after infection, we cannot exclude that the infection
421 by *Salmonella* affected this microbiota composition. Does the higher susceptibility of line 6₁, with a
422 higher number of *Salmonella* in the caeca, causes a shift in microbiota composition? Several studies
423 have shown that SE infection has a very low impact on the composition of the caecal microbiota [22,
424 45–47], even if some differences in taxa abundance have been identified between infected and
425 uninfected chicken [47, 48]. We therefore hypothesize that in our study also, SE infection presumably
426 had a weak impact on microbiota composition.

427 A study on *Campylobacter* resistance between lines N and 6₁ aimed at transferring microbiota from
428 the resistant line to the susceptible line and to study the *Campylobacter* carriage [49]. Although no
429 difference of microbiota composition between donor birds from the N and 6₁ lines at 21 days was
430 shown, in the recipient line after transplantation the genetic line had a significant impact on microbiota
431 composition, while the transplanted microbiota did not. This supports our hypothesis that genetics
432 have a strong impact on the composition of the microbiota, at least 3 weeks after hatching in lines N
433 and 6₁.

434 In chicken as well as in other livestock species and in human, the existence of a genetic control of the
435 intestinal microbiota composition is well documented. In human studies some bacteria known to be
436 associated with immunity seem to be heritable and candidate genes have been identified [50]. In
437 chicken, studies identified differences in microbiota composition between genetic lines, for instance
438 in two chicken lines that differ in their susceptibility to bacterial infections [51], in two divergent
439 genetic lines for body weight [52] or between four commercial lines and an indigenous Indian breed,
440 [53]. At least two studies identified moderate heritabilities of bacteria families and several QTLs
441 involved in the control of these bacterial abundances [23, 54].

442 Relations between caecal microbiota and individual *Salmonella* Enteritidis 443 carriage

444 The colonisation and the adhesion of commensal bacteria covering the mucosal epithelium constitute
445 a protective biofilm due to their competitive exclusion (CE) function. Studies affirm that CE is currently
446 the best approach to decrease *Salmonella* colonization in chicken in commercial production [9].

447 In our study, all animals were experimentally infected and the identification of signature bacteria was
448 performed by comparing chickens with differences of individual *Salmonella* carriage between lines or
449 intra-lines. Our hypothesis is that the abundance of commensal, potentially competitive bacteria is

450 higher in the microbiota of resistant chickens, thus preventing the colonisation of *Salmonella* in the
451 intestinal tract. The genetic background could in part control this abundance of competitive bacteria.

452 From our results, it appears that the difference of ISC between lines and the larger ISC variability in
453 line 6₁ cannot be related to a difference in beta- or alpha-diversity of the caecal microbiota between
454 lines. Comparing groups of chickens either infected with SE or non-infected using different chicken
455 breeds or lines, no significant differences for the Shannon index were found in two studies at 14 dpi
456 [47, 55] and in another study at 10 dpi [22]. These observations corroborate ours and lead us to the
457 conclusion that the infection with SE or the level of SE carriage do not affect the OTU diversity in the
458 caecal microbiota. However, we identified a significant difference in beta diversity between high and
459 low carriers within line 6₁: individual microbiota of high carriers are more similar compared to the
460 individual microbiota of low carriers, which harbour more differences. Does the higher level of
461 *Salmonella* drive the microbiota to a more similar composition in high-carriers? Or are these animals
462 more susceptible to *Salmonella* because some shared characteristics of their microbiota lead to a less
463 efficient competitive exclusion? These questions remain open; as we also cannot exclude that
464 remaining genetic variations within line 6₁ could explain these differences in caecal microbiota beta
465 diversity.

466 Even in the absence of differences in alpha- or beta-diversity, DA OTUs identified between lines could
467 potentially be associated with differences in ISC (Figure 6). Likewise, DA OTUs identified between high
468 and low carriers in line 6₁ could be associated with ISC (Figure 7). In order to document the putative
469 functions associated with these DA OTUs, we imputed their putative functions from known databases.
470 Some of these DA OTUs harbour striking functions.

471 We observed that the *Christensenellaceae* family is more abundant in low *Salmonella* carriers (Figure
472 6, 7). This bacteria family is associated with a beneficial impact on health in human and in mice [56–
473 59]. Interestingly, in parallel, it was shown that *Christensenellaceae* is one of the most heritable
474 bacterial families of the human intestinal microbiota [56]. This leads us to formulate the hypothesis
475 that host genetic variations between lines N and 6₁ might cause variations in *Christensenellaceae*
476 abundance, which in turn could affect *Salmonella* resistance. However, to our knowledge, the
477 heritability of *Christensenellaceae* has not been assessed in chicken. Similarly, the family
478 *Enterobacteriaceae* was more abundant in the resistant line (Figure 6). These bacteria are in
479 competition with *Salmonella* for oxygen [60] and for the use of nutrients as iron [61]. These bacteria
480 are also able to produce bacteriocin to inhibit the proliferation of *Salmonella* [60]. Oxygen respiration
481 by competitive bacteria such as *Enterobacteriaceae*, leads to an anaerobisation of the lumen and thus,
482 a decrease of the capacity of *Salmonella* colonisation [60]. Our results are compatible with this

483 hypothesis. At last, the *Ruminococcaceae* family is less abundant in the susceptible line 6₁ (Figure 6). It
484 has been shown that a decrease of *Ruminococcaceae* can be associated with an increase of
485 inflammation [62] and thus an increase of *Salmonella* competition [63].

486 Interestingly, several of the potential functions associated with the DA abundant OTUs may explain
487 the differences in ISC observed. Although very speculative since based on an indirect, *in silico*
488 approach, their identification is highly coherent with known mechanisms of resistance to *Salmonella*.
489 First, the SCFAs metabolic pathway may be more abundant both in the resistant line N and in low
490 carriers in the susceptible line 6₁. Consequently, the production of SCFAs could be associated with low
491 *Salmonella* carriage. Many studies showed that the production of SCFAs, such as butyrate, by the
492 intestinal microbiota has beneficial effects for the host [64–66]. In chicken, butyric acid can decrease
493 the inflammation [67], which is unfavourable to *Salmonella* [63]. More specifically, it was shown that
494 the rise of SCFAs on *in vitro* culture of avian intestinal cells decreases the pathogenicity of *Salmonella*,
495 blocking its entry into the organism [68]. Thus, line N and low carriers in line 6₁ could carry a beneficial
496 microbiota for *Salmonella* resistance.

497 Secondly, the catechol degradation pathway may be more abundant in both the resistant line N and
498 in the low *Salmonella* carriers of the susceptible line 6₁. *Salmonella* have the ability to produce auto-
499 inducers 3 (AI-3), which have a similar chemical structure as the catecholamine from the catechol
500 family [69, 70]. In chickens and in pigs, it was shown that a treatment with catecholamine, e.g.
501 Norepinephrine, increases *Salmonella enterica* colonization in the host and *Salmonella* spread in the
502 environment [71, 72]. Besides, catechol plays a role of quorum sensing signal for the production of
503 biofilm, thus increasing the virulence of *Salmonella* during host infection [69, 73] and the *Salmonella*
504 capacity to resist on eggs or meat [74]. Thus, the microbiota capacity of catechol degradation in line N
505 and low carriers in line 6₁ could be beneficial for *Salmonella* resistance.

506 At last, other bacteria associated with low carriage were identified in experiment 2 but not confirmed
507 in experiment 1. This is the case of *Lactobacillus*, which were more abundant in the resistant line. Some
508 species of these bacteria, used as a probiotic, were shown to significantly decrease the *Salmonella*
509 Enteritidis carriage [75, 76]. Similarly, the *Bacillaceae* family was more abundant in the resistant line.
510 Some studies showed the significant impact of *Bacillus subtilis*, from this family, in the reduction of
511 *Salmonella* growth in chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg [77, 78] or *Salmonella*
512 Typhimurium [79]. Nevertheless, bacteria potentially beneficial for health have also been found with
513 a higher abundance in the susceptible line. For example, the *Blautia* genus, which is more abundant in
514 line 6₁ in experiment 2 (not confirmed in experiment 1), is a butyrate producer [80] and has beneficial
515 anti-inflammatory effects [81]. Thus, looking at individual taxa might not be sufficient. More likely, we

516 suggest that the total balance of beneficial bacteria has an impact on the *Salmonella* resistance, which
517 supports the idea of studying the aggregated contributions of several taxa to the same metabolic
518 pathway.

519 CONCLUSION

520 We showed an impact of the genetic line on individual *Salmonella* Enteritidis count in caeca and on
521 caecal microbiota taxonomic composition. We also showed associations between the abundances of
522 bacterial taxa and metabolic pathways with the ISC status (high vs. low carriers), which were previously
523 associated with resistance to *Salmonella* Enteritidis. Most notably, we identified an overrepresentation
524 of the Short-Chain Fatty Acids metabolic pathway and the Catechol degradation pathway, as well as
525 the *Christensenellaceae*, *Enterobacteriaceae* and *Ruminococcaceae* families in low-carriers. Based on
526 these observations, we hypothesize that genetic differences between lines N and 6₁ may influence the
527 level of *Salmonella* carriage by influencing the abundances of beneficial bacteria. Combining
528 information on host genetics and gut microbiota composition is useful to sharpen the prediction of
529 complex traits such as resistance to pathogens. Our study showed that both caecal microbiota and the
530 host genetic background play a role in the mechanisms leading to *Salmonella* colonization resistance
531 in chickens. Future studies should decipher the genes that potentially control differences in bacterial
532 abundances in these lines.

533 LIST OF ABBREVIATIONS

534 SE: *Salmonella* Enteritidis
535 OTU: Operational taxonomic units
536 QTL: Quantitative trait loci
537 DPI: Days post infection
538 SNP: Single nucleotide polymorphisms
539 NMDS: Non-metric multidimensional scaling
540 DA: Differentially abundant
541 KO: KEGG ortholog
542 ISC: Individual *Salmonella* carriage
543 FDR: False discovery rate
544 SCFAs: Short-chain fatty acids

545 **DECLARATIONS**

546 **Ethics approval**

547 All animal procedures has been approved by the Ethic committee (APAFIS#5833-
548 2016062416362298v3) and authorised by the French Government.

549 **Consent for publication**

550 Not applicable

551 **Availability of data and material**

552 Sequencing data analysed during the current study are available in the NCBI Sequence Read Archive
553 (SRA) database under the Bioproject accession number PRJNA649900. All data generated and analysed
554 during this study are included in this published article and its supplementary information files.

555 **Competing interests**

556 The authors declare that they have no competing interests.

557 **Funding**

558 Joint program of Instituts Carnot Santé Animale (ICSA) and Pasteur Maladies Infectieuses (PMI). The
559 PhD of Anais Cazals is funded by Région Ile de France (50%) and the Animal Genetics Division of INRAE
560 (50%).

561 **Authors' contributions**

562 AC analyzed the data and wrote the manuscript. FC, BB and PV conceived the study. NB, JLC, MNR, DJ
563 and CB performed laboratory assays. PM, NB, FC, JLC performed animal experiments and collected
564 samples. JE and AR supervised bioinformatics and biostatistics analysis. FC, JE, AR, BB and PV
565 contributed and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

566 **Acknowledgements**

567 We thank our colleagues from the experimental unit PEAT who raised the parents of the animals
568 studied and furnished the chicks used for our study. We also thank colleagues from the experimental
569 unit PFIE, who efficiently monitored the experiments and collected the samples and colleagues from
570 the SPVB research team, who helped collect the samples.

571 **ADDITIONAL FILES**

572 **Additional file 1:** Feed composition used for animal experiments, primers sequences used for the
573 amplification of the region specific to *Salmonella* Enteritidis in the *invA* gene and adapter/primer used
574 in Illumina amplicon library preparation. (TXT)

575 **Additional file 2:** Metadata associated with all samples. (TXT)

576 **Additional file 3:** Unrarefied operational taxonomic unit table. (TXT)

577 **Additional file 4:** Taxonomic assignments for operational taxonomic units. (TXT)

578 **Additional file 5:** Tables of results of statistical analysis performed in R. (XLSX)

579 **REFERENCES**

- 580 1. Menanteau P, Kempf F, Trotureau J, Virlogeux-Payant I, Gitton E, Dalifard J, Gabriel I, Rychlik I,
581 Velge P (2018) Role of systemic infection, cross contaminations and super-shedders in *Salmonella*
582 carrier state in chicken. *Environ Microbiol* 20:3246–3260
- 583 2. Tilquin P, Barrow PA, Marly J, Pitel F, Plisson-Petit F, Velge P, Vignal A, Baret PV, Bumstead N,
584 Beaumont C (2005) A genome scan for quantitative trait loci affecting the *Salmonella* carrier-
585 state in the chicken. *Genet Sel Evol GSE* 37:539–561
- 586 3. Calenge F, Lecerf F, Demars J, Feve K, Vignoles F, Pitel F, Vignal A, Velge P, Sellier N, Beaumont C
587 (2009) QTL for resistance to *Salmonella* carrier state confirmed in both experimental and
588 commercial chicken lines. *Anim Genet* 40:590–597
- 589 4. Calenge F, Vignal A, Demars J, Fève K, Menanteau P, Velge P, Beaumont C (2011) New QTL for
590 resistance to *Salmonella* carrier-state identified on fowl microchromosomes. *Mol Genet*
591 *Genomics* 285:237–243
- 592 5. Guchte M Van De, Blottière HM, Doré J (2018) Humans as holobionts : implications for prevention
593 and therapy. *Microbiome* 6:4–9
- 594 6. Hanning I, Diaz-sanchez S (2015) The functionality of the gastrointestinal microbiome in non-
595 human animals. *Microbiome* 3:51
- 596 7. Broom LJ, Kogut MH (2018) *Veterinary Immunology and Immunopathology* The role of the gut
597 microbiome in shaping the immune system of chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 204:44–51
- 598 8. Nurmi E, Rantala M (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*
599 241:210–211
- 600 9. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedrosa A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ,
601 Cox NA (2014) The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* 360:100–112

- 602 10. Clavijo V, Josefina M, Fl V (2018) Non-Invited Review The gastrointestinal microbiome and its
603 association with the control of pathogens in broiler chicken production : A review. *Poult Sci*
604 97:1006–1021
- 605 11. Kempf F, Menanteau P, Rychlik I, et al (2020) Gut microbiota composition before infection
606 determines the Salmonella super- and low-shedder phenotypes in chicken. *Microb Biotechnol*
607 13:1611–1630
- 608 12. Mead GC (2000) Prospects for “competitive exclusion” treatment to control salmonellas and
609 other foodborne pathogens in poultry. *Vet J Lond Engl* 1997 159:111–123
- 610 13. Nakamura A, Ota Y, Mizukami A, Ito T, Ngwai YB, Adachi Y (2002) Evaluation of aviguard, a
611 commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response
612 of chicks to Salmonella. *Poult Sci* 81:1653–1660
- 613 14. Sterzo E, Paiva JB, Mesquita AL, Freitas NOC, Berchieri A (2007) Organic acids and/or compound
614 with defined microorganisms to control Salmonella enterica serovar Enteritidis experimental
615 infection in chickens. *Braz J Poult Sci* 9:69–73
- 616 15. Smialek M, Kaczorek E, Szczucińska E, Burchardt S, Kowalczyk J, Tykałowski B, Koncicki A (2019)
617 Evaluation of Lactobacillus spp. and yeast based probiotic (Lavipan) supplementation for the
618 reduction of Salmonella Enteritidis after infection of broiler chickens. *Pol J Vet Sci* 22:5–10
- 619 16. Varmuzova K, Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Sisak F, Havlickova H, Sebkova A, Faldynova M,
620 Rychlik I (2016) Composition of Gut Microbiota Influences Resistance of Newly Hatched Chickens
621 to Salmonella Enteritidis Infection. *Front Microbiol* 7:957
- 622 17. Hughes R-A, Ali RA, Mendoza MA, Hassan HM, Koci MD (2017) Impact of Dietary Galacto-
623 Oligosaccharide (GOS) on Chicken’s Gut Microbiota, Mucosal Gene Expression, and Salmonella
624 Colonization. *Front Vet Sci* 4:192
- 625 18. Adhikari P, Lee CH, Cosby DE, Cox NA, Kim WK (2019) Effect of probiotics on fecal excretion,
626 colonization in internal organs and immune gene expression in the ileum of laying hens
627 challenged with Salmonella Enteritidis. *Poult Sci* 98:1235–1242
- 628 19. Laptev GY, Filippova VA, Kochish II, et al (2019) Examination of the Expression of Immunity Genes
629 and Bacterial Profiles in the Caecum of Growing Chickens Infected with Salmonella Enteritidis
630 and Fed a Phytobiotic. *Anim Open Access J MDPI*. 9:615
- 631 20. Kogut MH (2019) The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Anim*
632 *Feed Sci Technol* 250:32–40
- 633 21. Argüello H, Estellé J, Leonard FC, et al (2019) Influence of the Intestinal Microbiota on
634 Colonization Resistance to Salmonella and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs.
635 *mSystems*. 4:e00021-19
- 636 22. Zeng J, Lei C, Wang Y, Chen Y, Zhang X, Kang Z, Zhai X, Ye X, Wang H (2018) Distribution of
637 Salmonella Enteritidis in internal organs and variation of cecum microbiota in chicken after oral
638 challenge. *Microb Pathog* 122:174–179
- 639 23. Mignon-Grasteau S, Narcy A, Rideau N, Chantry-Darmon C, Boscher M-Y, Sellier N, Chabault M,
640 Konsak-Ilievski B, Bihan-Duval EL, Gabriel I (2015) Impact of Selection for Digestive Efficiency on
641 Microbiota Composition in the Chicken. *PLOS ONE* 10:e0135488

- 642 24. Ji J, Luo CL, Zou X, Lv XH, Xu YB, Shu DM, Qu H (2019) Association of host genetics with intestinal
643 microbial relevant to body weight in a chicken F2 resource population. *Poult Sci* 98:4084–4093
- 644 25. Birkl P, Bharwani A, Kjaer JB, Kunze W, McBride P, Forsythe P, Harlander-Matauschek A (2018)
645 Differences in cecal microbiome of selected high and low feather-pecking laying hens. *Poult Sci*
646 97:3009–3014
- 647 26. Massacci FR, Berri M, Lemonnier G, et al (2020) Late weaning is associated with increased
648 microbial diversity and *Faecalibacterium prausnitzii* abundance in the fecal microbiota of piglets.
649 *Anim Microbiome* 2:2
- 650 27. Daum LT, Barnes WJ, McAvin JC, et al (2002) Real-time PCR detection of salmonella in suspect
651 foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol* 40:3050–3052
- 652 28. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet
653 G, Combes S, Pascal G (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*
654 34:1287–1294
- 655 29. Magoč T, Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome
656 assemblies. *Bioinforma Oxf Engl* 27:2957–2963
- 657 30. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M (2014) Swarm: robust and fast clustering
658 method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2:e593
- 659 31. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for
660 metagenomics. *PeerJ* 4:e2584
- 661 32. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG (2013)
662 Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat*
663 *Methods* 10:57–59
- 664 33. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+:
665 architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421
- 666 34. Caspi R, Billington R, Fulcher CA, et al (2018) The MetaCyc database of metabolic pathways and
667 enzymes. *Nucleic Acids Res* 46:D633–D639
- 668 35. Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Denman SE, Moore RJ (2013) Highly variable microbiota
669 development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS One* 8:e84290
- 670 36. Rubio LA (2019) Possibilities of early life programming in broiler chickens via intestinal microbiota
671 modulation. *Poult Sci* 98:695–706
- 672 37. Kaiser MG, Lamont SJ (2001) Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer
673 chicks after *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure. *Poult Sci* 80:1105–1108
- 674 38. Schou TW, Labouriau R, Permin A, Christensen JP, Sørensen P, Cu HP, Nguyen VK, Juul-Madsen
675 HR (2010) MHC haplotype and susceptibility to experimental infections (*Salmonella enteritidis*,
676 *Pasteurella multocida* or *Ascaridia galli*) in a commercial and an indigenous chicken breed. *Vet*
677 *Immunol Immunopathol* 135:52–63

- 678 39. Gast RK, Regmi P, Guraya R, Jones DR, Anderson KE, Karcher DM (2019) Colonization of internal
679 organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens of four commercial
680 genetic lines in conventional cages and enriched colony housing. *Poult Sci* 98:1785–1790
- 681 40. Girard-Santosuosso O, Lantier F, Lantier I, Bumstead N, Elsen J-M, Beaumont C (2002) Heritability
682 of susceptibility to *Salmonella* enteritidis infection in fowls and test of the role of the
683 chromosome carrying the NRAMP1 gene. *Genet Sel Evol GSE* 34:211–219
- 684 41. Lamont SJ, Kaiser MG, Liu W (2002) Candidate genes for resistance to *Salmonella* enteritidis
685 colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. *Vet Immunol Immunopathol*
686 87:423–428
- 687 42. Beaumont C, Protais J, Pitel F, et al (2003) Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier
688 state in fowl. *Poult Sci* 82:721–726
- 689 43. Chaussé A-M, Grépinet O, Bottreau E, Robert V, Hennequet-Antier C, Lalmanach A-C,
690 Lecardonnel J, Beaumont C, Velge P (2014) Susceptibility to *Salmonella* carrier-state: a possible
691 Th2 response in susceptible chicks. *Vet Immunol Immunopathol* 159:16–28
- 692 44. Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C (2010) Genetic control of resistance to salmonellosis
693 and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol* 42:11
- 694 45. Videnska P, Sisak F, Havlickova H, Faldynova M, Rychlik I (2013) Influence of *Salmonella* enterica
695 serovar Enteritidis infection on the composition of chicken cecal microbiota. *BMC Vet Res* 9:140
- 696 46. Juricova H, Videnska P, Lukac M, Faldynova M, Babak V, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2013)
697 Influence of *Salmonella* enterica serovar enteritidis infection on the development of the cecum
698 microbiota in newly hatched chicks. *Appl Environ Microbiol* 79:745–747
- 699 47. Liu L, Lin L, Zheng L, Tang H, Fan X, Xue N, Li M, Liu M, Li X (2018) Cecal microbiome profile altered
700 by *Salmonella* enterica, serovar Enteritidis inoculation in chicken. *Gut Pathog* 10:34
- 701 48. Mon KKZ, Saelao P, Halstead MM, Chanthavixay G, Chang H-C, Garas L, Maga EA, Zhou H (2015)
702 *Salmonella* enterica Serovars Enteritidis Infection Alters the Indigenous Microbiota Diversity in
703 Young Layer Chicks. *Front Vet Sci* 2:61
- 704 49. Chintoan-Uta C, Wisedchanwet T, Glendinning L, Bremner A, Psifidi A, Vervelde L, Watson K,
705 Watson M, Stevens MP (2020) Role of Cecal Microbiota in the Differential Resistance of Inbred
706 Chicken Lines to Colonization by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 86:e02607-19
- 707 50. Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, Clark AG, Ley RE (2016) Cross-species comparisons of host
708 genetic associations with the microbiome. *Science* 352:532–535
- 709 51. Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LMTE, Rebel
710 JMJ, Smits MA (2015) Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ
711 between genetically divergent broiler lines. *BMC Genomics*. 16:418
- 712 52. Zhao L, Wang G, Siegel P, et al (2013) Quantitative genetic background of the host influences gut
713 microbiomes in chickens. *Sci Rep* 3:1163
- 714 53. Pandit RJ, Hinsu AT, Patel NV, et al (2018) Microbial diversity and community composition of
715 caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA
716 amplicon sequencing. *Microbiome* 6:115

- 717 54. Meng H, Zhang Y, Zhao L, Zhao W, He C, Honaker CF, Zhai Z, Sun Z, Siegel PB (2014) Body weight
718 selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota. *PLoS One* 9:e89862
- 719 55. Mon KKZ, Zhu Y, Chanthavixay G, Kern C, Zhou H (2020) Integrative analysis of gut microbiome
720 and metabolites revealed novel mechanisms of intestinal *Salmonella* carriage in chicken. *Sci Rep*
721 10:4809
- 722 56. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*
723 159:789–799
- 724 57. Waters JL, Ley RE (2019) The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable,
725 and associated with health. *BMC Biol* 17:83
- 726 58. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al (2016) Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*
727 26:1480–1485
- 728 59. Stenman LK, Burcelin R, Lahtinen S (2016) Establishing a causal link between gut microbes, body
729 weight gain and glucose metabolism in humans - towards treatment with probiotics. *Benef*
730 *Microbes* 7:11–22
- 731 60. Litvak Y, Mon KKZ, Nguyen H, et al (2019) Commensal Enterobacteriaceae Protect against
732 *Salmonella* Colonization through Oxygen Competition. *Cell Host Microbe* 25:128-139.e5
- 733 61. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, Libby SJ, Fang FC, Raffatellu M
734 (2013) Probiotic bacteria reduce *salmonella typhimurium* intestinal colonization by competing
735 for iron. *Cell Host Microbe* 14:26–37
- 736 62. Rychlik I (2020) Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. *Anim Open Access J MDPI*.
737 10:103
- 738 63. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, et al (2010) Gut inflammation provides a respiratory
739 electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467:426–429
- 740 64. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen
741 HJM, Faber KN, Hermoso MA (2019) Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and
742 Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 10:277
- 743 65. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, et al (2019) The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an
744 Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 50:432-445.e7
- 745 66. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health.
746 *BMJ* 361:k2179
- 747 67. Zou X, Ji J, Qu H, Wang J, Shu DM, Wang Y, Liu TF, Li Y, Luo CL (2019) Effects of sodium butyrate
748 on intestinal health and gut microbiota composition during intestinal inflammation progression
749 in broilers. *Poult Sci* 98:4449–4456
- 750 68. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Velge P, Bottreau E, Fievez V, Haesebrouck F, Ducatelle
751 R (2003) Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced
752 by short-chain fatty acids. *Int J Food Microbiol* 85:237–248
- 753 69. Hiller CC, Lucca V, Carvalho D, Borsoi A, Borges KA, Furian TQ, do Nascimento VP (2019) Influence
754 of catecholamines on biofilm formation by *Salmonella Enteritidis*. *Microb Pathog* 130:54–58

- 755 70. Lyte M, Vulchanova L, Brown DR (2011) Stress at the intestinal surface: catecholamines and
756 mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Res* 343:23–32
- 757 71. Methner U, Rabsch W, Reissbrodt R, Williams PH (2008) Effect of norepinephrine on colonisation
758 and systemic spread of *Salmonella enterica* in infected animals: role of catecholate siderophore
759 precursors and degradation products. *Int J Med Microbiol IJMM* 298:429–439
- 760 72. Pullinger GD, van Diemen PM, Carnell SC, Davies H, Lyte M, Stevens MP (2010) 6-
761 hydroxydopamine-mediated release of norepinephrine increases faecal excretion of *Salmonella*
762 *enterica* serovar Typhimurium in pigs. *Vet Res* 41:68
- 763 73. Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F (2009) Quorum
764 sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet*
765 *Microbiol* 135:187–195
- 766 74. Schonewille E, Nesse LL, Hauck R, Windhorst D, Hafez HM, Vestby LK (2012) Biofilm building
767 capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *FEMS Immunol Med*
768 *Microbiol* 65:360–365
- 769 75. Higgins SE, Higgins JP, Wolfenden AD, Henderson SN, Torres-Rodriguez A, Tellez G, Hargis B
770 (2008) Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella*
771 *enteritidis* in neonatal broiler chicks. *Poult Sci* 87:27–31
- 772 76. Nakphaichit M, Sobanbua S, Siemuang S, Vongsangnak W, Nakayama J, Nitisinprasert S (2019)
773 Protective effect of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 against *Salmonella Enteritidis* challenge in
774 chickens. *Benef Microbes* 10:43–54
- 775 77. Bucher MG, Zwirzitz B, Oladeinde A, et al (2020) Reused poultry litter microbiome with
776 competitive exclusion potential against *Salmonella Heidelberg*. *J Environ Qual* 49:869–881
- 777 78. Knap I, Kehlet AB, Bennedsen M, Mathis GF, Hofacre CL, Lumpkins BS, Jensen MM, Raun M, Lay
778 A (2011) *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poult Sci*
779 90:1690–1694
- 780 79. Park JH, Kim IH (2014) Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity,
781 organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks.
782 *Poult Sci* 93:2054–2059
- 783 80. Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I (2016) Important Metabolic
784 Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Appl Environ*
785 *Microbiol* 82:1569–1576
- 786 81. Xi Y, Shuling N, Kunyuan T, Qiuyang Z, Hewen D, ChenCheng G, Tianhe Y, Liancheng L, Xin F (2019)
787 Characteristics of the intestinal flora of specific pathogen free chickens with age. *Microb Pathog*
788 132:325–334

II. Article 2 : Analyse de l'expression des gènes dans les tonsilles caecales de deux lignées expérimentales infectées par SE

Cette deuxième étude a été menée à l'INRAE sur le modèle « poulet ». Quarante-huit individus sur les 240 infectés pour l'étude présentée dans l'Article 1, ont été choisis en fonction de leur niveau de portage de SE (faible ou fort) dans les caecas en équilibrant les cofacteurs expérimentaux : « sexe », « isolateur », « lignée » et « expérimentation ». Une extraction d'ARN sur les 48 échantillons de tonsilles caecales de ces individus a été utilisée pour le séquençage et l'analyse de l'expression des gènes. Les objectifs de cette étude sont :

- D'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les individus des deux lignées génétiques N et 6₁ après l'infection par SE, dans le but d'identifier de potentielles voies de signalisation impliquées dans la résistance génétique à SE ;
- D'identifier les gènes et les voies de signalisation associés à la résistance à SE au sein d'une même lignée, entre faibles et forts porteurs ;
- Intégrer les résultats sur le microbiote de l'Article 1 à cette étude afin d'identifier les interactions entre l'hôte et le microbiote qui pourraient expliquer les différences de résistance à l'infection par le SE.

Les résultats ont montré une différence d'expression importante entre les lignées expérimentales avec plus de 7500 gènes différentiellement exprimés (DEGs) potentiellement impliqués dans 62 processus biologiques. Une comparaison entre les faibles et forts porteurs dans la lignée 6₁, a permis d'identifier 97 DEG et 23 processus biologiques contre 1034 DEGs et 288 processus biologiques dans la lignée N. Plusieurs gènes candidats associés à la résistance à SE ont été identifiés, dont par exemple *Fut2*, qui pourraient interagir avec les bactéries commensales au niveau du microbiote caecal pour contrôler l'infection par SE. Globalement, nous avons pu identifier plusieurs gènes et processus biologiques qui pourraient expliquer directement ou indirectement, par le biais du microbiote, la résistance ou la sensibilité à une infection par SE.

Cette étude a été rédigée sous forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement dans un journal scientifique pour publication.

1 Comparative analysis of caecal tonsil transcriptome in two hen lines 2 experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis

3 Authors:

4 Anaïs CAZALS^{1,2}, Andrea RAU¹, Jordi ESTELLÉ¹, Nicolas BRUNEAU¹, Jean-Luc COVILLE¹, Pierrette
5 MENANTEAU³, Marie-Noëlle ROSSIGNOL¹, Deborah JARDET¹, Claudia BEVILACQUA¹, Bertrand
6 Bed'Hom¹, Philippe VELGE³, Fanny CALENGE^{1*}

7 Institutions:

8 ¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

9 ² Mouse Genetics Laboratory, Department of Genomes and Genetics, Institut Pasteur, Paris, France

10 ³ UMR ISP, INRAE, Université F. Rabelais, 37380 Nouzilly, France

11

12 *Corresponding Author:

13 Fanny Calenge: fanny.calenge@inrae.fr

14 ABSTRACT

15 Managing *Salmonella enterica* Enteritidis (SE) carriage in chicken is a necessary challenge to ensure
16 human food safety and enhance chicken breeding viability. *Salmonella* can contaminate poultry
17 products, causing economic losses for farmers and food intoxication for human consumers. Both
18 genetic selection for a decreased carriage and gut microbiota modulation strategies could reduce
19 *Salmonella* propagation in farms.

20 Two-hundred and twenty animals from the White Leghorn inbred lines N and 6₁ were raised together
21 on floor, infected by SE at 7 days of age, transferred into isolators to prevent oro-fecal recontamination
22 and euthanized at 19 days. Caecal contents DNA were used to measure individual *Salmonella* counts
23 (ISC) by droplet digital PCR and to determine the caecal microbiota taxonomic composition by a 16S
24 rRNA gene sequencing approach, in a previous study. In this study, a RNA sequencing approach was
25 used to evaluate the gene expression in caecal tonsils after infection of 48 chicks with high or low ISC.

26 The analysis between lines allowed us to identify 7517 differentially expressed genes (DEGs) and 62
27 Gene Ontology (GO) Biological Processes (BP) terms. A comparison between high and low carriers
28 allowed us to identify 97 DEGs and 23 GO BP terms within line 6 and 1034 DEGs and 288 GO BP within
29 line N. We identified several candidate genes, including FUT2, which could interact with commensal

30 bacteria to control SE infection. Altogether, we were able to identify several genes and pathways
31 associated with differences in SE carriage level. These results are discussed in relation to individual
32 caecal microbiota compositions, which may interact with host gene expression levels for the control
33 of the caecal SE load.

34 **IMPORTANCE SECTION**

35 Integrating microbiota and host genomic data provides a better understanding of the complex
36 mechanisms involved in *Salmonella* resistance and may lead to innovative strategies to decrease
37 *Salmonella* propagation in farms. In this study, comparing two inbred chicken lines with different
38 susceptibility levels to *Salmonella* infection, we identified differentially expressed genes and pathways
39 in caecal tonsils associated with *Salmonella* resistance. Some of those genes may have an impact on
40 SE carriage through an effect on the microbiota composition.

41 **BACKGROUND**

42 *Salmonella* is a zoonotic pathogen that can cause human food intoxication. In 2019, more than 80 000
43 human salmonellosis cases were confirmed in Europe with 140 reported deaths [1]. Among these
44 cases, more than 9000 were associated with 926 food-borne outbreaks (FBOs), with a large majority
45 (72.4%) caused by the serovar *S. Enteritidis*. Eggs produced by infected layer hens seem to be the major
46 food vehicle, representing more than 37% of the FBOs. In parallel, in spite of a strict control of the
47 hygiene in farms, the systematic detection of *Salmonella* serovars and the use of vaccination, the
48 prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks increased from 2.07% in 2014 to 3.44% in 2019 [1]. In
49 chicken, the carriage is asymptomatic. The bacteria can persist a long time in the gut and can quickly
50 spread within a contaminated farm via oro-fecal recontaminations between birds [2]. Understanding
51 the impacts of factors such as host genetics or gut microbiota on *Salmonella* carriage, and even more
52 their combined impact, could lead to innovative strategies to reduce *Salmonella* transmission and
53 ensure human food safety.

54 The caecal tonsil is a major barrier controlling the entrance of the bacteria in the organism [3, 4], and
55 is therefore a material of choice to identify host factors potentially involved in the control of SE. Several
56 studies have been led on the caecal tonsil transcriptome. They helped identifying biological processes
57 associated with resistance to *Salmonella* Enteritidis [5–7], Typhimurium [8, 9] and Pullorum [10].
58 Nevertheless, in these studies, the impact of host genetics on gene expression was not considered.
59 The impact of host genetic variations has been considered in a recent study of *Campylobacter*
60 colonisation. A large number of genes differentially transcribed between the experimental inbred

61 chicken lines 6₁ and N were identified, that may underlie variation in heritable resistance to the
62 pathogen [11]. The host genetic background is an important factor in *Salmonella* infection. A number
63 of Quantitative trait loci (QTLs) and candidates genes associated with *Salmonella* resistance were
64 identified [12]. In the White Leghorn inbred lines N and 6₁ in particular, several QTLs with low to
65 moderate effects were identified [13–15]. However, no causal gene could be identified due to the
66 important length of the QTL genomic regions. More generally, only a few genes have been identified
67 for their direct implication in the control of SE load in chicken, and knowledge is lacking about the
68 mechanisms leading to genetic resistance. For the studies conducted on *Salmonella* carriage in the N
69 and 6 lines, birds were reared on floor after infection, thus allowing *Salmonella* oro-fecal
70 recontamination between birds. In the present study, we used another infection model, making use of
71 isolators. Previously tested on the experimental White Leghorn line PA12, this model showed a strong
72 reduction of oro-fecal recontaminations, leading to a much increased *Salmonella* individual variation
73 among birds [2]. It is therefore an interesting model to identify birds with highly contrasted carriage
74 levels, in order to facilitate the identification of host genes involved in these differences.

75 Another major protective barrier against *Salmonella* infection is the host gut microbiota [16, 17]. The
76 protective role of the gut microbiota toward SE colonisation has been identified a long time ago [18]
77 and has been called “competitive exclusion” [19, 20]. In several studies, the analysis of the impact of
78 *Salmonella* infection on the host microbiota composition led to the identification of specific gut
79 bacteria and biological mechanisms which could prevent *Salmonella* colonisation in chicken [21, 22].
80 Besides, the existence of a genetic control of the microbiota composition in chicken has been
81 demonstrated using several genetic backgrounds [23–25]. QTLs and SNPs associated with the
82 abundance of bacteria have been identified [26, 27] Given the importance of the gut microbiota
83 composition for the resistance to SE carriage, we hypothesize that one of the mechanisms by which
84 host genetics act on the SE carriage level may be through an effect on the gut microbiota composition.
85 This hypothesis was not contradicted by our latest study, in which we identified significant differences
86 in microbiota composition between line N, resistant and line 6₁, susceptible, and between high and
87 low carriers in line 6₁. We were able to identify some bacteria associated with *Salmonella* resistance,
88 such as the *Christensenellaceae* family [28].

89 In the current study, we led an integrative analysis using information about ceecal gene expression and
90 ceecal microbiota composition in two distinct genetic lines: the inbred chicken lines N and 6₁,
91 respectively resistant and susceptible to SE infection. The objective of this study was to:

- 92 • Identify differentially expressed genes between genetic lines in the caecal tonsils line after SE
93 infection, in order to identify potential pathways involved in the genetic resistance to SE.

- 94 • Identify genes and pathways associated with SE resistance within line (high vs low carriers)
- 95 • Link the results with those we obtained on the caecal microbiota [28] in order to identify
- 96 potential interactions between host and microbiota that could explain differences of
- 97 resistance to SE infection

98 **RESULTS**

99 Two-hundred and forty animals from the two experimental White Leghorn inbred lines N and 6₁ were

100 raised together on floor until 7 days of age. Then, chicks were challenged with *Salmonella* enterica

101 Enteritidis (SE) by oral infection and separated into four isolators. Two independent experiments were

102 conducted with a total number of 240 chicks. No clinical signs of disease were observed on the animals.

103 Caecal contents and caecal tonsils were collected at 12 days post infection.

104 Difference in the *Salmonella* Enteritidis (SE) carriage

105 The abundance of SE in caecal contents was measured by ddPCR and, as described previously,

106 significant differences of *Salmonella* abundance were observed between lines for the two experiments

107 [28]. The observed variability of carriage allowed us identifying extreme high and low carriers within

108 each line and 48 extreme animals were selected for the caecal tonsil RNA extraction by balancing the

109 factors “experiment”, “isolator” and “sex”. Different groups were identified as described in Figure 1

110 according to the line, class and experiment factors. Means, standard deviations and p-values according

111 to these groups are also describe in Figure 1.

112 Differentially expressed genes (DEGs) in caecal tonsils between lines

113 On average, more than 40M reads were sequenced for each of the 48 samples. After quality control,

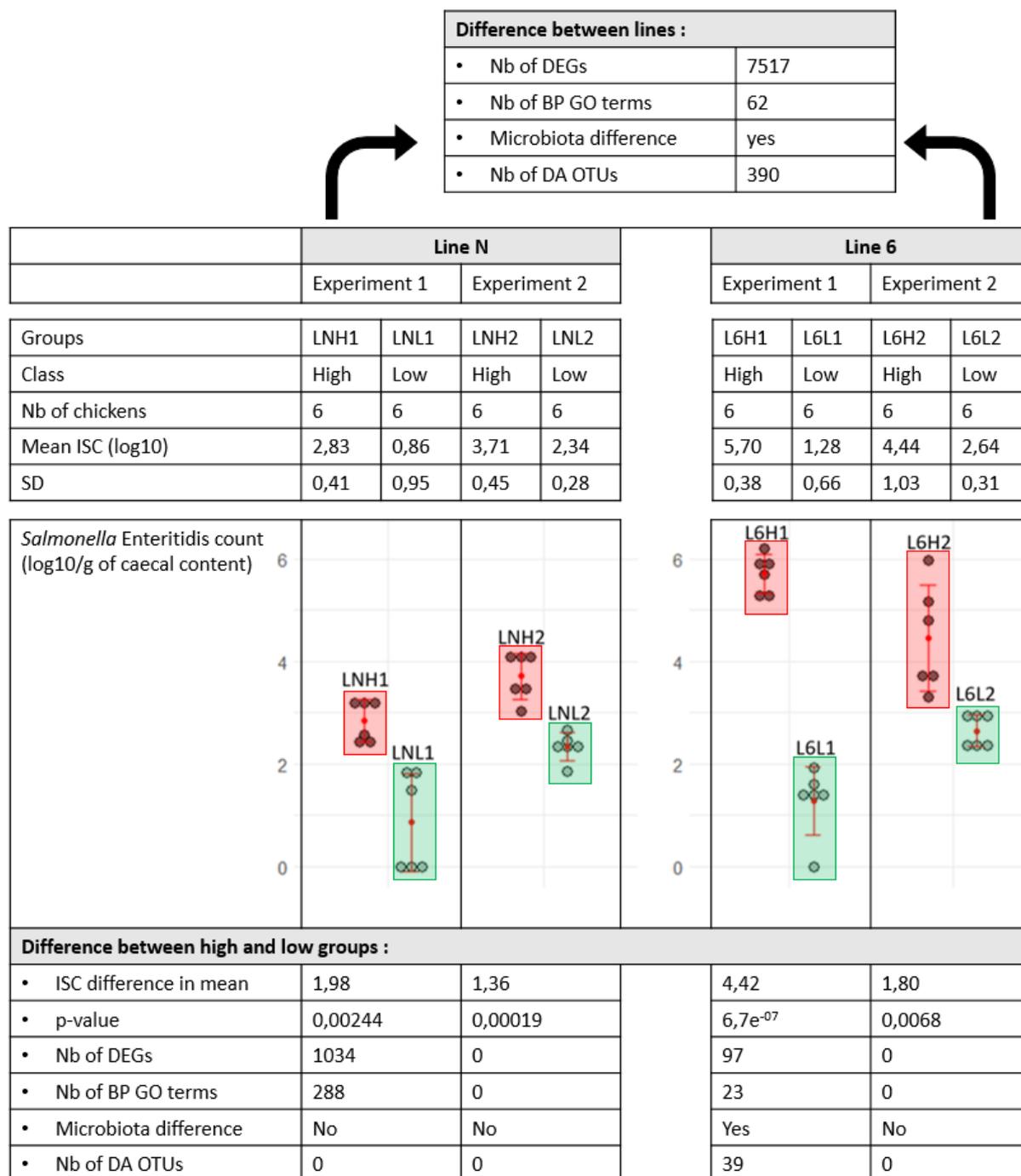
114 a total of 24,356 genes were identified and used for the following analyses. Using all the 48 samples,

115 a PCA analysis showed a distinct clustering between lines and an ANOVA analysis on the PCA1 and

116 PCA2 components showed that gene expression is significantly affected by line and sex (Figure 2 and

117 Additional file 1). A differential analysis with DESeq2 between lines allowed the identification of 7517

118 DEGs (p-adj<0.05, LFC>1.5) among which 1492 were up- and 1285 were down- regulated.



119

120

121

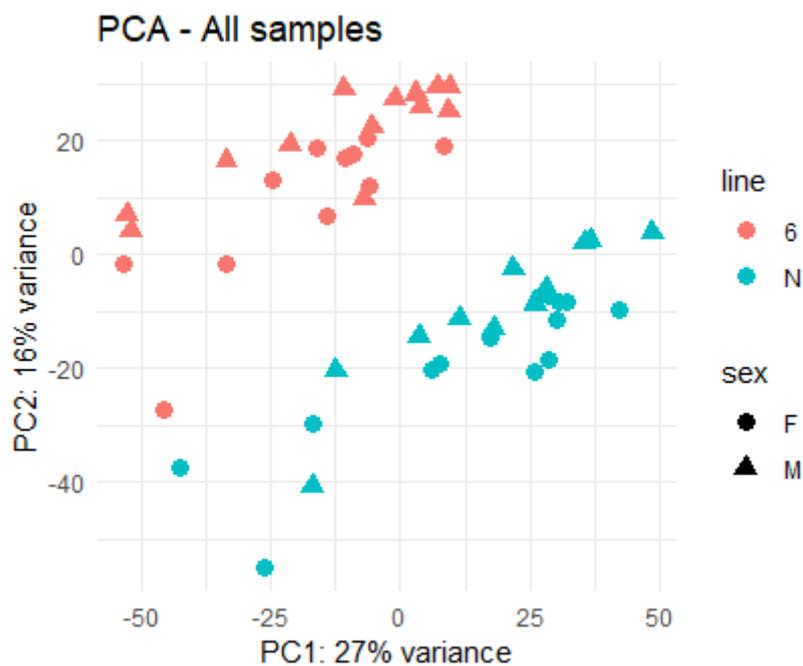
122

123

124

125

Figure 1: Summary of the results between lines and between high and low groups within lines according to the experiment. Mean and standard deviation (SD) of the *Salmonella Enteritidis* abundance at 12 dpi in caecal contents (log₁₀/g of caecal contents) of chickens groups infected with SE according to the line and experiment. Difference in mean between groups high and low carriers according to the line and experiment. Results of the DEG and BP GO terms analysis. Results of the 16S analysis from the study [28].



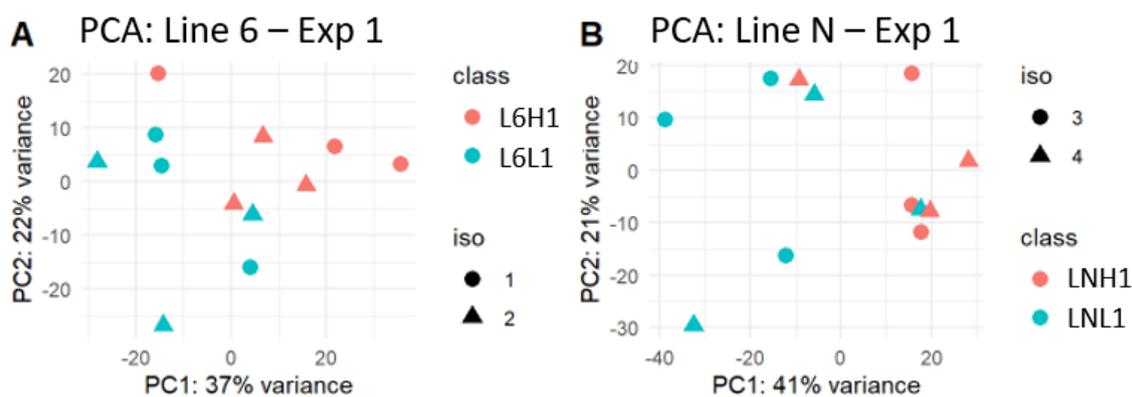
126

127 **Figure 2: Principal Component Analysis of the genes expression in caecal tonsils.** The first principal
 128 component contains 27% of the variance and may be attributed to the line effect and the second
 129 principal component contains 16% of the variance and may be attributed to the sex effect.

130 DEGs in caecal tonsils between high and low carriers

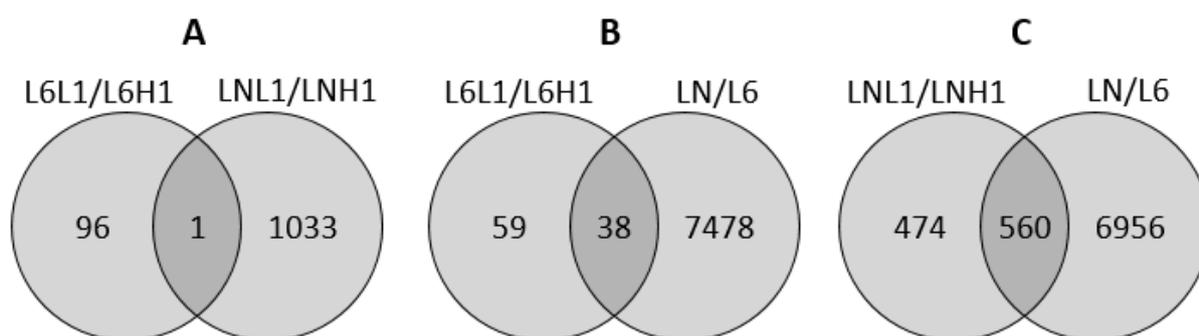
131 Gene expression levels between high and low *Salmonella* carriers within each line and each experiment
 132 (L6L1/L6H1, L6L2/L6H2 and LNL1/LNH1, LNL2/LNH2) were compared. In experiment 1, a PCA analysis
 133 showed a distinct clustering between LNH1 and LNL1 groups and between L6H1 and L6L1 groups
 134 (Figure 3) but not in equivalent groups of experiment 2. In experiment 1, an ANOVA analysis on the
 135 PCA1 and PCA2 components showed that gene expression is significantly ($P < 0.05$) affected by high/low
 136 groups and by sex but not in experiment 2 (Additional files 1).

137 A differential analysis with DESeq2 between high and low carriers within line 6 in experiment 1
 138 (L6L1/L6H1) allowed the identification of 97 DEGs (p-value < 0.05 after correction), among which 42
 139 were up- and 55 were down-regulated. A similar analysis led between high and low carriers within line
 140 N in experiment 1 (LNL1/LNH1) allowed the identification of 1034 DEGs (p-value < 0.05 after
 141 correction) with 794 up- and 240 down-regulated genes. Only 1 DEG was shared between these two
 142 comparisons (Figure 4). In experiment 2, no significant DEG were found between high and low carriers
 143 whatever the line. The results are summarized in Figure 1.



144

145 **Figure 3: Principal Component Analysis.** (A) Principal Component Analysis (PCA) of the genes
 146 expression on caecal tonsils within line 6 in experiment 1. The first principal component contains 37%
 147 of the variance and the second principal component contains 22% of the variance. (B) PCA of the
 148 genes expression on caecal tonsils within line N in experiment 1. The first principal component
 149 contains 41% of the variance and the second principal component contains 21% of the variance.



150

151 **Figure 4: Venn diagram.** Common differentially expressed genes identified by comparing different
 152 groups of animals from experiment 1. (A) Between L6L1/L6H1 and LNL1/LNH1 (high vs low carriers of
 153 lines 6 and N). (B) Between L6L1/L6H1 and LN/L6 (High vs low carriers of line 6, and lines 6 vs line N).
 154 (C) Between LNL1/LNH1 and LN/L6 (high vs low carriers of line N, and line N vs line 6).

155 DEGs common to intra-line and between lines analyses

156 When comparing differentially expressed genes identified between lines 6 and N, and within line 6
 157 between high and low carriers, 38 genes were shared. Among these shared genes, 9 genes appeared
 158 regulated in the same direction: 4 DEGs were upregulated in the resistant line N (low carriage) and in
 159 low carriers in line 6 and 5 DEGs were downregulated in line N and in low carriers in line 6 (Figure 4
 160 and Additional file 2).

161 When comparing differentially expressed genes identified between lines 6 and N and within line N
 162 between high and low carriers, 560 genes were shared. Among these shared genes, 58 genes appeared
 163 to be regulated in the same direction: 43 DEGs were upregulated in the resistant line N (low carriage)
 164 and in low carriers in line N, and 15 DEGs were downregulated in line N and in low carriers in line N
 165 (Figure 4 and Additional file 2).

166 Functional annotation analysis

167 Enrichment analyses with topGO were performed on DEGs between all animal from lines N and 6₁ and
 168 between high and low carriers within each line in experiment 1. The comparison between lines N and
 169 6₁ led to the identification of 62 Biological Processes (BP) Gene Ontology (GO) significantly enriched
 170 (p -value <0.05). The comparison between high and low carriers of lines 6₁ (L6L1/L6H1) led to the
 171 identification of 23 BP GO terms were. The comparison between high and low carriers of line N (LNH1/
 172 LNL1) led to the identification of 288 BP GO terms (Additional file 3). The results are summarized in
 173 Figure 1. Three BP GO terms were shared between the L6L1/L6H1 and N/6 analyses (Table 1), fourteen
 174 between the LNL1/LNH1 and LN/L6 analyses (Table 2) and four between the L6L1/L6H1 and LNL1/LNH1
 175 analyses (Table 3). Interestingly, the 3 GO BP enriched and shared between L6L1/L6H1 and N/6 were
 176 related to the response to biotic stimulus and other organisms (GO:0009607, GO:0043207 and
 177 GO:0051707).

GO.ID	Term
GO:0009607	response to biotic stimulus
GO:0043207	response to external biotic stimulus
GO:0051707	response to other organism

178 **Table 1: BP GO terms shared between LN/L6 and L6L1/L6H1 analyses**

GO.ID	Term
GO:0003413	chondrocyte differentiation involved in endochondral bone morphogenesis
GO:0003416	endochondral bone growth
GO:0003417	growth plate cartilage development
GO:0003418	growth plate cartilage chondrocyte differentiation
GO:0006644	phospholipid metabolic process
GO:0030835	negative regulation of actin filament depolymerization
GO:0030837	negative regulation of actin filament polymerization
GO:0032272	negative regulation of protein polymerization
GO:0043242	negative regulation of protein complex disassembly
GO:0043244	regulation of protein complex disassembly
GO:0051494	negative regulation of cytoskeleton organization
GO:0051693	actin filament capping
GO:0098868	bone growth
GO:1901880	negative regulation of protein depolymerization

179 **Table 2: BP GO term shared between LN/L6 and LNL1/LNH1 analyses**

GO.ID	Term
GO:0003008	system process
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
GO:0042592	homeostatic process
GO:0065008	regulation of biological quality

180 **Table 3: BP GO term shared between L6L1/L6H1 and LNL1/LNH1 analyses**

181 DISCUSSION

182 We explored the caecal tonsil transcriptome after *Salmonella* Enteritidis infection by comparing
 183 samples from two genetic lines displaying contrasted levels of *Salmonella* carriage after infection.
 184 Forty-eight samples were selected based on the *Salmonella* load in caecal contents 12 days after SE
 185 infection. Balancing factors “experiment” (1 or 2), “line” (N, resistant or 6₁, susceptible), “sex” (female
 186 or male) and “isolators” (1, 2, 3 or 4), chicks with the lowest *Salmonella* load were assigned to low
 187 groups and chicks with the highest *Salmonella* load were assigned to high groups. Gene expression was
 188 compared between lines N and 6₁ and between high and low carriers within each line.

189 A large difference of gene expression between lines

190 We showed a strong impact of the genetic background on gene expression in caecal tonsils with 7,514
 191 significant DEGs and 62 GO BP identified between both lines. This strong difference in gene expression
 192 between lines is likely the result of genetic differences between lines. Some of these genes could
 193 explain the differences in susceptibility to *Salmonella* between lines. Indeed, among them, several
 194 coding for the major histocompatibility complex I or II (MHCIBF2, MHCIFY5, MHCIBLB1, MHCIBLB2),
 195 for antimicrobial peptides as granzyme A and K or for avian beta-defensin 10, 13 and 14, were
 196 expressed to a greater extent in the resistant line N, probably explaining the greater resistance of this
 197 line. In the same way, the genes TLR_{1,2,4,7,15} [29–32], NOS2, Gal 13, PSAP and IGL already associated
 198 with SE resistance in genetic study in chicken [12], were more expressed in the resistant line N.

199 Interestingly, we showed previously that the caecal microbiota composition of these animals was
 200 highly different between individuals from lines N and 6₁ [28]. Thus, we can formulate the hypothesis
 201 that some of these DEGs in caecal tonsils could indirectly impact *Salmonella* carriage through the
 202 modulation of the caecal microbiota composition. Conversely, the difference of microbiota
 203 composition could indirectly impact *Salmonella* carriage through the modulation of genes expression
 204 in caecal tonsils.

205

206 A difference of gene expression between high and low carriers within line

207 Even in controlled environmental conditions with genetic inbred lines, a variability in the level of
208 *Salmonella* carriage was identified within each line, as expected with the use of isolators preventing
209 inter-individual recontamination [2]. This variability may derive from the residual genetic variability
210 remaining within each line. Or it may be caused by variations in the caecal microbiota composition,
211 which is highly variable between lines and within line 6₁ [28, 33]. However, this variability was much
212 higher in experiment 1, allowing the identification of more contrasted high and low groups than in
213 experiment 2. This higher variability in experiment 1 is probably the reason why we could identify DEGs
214 and BP GO term, whereas it was not possible in experiment 2. Thus, in experiment 1 high and low
215 carriers apparently display contrasted host responses to *Salmonella* infection, while the response in
216 experiment 2 seems to be similar between groups we identified as high and low carriers. Experimental
217 conditions were highly controlled and similar between experiments but some unchecked factors such
218 as for instance the environmental microbial exposure at hatch may differ and explain the observed
219 differences in *Salmonella* levels.

220 The two comparison analyses between high and low carriers within each line in experiment 1
221 (L6L1/L6H1 and LNL1/LNH1) showed only one DEG and four BP GO terms in common, leading us to the
222 conclusion that host pathways leading to a higher resistance differ between lines. Such a difference
223 may be explained by their genetic differences. However, one of the four common BP GO terms may
224 be directly related with the *Salmonella* infection process: the transmembrane receptor protein
225 tyrosine kinase signalling pathway (GO:0007169) is enriched in low carriers in both lines. Several
226 studies showed that the activation of protein tyrosine kinases and other specific transcription factors
227 directly affects the innate immune response during SE infection [5, 34]. Therefore, the transcriptional
228 up-regulation of this pathway may be one of the mechanisms by which the animals from both lines
229 control the infection.

230 Surprisingly, in spite of the lower difference between high and low carriers observed in line N
231 compared to line 6₁, we identified much more DEGs and BP GO term in line N, compared to line 6₁
232 (1034 DEGs and 288 BP GO terms in line N vs. 97 DEGs and 23 BP GO terms in line 6₁). Interestingly,
233 the microbiota composition was significantly different between high and low carriers in line 6₁ but not
234 between groups in line N [28]. One hypothesis could be that the largest variability in *Salmonella*
235 carriage in line 6₁, could be explained by differences in gut microbiota composition. The resistance
236 against *Salmonella* in line 6₁ may be driven by mechanisms involving the intestinal microbiota, whereas
237 in line N resistance mechanisms could be triggered by other factors, such as intra-line genetic
238 variations. Thus, DEGs identified between high and low carriers in line 6₁ could modulate the

239 microbiota composition, which could in turn act on the SE caecal load. Or conversely, these genes could
240 be modulated by the microbiota.

241 Identification of genes associated with the response to *Salmonella* infection

242 To highlight genes that may be truly associated with resistance to SE infection, we decided to discuss
243 common DEGs results between the intra-line analysis and the inter-line analysis. For example, genes
244 more expressed in both the resistant line N and in low carriers in the susceptible line 6₁, are more
245 probably associated with the resistance to SE infection. Interestingly, some of these genes have been
246 already associated with the control of *Salmonella* infection in previous studies, which confirms the
247 reliability of our analysis.

248 Four genes were identified as more expressed both in the resistant line N and in low carriers of the
249 susceptible line 6₁ and are therefore associated with *Salmonella* resistance. Three of these genes have
250 functions actually already identified toward *Salmonella*: NOS2, DMXL1 and FUT2. First, NOS2 is a gene
251 coding for the inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein involved in macrophage inflammatory
252 response [35]. Its function in the innate immunity against bacteria, viruses, fungi and parasites was
253 well established, especially against *Salmonella* Typhimurium in mice models [36–41] and in *in vitro*
254 model [42, 43]. In chicken, a transcriptome analysis of caeca showed an increase of NOS2 expression
255 in SE infected group [6], while genetic studies showed an association between NOS2 gene alleles and
256 spleen SE bacterial load [44, 45]. An *in vitro* test showed the implication of iNOS between pathogen
257 and macrophage cells during SE infection [46]. Finally, CNP (chitosan-nanoparticle) vaccination seems
258 to increase NOS2 expression and protect against SE infection in chicken [47]. Secondly, DMXL1 is a
259 gene involved in the phagosome acidification in macrophages. It seems to have an impact on innate
260 immunity and macrophage bacteria killing after an activation by the TPL-2 kinase [48]. Finally, FUT2 is
261 a gene coding for the α -1,2-fucosyltransferase enzyme involved in the glycosylation profile of the
262 gastrointestinal tract. In mice and human, it has been shown that a “non secretor” individual,
263 heterozygous for a loss-of-function mutation is more susceptible to chronic intestinal diseases such as
264 Crohn’s disease and to pathogen infection [49]. More specifically, it has been shown that “non
265 secretor” mice (*Fut*^{-/-}) show an increase of *Salmonella* Typhimurium in caecal tissue compared to wild-
266 type mice [50, 51]. Moreover, FUT2 polymorphism was associated with the human faecal microbiota
267 composition and diversity [52], which could explain host-microbe interactions and susceptibility to
268 infection [53]. Finally, it has been showed that FUT2 was associated with the abundance of
269 *Christensenellaceae* [54], a bacterium we identified as associated with *Salmonella* Enteritidis resistance
270 in the same animals [28]. This last gene, FUT2, may be an example of a gene indirectly associated with

271 SE resistance through the modulation of the microbiota composition, increasing the abundance of
272 competitive bacteria against *Salmonella*.

273 Five genes were identified as less expressed both in the resistant line N and in low carriers of the
274 susceptible line 6 and may therefore be associated with *Salmonella* susceptibility. Among these genes,
275 three belong to the cytochrome P450 family: CYP4B7, CYP2D6 and CYP2AC1. CYP enzymes play a key
276 role in metabolic processes in the intestine as the metabolism of xenobiotic substances. Metabolism
277 of CYP enzymes is closely connected with infection, inflammation and intestinal microbiota in human
278 [55, 56].

279 Forty-two genes were identified as more expressed both in the resistant line N and in low carriers of
280 the resistant line N and may therefore be associated with *Salmonella* resistance. Eight of these genes
281 have functions of interest: MHCIBF2, CLDN7, SIRT5, ENTPD1, SYT7, SLC22A23, S100B and MUC4. The
282 MHCIBF2 (Major histocompatibility complex class I antigen BF2) gene is the predominant ligand of
283 cytotoxic T lymphocytes [57]. It has been show that particular MHC I haplotype may contribute to
284 control the response to SE infection in chicken [58, 59]. The CLDN7 (claudin 7) gene is involved in the
285 formation of tight junctions between epithelial cells. It seems that a downregulation of CLDN7 by
286 pathogen could facilitate translocation of invasive bacteria across the epithelium [60]. The SIRT5
287 (sirtuin 5) gene could have large impact on cellular homeostasis and is more expressed in colorectal
288 cancer [61]. The ENTPD1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 or CD39) gene has in
289 impact on Inflammatory bowel disease (IBD) and in regulation of pro-inflammatory responses and
290 pathogen colonization [62–64] as the SLC22A23 (Solute Carriers family) gene which is associated with
291 intestinal inflammation in human [65]. The SYT7 (synaptotagmin VII) gene is associated with the
292 control of cytotoxic granule fusion in lymphocytes and in mice, lacking *syt7* have reduced ability to
293 clear an infection [66]. The following two genes could be indirectly associated with SE resistance
294 through the modulation of the microbiota composition. The S100B (S100 calcium binding protein B)
295 gene code for a signaling molecule which could be implicated in the communication mechanisms
296 between microbiota and gut and could explain differences between healthy and pathological
297 microbiota in human [67]. Finally, a decrease of MUC4 (mucin 4, cell surface associated) gene
298 expression has been associated with ST infection in pigs [68] and genetic variants in this gene have
299 been associated with the increase of gene expression relative to immune function and gut
300 homoeostasis [69]. In mice, a study showed that mucins may limit bacterial access to the epithelial
301 surface in a *C. rodentium* infection [70].

302 Fifteen genes were identified as less expressed both in the resistant line N and in low carriers of the
303 resistant line N and may therefore be associated with *Salmonella* susceptibility. Four of these genes

304 have immune functions: LECT2, DEFB4A, LOC121107850 and EXP. The LECT2 (leukocyte cell derived
305 chemotaxin 2) gene has an antibacterial function and is expressed in chicken heterophils and increase
306 in abundance in macrophage after SE infection [53]. It is also more expressed in vaccinated chicken
307 again SE. The DEFB4A (defensin beta 4A) gene has an important role in innate immunity in mucosal
308 tissues by its antimicrobial activity against various microorganisms. It has been shown that beta-defensin
309 plays a role in immunoprotection against *Salmonella* Enteritidis in *in vitro* embryonic chicken cell model
310 [54] and in the development of innate immunity in gastrointestinal tract of newly hatched chicks [55].
311 The LOC121107850 (T-cell-interacting, activating receptor on myeloid cells protein 1-like) gene codes
312 for an activating receptor on myeloid cells protein 1-like and the EPX (eosinophil peroxidase) gene
313 codes for an enzyme in myeloid, which has a function in bacterial destruction [71].

314 Finally, some of the BP GO terms identified are associated with the response to SE infection. The three
315 BP GO terms identified both between lines N and 6₁ and between high and low carriers in line 6 (LN/L6
316 and L6L1/L6H1) are interesting relatively to immunity: response to biotic stimulus, response to
317 external biotic stimulus and response to other organisms (Table 1). Seven of the fourteen BP GO
318 identified simultaneously between lines N and 6₁ and between high and low carriers in line N (LN/L6
319 and LNL1/LNH1) are related to regulation of the polymerisation or depolymerisation of proteins as
320 actin (Table 2). It has been shown that a cytoskeletal actin rearrangement is induced by SE invasion in
321 host cells [72]. Indeed, the actin cytoskeleton is targeted by *Salmonella* to promote its invasion,
322 survival and growth in cells [73]. Genes implicated in these pathways may contribute to response to
323 *Salmonella* infection and could be under genetic control.

324 CONCLUSION

325 To conclude, the two experimental genetic lines N and 6₁, displaying contrasted levels of *Salmonella*
326 carriage after infection, showed a large difference of tonsil genes expression associated with the
327 outcome to SE infection. The comparison of resistant chicks (from line N or from low carriers within
328 both lines) and susceptible chicks (from line 6₁ or from high carriers within both lines) allowed us to
329 identify several genes and pathways associated with *Salmonella* resistance. Different mechanisms
330 seem to be involved in the response to SE between these two experimental lines. A lower number of
331 DEG is associated with a higher individual variability in line 6₁ compared to line N, where a much higher
332 number of genes is associated with a lower variability. In light of our previous results obtained on the
333 caecal microbiota composition of the same animals, the difference of microbiota composition between
334 high and low, carriers in line 6₁ may be one of the explanations of this observation. Thus, we

335 hypothesize that some of the genes identified could act indirectly on *Salmonella* carriage through the
336 modulation of the microbiota composition as FUT2 on *Christensenellaceae*.

337 MATERIALS AND METHODS

338 Experimental design

339 All animal procedures were authorised by the Ethic committee: APAFIS#5833-2016062416362298v3.
340 Animals from the two experimental White Leghorn inbred lines N and 6₁ were provided by the
341 experimental unit PEAT (Pole d'Expérimentation Avicole de Tours, Nouzilly, France). As described
342 previously [28], animals were raised together on floor until infection at the PFIE unit (Plateforme
343 d'Infectiologie Expérimentale, INRA, Nouzilly, France) with free access to food and water. At 7 days of
344 age, chicks were orally infected with *Salmonella* enterica Enteritidis (Strain 775 [LA5 Nal20Sm500],
345 5.104 cfu/0.2 mL/chick) and immediately separated into isolators. These isolators allow a control of
346 the air purity and limit faecal-oral recontaminations between birds by the use of grids on the floor and
347 the decontamination of faecal drops [2]. Four isolators were used for each experiment: two isolators
348 for chicks from line N and two others for chicks from line 6₁, with 30 birds per isolator. Caecal contents
349 and caecal tonsils were collected at 12 days post infection after the animal sacrifice and were
350 immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Two experiments were conducted
351 with a total number of 240 chicks.

352 DNA extraction

353 Individual caecal DNA was extracted from an average of 200 mg of frozen caecal contents as described
354 previously [28]. In brief, samples were incubated at 70°C for 1h with 250 µl of guanidine thiocyanate
355 buffer (4 M guanidine thiocyanate–0.1 M Tris (pH 7.5) and 40 µl of 10% N-lauroyl sarcosine–0.1 M
356 phosphate buffer (pH 8.0)) and 500 µl of 5% N-lauroyl sarcosine. One volume (750 µl) of 0.1-mm-
357 diameter silica beads (Sigma) was added, and tubes were shaken for 10 min at the maximum speed of
358 a Vibrobroyeur MM200 (Retsch, Germany). Tubes were vortexed and centrifuged at 14000 rpm for 5
359 min at 4°C. After recovery of the supernatant, 30 µl of Proteinase K (Chemagic STAR DNA BTS kit, Perkin
360 Elmer, USA) were added and samples were incubated for 10 min at 70°C at 250 rpm in Multi-Therm
361 (Benchmark Scientific, USA), then for 5 min at 95°C for enzyme inactivation. Tubes were centrifuged
362 at 14000 rpm for 5 min at 4°C and supernatant was transferred to a deepwell. The plate was
363 transferred on the nucleic acid workstation Chemagic STAR (Hamilton, Perkin Elmer, USA) and the
364 extraction protocol was performed with Chemagic STAR DNA BTS kit (Perkin Elmer, USA) by the
365 @bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas, France) according to the manufacturer's instructions. DNA

366 concentration was specifically controlled by fluorometric quantification (Qubit) and DNA samples were
367 stored at -20°C.

368 *Salmonella* count by Droplet Digital PCR and choice of high and low carriers

369 As described previously [28], individual abundances of *Salmonella* Enteritidis in caecal contents at day
370 19 were obtained by Droplet Digital PCR (ddPCR) using the QX200 Droplet Digital PCR system (Bio-Rad)
371 at the @bridge platform (INRA, Jouy-en-Josas, France). Each DNA sample was diluted at 1:2 and 1:5 in
372 a final volume of 5 µl to be under PCR saturated conditions. Droplets were generated from the 20µl of
373 the total volume of amplification mix and genomic DNA (15000 to 20000 droplets per sample). The
374 amplification targeted a region of the *InvA* gene specific to *Salmonella* Enteritidis using specific
375 primers, as described by Daum et al. [26] (Additional file 1). PCR cycling condition started with an
376 enzyme activation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 min and 60°C for 1 min,
377 and ended by an enzyme deactivation step at 98°C for 10 min. For all cycling steps, we used a 2.5°C/sec
378 ramp rate. For each sample, the number of copies of *Salmonella* per gram of caecal content was
379 calculated from the average number of copies of *Salmonella* per µl of the two dilutions, assuming that
380 each amplified copy of the *InvA* gene corresponds to one *Salmonella* bacterium. Data were analysed
381 with a log transformation of the copies of *Salmonella*. Analyses of variance (Anova) were performed
382 to test the significance of differences of the copies of *Salmonella* according to different factors (line,
383 sex, experiment or isolator) using the anova function from base R (Type I sum of squares). We selected
384 48 chicks, either high or low *Salmonella* carriers based on data from ddPCR, by balancing the factors
385 experimentation, sex, isolators and line.

386 RNA extraction and sequencing

387 Caecal tonsils from the 48 high/low carrier chicks were first grinded using ULTRA-TURRAX T25 (IKA).
388 RNAs were then extracted using the NucleoSpin RNA Kit (MACHEREY-NAGEL) according to the
389 manufacturer's protocol. The quantity of RNA was measured using a Nanodrop spectrophotometer
390 (Thermo Scientific) and its quality was assessed using a 2100 Bioanalyzer Expert system using a total
391 RNA nano Kit (Agilent). RNAs were sent to the genomic platform GeT-Plage (Toulouse, France) for the
392 cDNA library preparation (TruSeq Stranded mRNA kit, Illumina) and the sequencing (NovaSeq 6000
393 Sequencing System, Illumina). Raw data will soon be deposited online.

394 Transcriptome analysis

395 The quality controls of raw reads was analysed using the FastQC program. A trimming was performed
396 using the Sickle program version 1.33. Reads were then mapped on the *Gallus gallus* reference genome

397 (Gallus_gallus.GRCg6a.98.gtf) with the STAR program version 2.5.3a [74]. Genes were counted with
398 the htseq-count version 0.12.4 [75]. Finally, counts samples files were merged using R version 3.6.1.

399

400 Statistical analyses

401 The metadata table and the genes count table have been included as Additional files 4 and 5,
402 respectively. PCA analysis and ANOVA test on PCA components were performed with stats package
403 (3.6.1). The DESeq2 package (1.26.0) was used with R version 3.6.1 to perform differential gene
404 expression analyses. In our model, the sex and the isolator effects were fixed. Genes with an adjusted
405 p-value < 0.05 were considered as differentially expressed genes (DEGs). The ggplot2 (3.2.1) and
406 pheatmap (1.0.12) packages were used for principal component analysis (PCA) and others visualisation
407 methods. The enrichment analyses were performed with topGO package version 2.38.1 [76].

408 LIST OF ABBREVIATIONS

409 SE: *Salmonella* Enteritidis

410 QTL: Quantitative Trait Loci

411 ISC: Individual *Salmonella* Carriage

412 DEG: differentially expressed genes

413 GO: Gene Ontology

414 BP: Biological Processes

415 FBO: Food-Borne Outbreaks

416 SD: Standard Deviation

417 PCA: Principal Component Analysis

418 ANOVA: ANalysis Of Variance

419 ADDITIONAL FILES

420 **Additional file 1:** ANOVA analysis results on PCA1 and PCA2 components (TXT)

421 **Additional file 2:** DEGs between LN and L6 groups, L6H1 and L6L1 groups, LNL1 and LNH1 groups.
422 Common differentially expressed genes between LN/L6 analysis and L6L1/L6H1 analysis and between
423 LN/L6 analysis and LNL1/LNH1 analysis (XLSX)

424 **Additional file 3:** Biological Processes (BP) Gene Ontology (GO) terms performed on DEGs between
425 high and low carriers in line 6₁ - experiment 1 (XLSX)

426 **Additional file 4:** Metadata table (XLSX)

427 **Additional file 5:** Genes count table (XLSX)

428 REFERENCES

- 429 1. EFSA (2021) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J* 2021 19:6406
- 430 2. Menanteau P, Kempf F, Trotureau J, Virlogeux-Payant I, Gitton E, Dalifard J, Gabriel I, Rychlik I,
431 Velge P (2018) Role of systemic infection, cross contaminations and super-shedders in *Salmonella*
432 carrier state in chicken. *Environ Microbiol* 20:3246–3260
- 433 3. Setta AM, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA (2012) Early immune dynamics following infection with
434 *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and
435 chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. *Comp Immunol*
436 *Microbiol Infect Dis* 35:397–410
- 437 4. Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U (2007) Chicken cecum immune
438 response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. *Infect Immun*
439 75:5993–6007
- 440 5. Kogut MH, Swaggerty CL, Byrd JA, Selvaraj R, Arsenault RJ (2016) Chicken-Specific Kinome Array
441 Reveals that *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Modulates Host Immune Signaling Pathways
442 in the Cecum to Establish a Persistence Infection. *Int J Mol Sci* 17:1207
- 443 6. Matulova M, Varmuzova K, Sisak F, Havlickova H, Babak V, Stejskal K, Zdrahal Z, Rychlik I (2013)
444 Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.
445 *Vet Res* 44:37
- 446 7. Luan DQ, Chang GB, Sheng ZW, Zhang Y, Zhou W, Li ZZ, Liu Y, Chen GH (2012) Analysis of Gene
447 Expression Responses to a *Salmonella* Infection in Rugao Chicken Intestine Using GeneChips.
448 *Asian-Australas J Anim Sci* 25:278–285
- 449 8. Wang F, Zhang J, Zhu B, Wang J, Wang Q, Zheng M, Wen J, Li Q, Zhao G (2019) Transcriptome
450 Analysis of the Cecal Tonsil of Jingxing Yellow Chickens Revealed the Mechanism of Differential
451 Resistance to *Salmonella*. *Genes*. 10:979
- 452 9. Khan S, Chousalkar KK (2020) Transcriptome profiling analysis of caeca in chicks challenged with
453 *Salmonella Typhimurium* reveals differential expression of genes involved in host mucosal
454 immune response. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:9327–9342
- 455 10. Ma T, Chang G, Chen R, et al (2014) Identification of key genes in the response to *Salmonella*
456 *enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Pullorum, and poly(I:C) in chicken spleen and caecum.
457 *BioMed Res Int* 2014:154946
- 458 11. Russell KM, Smith J, Bremner A, Chintoan-Uta C, Vervelde L, Psifidi A, Stevens MP (2021)
459 Transcriptomic analysis of caecal tissue in inbred chicken lines that exhibit heritable differences
460 in resistance to *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics* 22:411

- 461 12. Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C (2010) Genetic control of resistance to salmonellosis
462 and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol* 42:11
- 463 13. Tilquin P, Barrow PA, Marly J, Pitel F, Plisson-Petit F, Velge P, Vignal A, Baret PV, Bumstead N,
464 Beaumont C (2005) A genome scan for quantitative trait loci affecting the *Salmonella* carrier-
465 state in the chicken. *Genet Sel Evol GSE* 37:539–561
- 466 14. Calenge F, Lecerf F, Demars J, Feve K, Vignoles F, Pitel F, Vignal A, Velge P, Sellier N, Beaumont C
467 (2009) QTL for resistance to *Salmonella* carrier state confirmed in both experimental and
468 commercial chicken lines. *Anim Genet* 40:590–597
- 469 15. Calenge F, Vignal A, Demars J, Fève K, Menanteau P, Velge P, Beaumont C (2011) New QTL for
470 resistance to *Salmonella* carrier-state identified on fowl microchromosomes. *Mol Genet*
471 *Genomics* 285:237–243
- 472 16. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ,
473 Cox NA (2014) The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* 360:100–112
- 474 17. Clavijo V, Flórez MJV (2018) The gastrointestinal microbiome and its association with the control
475 of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poult Sci* 97:1006–1021
- 476 18. Nurmi E, Rantala M (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*
477 241:210–211
- 478 19. Impey CS, Mead GC, George SM (1982) Competitive exclusion of salmonellas from the chick
479 caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird.
480 *J Hyg (Lond)* 89:479–490
- 481 20. Mead GC, Barrow PA (1990) *Salmonella* control in poultry by ‘competitive exclusion’ or
482 immunization. *Lett Appl Microbiol* 10:221–227
- 483 21. Mon KKZ, Zhu Y, Chanthavixay G, Kern C, Zhou H (2020) Integrative analysis of gut microbiome
484 and metabolites revealed novel mechanisms of intestinal *Salmonella* carriage in chicken. *Sci Rep*
485 10:4809
- 486 22. Litvak Y, Mon KKZ, Nguyen H, et al (2019) Commensal Enterobacteriaceae Protect against
487 *Salmonella* Colonization through Oxygen Competition. *Cell Host Microbe* 25:128-139.e5
- 488 23. Pandit RJ, Hinsu AT, Patel NV, et al (2018) Microbial diversity and community composition of
489 caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA
490 amplicon sequencing. *Microbiome* 6:115
- 491 24. Richards P, Fothergill J, Bernardeau M, Wigley P (2019) Development of the Caecal Microbiota in
492 Three Broiler Breeds. *Front Vet Sci.* 6:201
- 493 25. Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LMTE, Rebel
494 JMJ, Smits MA (2015) Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ
495 between genetically divergent broiler lines. *BMC Genomics.* 16:418
- 496 26. Mignon-Grasteau S, Narcy A, Rideau N, Chantry-Darmon C, Boscher M-Y, Sellier N, Chabault M,
497 Konsak-Ilievski B, Bihan-Duval EL, Gabriel I (2015) Impact of Selection for Digestive Efficiency on
498 Microbiota Composition in the Chicken. *PLOS ONE* 10:e0135488

- 499 27. Ji J, Luo CL, Zou X, Lv XH, Xu YB, Shu DM, Qu H (2019) Association of host genetics with intestinal
500 microbial relevant to body weight in a chicken F2 resource population. *Poult Sci* 98:4084–4093
- 501 28. Cazals A, Estellé J, Bruneau N, et al (2021) Impact of Host Genetics on Caecal Microbiota
502 Composition and on Salmonella Carriage in Chicken. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-76645/v1>
- 503 29. Nerren JR, Swaggerty CL, MacKinnon KM, Genovese KJ, He H, Pevzner I, Kogut MH (2009)
504 Differential mRNA expression of the avian-specific toll-like receptor 15 between heterophils from
505 Salmonella-susceptible and -resistant chickens. *Immunogenetics* 61:71–77
- 506 30. Abasht B, Kaiser MG, Lamont SJ (2008) Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of
507 advanced intercross line chicks infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet*
508 *Immunol Immunopathol* 123:314–323
- 509 31. MacKinnon KM, He H, Nerren JR, Swaggerty CL, Genovese KJ, Kogut MH (2009) Expression profile
510 of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella enteritidis*-infected
511 broiler chickens. *Vet Microbiol* 137:313–319
- 512 32. Swaggerty CL, He H, Genovese KJ, Duke SE, Kogut MH (2012) Loxoribine pretreatment reduces
513 *Salmonella Enteritidis* organ invasion in 1-day-old chickens. *Poult Sci* 91:1038–1042
- 514 33. Kempf F, Menanteau P, Rychlik I, et al (2020) Gut microbiota composition before infection
515 determines the *Salmonella* super- and low-shedder phenotypes in chicken. *Microb Biotechnol*
516 13:1611–1630
- 517 34. Swaggerty CL, He H, Genovese KJ, Pevzner IY, Kogut MH (2011) Protein tyrosine kinase and
518 mitogen-activated protein kinase signalling pathways contribute to differences in heterophil-
519 mediated innate immune responsiveness between two lines of broilers. *Avian Pathol J WVPA*
520 40:289–297
- 521 35. McNeill E, Crabtree MJ, Sahgal N, Patel J, Chuaiphichai S, Iqbal AJ, Hale AB, Greaves DR, Channon
522 KM (2015) Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals
523 specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. *Free Radic Biol Med* 79:206–
524 216
- 525 36. Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, Dougan G (2000)
526 Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in
527 experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J Exp*
528 *Med* 192:237–248
- 529 37. Cherayil BJ, Antos D (2001) Inducible nitric oxide synthase and *Salmonella* infection. *Microbes*
530 *Infect* 3:771–776
- 531 38. Sebastiani G, Blais V, Sancho V, Vogel SN, Stevenson MM, Gros P, Lapointe J-M, Rivest S, Malo D
532 (2002) Host Immune Response to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Mice
533 Derived from Wild Strains. *Infect Immun* 70:1997–2009
- 534 39. Roy M-F, Malo D (2002) Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice.
535 *Genes Immun* 3:381–393
- 536 40. Jennewein J, Matuszak J, Walter S, et al (2015) Low-oxygen tensions found in *Salmonella*-infected
537 gut tissue boost *Salmonella* replication in macrophages by impairing antimicrobial activity and
538 augmenting *Salmonella* virulence. *Cell Microbiol* 17:1833–1847

- 539 41. Yadav S, Pathak S, Sarikhani M, Majumdar S, Ray S, Chandrasekar BS, Adiga V, Sundaresan NR,
540 Nandi D (2018) Nitric oxide synthase 2 enhances the survival of mice during *Salmonella*
541 *Typhimurium* infection-induced sepsis by increasing reactive oxygen species, inflammatory
542 cytokines and recruitment of neutrophils to the peritoneal cavity. *Free Radic Biol Med* 116:73–
543 87
- 544 42. Cristina Cerquetti M, Hovsepian E, Sarnacki SH, Goren NB (2008) *Salmonella enterica* serovar
545 Enteritidis dam mutant induces low NOS-2 and COX-2 expression in macrophages via attenuation
546 of MAPK and NF- κ B pathways. *Microbes Infect* 10:1431–1439
- 547 43. Nairz M, Schleicher U, Schroll A, et al (2013) Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1
548 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *J Exp Med*
549 210:855–873
- 550 44. Malek M, Lamont SJ (2003) Association of INOS, TRAIL, TGF-beta2, TGF-beta3, and IgL genes with
551 response to *Salmonella enteritidis* in poultry. *Genet Sel Evol GSE* 35 Suppl 1:S99-111
- 552 45. Tohidi R, Idris IB, Panandam JM, Bejo MH (2012) The effects of polymorphisms in IL-2, IFN- γ , TGF-
553 β 2, IgL, TLR-4, MD-2, and iNOS genes on resistance to *Salmonella enteritidis* in indigenous
554 chickens. *Avian Pathol J WVPA* 41:605–612
- 555 46. He H, Arsenault RJ, Genovese KJ, Johnson C, Kogut MH (2018) Chicken macrophages infected
556 with *Salmonella* (*S.*) *Enteritidis* or *S. Heidelberg* produce differential responses in immune and
557 metabolic signaling pathways. *Vet Immunol Immunopathol* 195:46–55
- 558 47. Acevedo-Villanueva K, Renu S, Gourapura R, Selvaraj R (2021) Efficacy of a nanoparticle vaccine
559 administered in-ovo against *Salmonella* in broilers. *PLoS One* 16:e0247938
- 560 48. Breyer F, Härtlova A, Thurston T, et al (2021) TPL-2 kinase induces phagosome acidification to
561 promote macrophage killing of bacteria. *EMBO J* 40:e106188
- 562 49. Galeev A, Suwandi A, Cepic A, Basu M, Baines JF, Grassl GA (2021) The role of the blood group-
563 related glycosyltransferases FUT2 and B4GALNT2 in susceptibility to infectious disease. *Int J Med*
564 *Microbiol IJMM* 311:151487
- 565 50. Goto Y, Obata T, Kunisawa J, et al (2014) Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell
566 glycosylation. *Science* 345:1254009
- 567 51. Suwandi A, Galeev A, Riedel R, et al (2019) Std fimbriae-fucose interaction increases *Salmonella*-
568 induced intestinal inflammation and prolongs colonization. *PLoS Pathog* 15:e1007915
- 569 52. Wacklin P, Tuimala J, Nikkilä J, et al (2014) Faecal microbiota composition in adults is associated
570 with the FUT2 gene determining the secretor status. *PLoS One* 9:e94863
- 571 53. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ (2017) Human genetic variation and the gut microbiome in disease.
572 *Nat Rev Genet* 18:690–699
- 573 54. Waters JL, Ley RE (2019) The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable,
574 and associated with health. *BMC Biol* 17:83
- 575 55. Stavropoulou E, Pircalabioru GG, Bezirtzoglou E (2018) The Role of Cytochromes P450 in
576 Infection. *Front Immunol* 9:89

- 577 56. Bezirtzoglou EEV (2012) Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its
578 probiotic profile. *Microb Ecol Health Dis.* 23
- 579 57. Kaufman J (2020) From Chickens to Humans: The Importance of Peptide Repertoires for MHC
580 Class I Alleles. *Front Immunol* 11:601089
- 581 58. Zhou H, Lamont SJ (2003) Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics
582 in adult chickens. *Immunogenetics* 55:133–140
- 583 59. Liu W, Miller MM, Lamont SJ (2002) Association of MHC class I and class II gene polymorphisms
584 with vaccine or challenge response to *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Immunogenetics*
585 54:582–590
- 586 60. Clarke TB, Francella N, Huegel A, Weiser JN (2011) Invasive Bacterial Pathogens Exploit TLR-
587 Mediated Downregulation of Tight Junction Components to Facilitate Translocation across the
588 Epithelium. *Cell Host Microbe* 9:404–414
- 589 61. Kumar S, Lombard DB (2018) Functions of the sirtuin deacylase SIRT5 in normal physiology and
590 pathobiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53:311–334
- 591 62. Vuerich M, Mukherjee S, Robson SC, Longhi MS (2020) Control of Gut Inflammation by
592 Modulation of Purinergic Signaling. *Front Immunol* 11:1882
- 593 63. Zeng J, Ning Z, Wang Y, Xiong H (2020) Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int*
594 *Immunopharmacol* 89:107055
- 595 64. Alam MS, Costales MG, Cavanaugh C, Williams K (2015) Extracellular adenosine generation in the
596 regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization. *Biomolecules* 5:775–792
- 597 65. Serrano León A, Amir Shaghaghghi M, Yurkova N, Bernstein CN, El-Gabalawy H, Eck P (2014) Single-
598 nucleotide polymorphisms in SLC22A23 are associated with ulcerative colitis in a Canadian white
599 cohort. *Am J Clin Nutr* 100:289–294
- 600 66. Sleiman M, Stevens DR, Chitirala P, Rettig J (2020) Cytotoxic Granule Trafficking and Fusion in
601 Synaptotagmin7-Deficient Cytotoxic T Lymphocytes. *Front Immunol* 11:1080
- 602 67. Orsini M, Di Liddo R, Valeriani F, Mancin M, D’Inca R, Castagnetti A, Aceti A, Parnigotto PP,
603 Romano Spica V, Michetti F (2020) In Silico Evaluation of Putative S100B Interacting Proteins in
604 Healthy and IBD Gut Microbiota. *Cells* 9:E1697
- 605 68. Kim CH, Kim D, Ha Y, Cho K-D, Lee BH, Seo IW, Kim S-H, Chae C (2009) Expression of mucins and
606 trefoil factor family protein-1 in the colon of pigs naturally infected with *Salmonella typhimurium*.
607 *J Comp Pathol* 140:38–42
- 608 69. Luise D, Motta V, Bertocchi M, Salvarani C, Clavenzani P, Fanelli F, Pagotto U, Bosi P, Trevisi P
609 (2019) Effect of Mucine 4 and Fucosyltransferase 1 genetic variants on gut homeostasis of
610 growing healthy pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 103:801–812
- 611 70. Lindén SK, Florin THJ, McGuckin MA (2008) Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS*
612 *One* 3:e3952
- 613 71. Sakamaki K, Tomonaga M, Tsukui K, Nagata S (1989) Molecular cloning and characterization of a
614 chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *J Biol Chem* 264:16828–16836

-
- 615 72. La Ragione RM, Cooley WA, Velge P, Jepson MA, Woodward MJ (2003) Membrane ruffling and
616 invasion of human and avian cell lines is reduced for aflagellate mutants of *Salmonella enterica*
617 serotype Enteritidis. *Int J Med Microbiol* 293:261–272
- 618 73. Guiney DG, Lesnick M (2005) Targeting of the actin cytoskeleton during infection by *Salmonella*
619 strains. *Clin Immunol Orlando Fla* 114:248–255
- 620 74. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR
621 (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma Oxf Engl* 29:15–21
- 622 75. Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput
623 sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169
- 624 76. Alexa A, Rahnenfuhrer J (2021) topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology.
625 <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.topGO>

III. Analyses complémentaires : Impact de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote fécal avant et après infection par SE

Résumé de l'étude

Les rôles des variations génétiques et du microbiote intestinal sur le portage de salmonelles ont été démontrés indépendamment chez la poule, mais ils pourraient interagir. L'étude de l'effet du fond génétique sur la composition du microbiote d'animaux infectés permet de mieux comprendre cette interaction. Dans cette étude, nous avons comparé le microbiote fécal avant infection (J6) et 7 jours après infection (J14) par *Salmonella* Enteritidis (SE) de deux lignées expérimentales de White Leghorn : la lignée N (résistante) et la lignée G₁ (sensible). Des difficultés d'extraction d'ADN et de quantification du nombre de *Salmonella* à J7 PI (post-infection) nous conduisent à considérer les résultats avec prudence.

Nous avons identifié des différences de diversité et de composition du microbiote fécal entre J6 et J14 en considérant l'ensemble des individus avec 12 genres bactériens différentiellement abondants (DA) avant/après infection. Nous avons également identifié des différences de composition du microbiote fécal entre les deux lignées génétiques avant infection par SE. Cette observation nous permet d'émettre l'hypothèse que des différences de composition du microbiote avant infection, contrôlées par la génétique de l'hôte, pourraient expliquer une part des différences de résistance à SE observées à J19 entre lignées. Enfin, nous n'avons pas observé de différences de composition du microbiote fécal avant infection (J6) entre animaux identifiés comme faibles et forts porteurs de SE dans les caecas après infection (J19), quelle que soit la lignée expérimentale. Une analyse sPLSDA (*sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis*) ne semble pas montrer qu'il soit possible de prédire le portage caecal à J19 en se basant sur la composition fécale avant infection à J6. Néanmoins, des genres bactériens tel que les *Pediococcus* ou *Enterococcus* ont été trouvés comme significativement différentiellement abondants entre les groupes faibles et forts porteurs à J6 et pourraient expliquer les différences de portages observées à J19.

1) Introduction et objectifs

Salmonella est une des premières causes d'intoxication alimentaire chez l'Homme à travers la consommation de produits (viande ou œufs) contaminés. La sélection d'individus résistants à la colonisation et au portage de *Salmonella* ainsi que la modulation de la composition du microbiote intestinal sont deux solutions prometteuses pour diminuer le portage individuel de *Salmonella* chez la poule en complément des méthodes déjà employées. Dans notre étude, des échantillons de fèces ont été collectés à différentes dates afin de mesurer la quantité de salmonelles qu'ils contiennent par étalement sur gélose. Cependant, la contamination des animaux par des *E. coli* résistantes à l'antibiotique utilisé pour la sélection des salmonelles nous a empêché de les utiliser à cette fin. Compte tenu du rôle démontré du microbiote intestinal avant infection dans l'excrétion de salmonelles [251], il nous a semblé intéressant de tenter d'extraire l'ADN de ces échantillons pour évaluer la composition du microbiote fécal et mesurer la quantité de salmonelles par ddPCR. Le prélèvement de fèces étant non invasif, nous pouvons obtenir des données de composition au cours du temps sur le même individu et répondre à de nouvelles questions de recherche.

L'extraction d'ADN fécal chez la poule est notoirement difficile du fait de la présence d'urée, mélangée au contenu intestinal ou caecal dans le cloaque. Par ailleurs, la composition des fientes peut être hétérogène selon leur provenance caecale ou intestinale, du fait d'une contraction indépendante des caecas par rapport au reste du système digestif [226]. Enfin, quelques études rapportent que la composition du microbiote fécal est qualitativement proche de celle des caecas mais quantitativement différente [301, 302]. Ici nous ne pouvons pas comparer les compositions des microbiotes fécal/caecal car nous ne disposons pas de prélèvements effectués à la même date sur les mêmes animaux.

Les objectifs de cette étude sont :

- D'étudier la composition du microbiote fécal avant infection par SE chez de jeunes poussins (6 jours d'âge) élevés au sol ensemble et 7 jours après infection (14 jours d'âge) ;
- De mesurer la quantité de salmonelles dans les fèces après infection par ddPCR ;
- D'étudier l'impact de la génétique de l'hôte (lignées N ou 6₁) sur la composition du microbiote fécal avant et après infection par SE ;

- D'identifier si une composition du microbiote avant infection peut être associée au caractère faible ou fort porteur de SE dans les caecas douze jours après infection (J19) afin d'identifier des bactéries prédictives de la résistance ou de la sensibilité à *Salmonella* et/ou impliquées dans la résistance à *Salmonella*.

2) Matériel et méthodes

Rappel du dispositif expérimental

Deux expérimentations d'infection par SE pour un total de 240 poussins des lignées expérimentales N et 6₁ ont été menées à un mois d'intervalle (cf. Article 1 pour plus de détails). Des échantillons de fèces ont été prélevés 1 jour avant infection (J6) et 7 jours après infection (J14) et ont été immédiatement congelés à -80°C. Puis, 96 extractions d'ADN ont été réalisées pour 48 individus, soit 48 échantillons pour J6 et 48 échantillons pour J14 (Figure 1), choisis en fonction du caractère faible ou fort porteur de *Salmonella* dans les caecas à J19 et en équilibrant les covariables (lignée, sexe, isolateurs et expérimentation). Ces ADN ont été utilisés pour quantifier le nombre de *Salmonella* à J14 par ddPCR et pour séquencer les amplicons du gène de l'ARN ribosomique 16S à J6 et J14 pour l'étude de la diversité et de la composition du microbiote fécal. Toutes les procédures expérimentales ont été autorisées par un comité d'éthique (APAFIS#5833-2016062416362298v3).

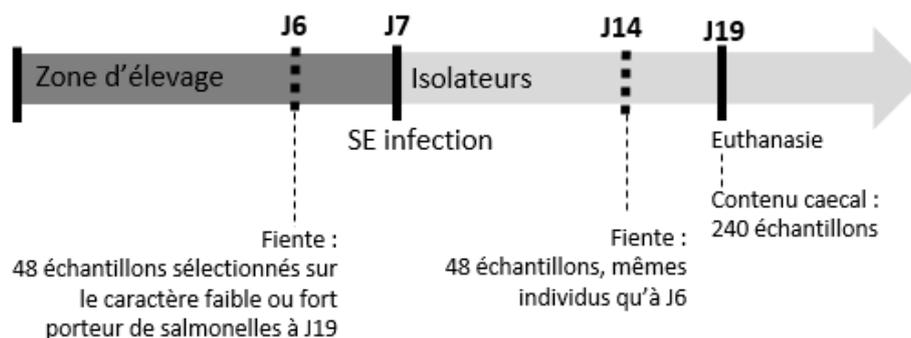


Figure 1 : Dispositif expérimental

Extraction des ADNs et amplifications 16S

Nous avons utilisé un protocole d'extraction élaboré à l'INRAE de Nouzilly, basé sur l'utilisation du Kit d'extraction Qiagen QIAamp DNA Mini Kit. Une première étape visant à rompre chimiquement et mécaniquement les parois cellulaires bactériennes a été réalisée. Dans un

tube Starstedt stérile de 2 mL contenant 0,4 g de billes de verre, 25mg de fèces puis 1mL de solution de lyse (SDS 4%/EDTA 0,05M/Tris 0,05M/NaCl 0.5M) à 37°C ont été ajoutés. Les tubes ont été ensuite vortexés puis homogénéisés et broyés (Mixer Mill MM 301, Retsch GmbH) pendant 3 min à vitesse maximale (fréquence de 30/sec). Ils ont ensuite été chauffés au bain-marie à 70°C pendant 15 min puis centrifugés 5 min à 16 000 x g à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et 300 µL de solution de lyse ont été ajoutés aux culots pour être vortexés, homogénéisés, incubés à 70°C et centrifugés comme précédemment afin de récupérer le surnageant pour compléter les tubes contenant le premier surnageant. Dans une deuxième étape, les ADNs des surnageants ont été extraits sur colonnes de silice QIAamp (Kit Qiagen QIAamp DNA Mini) selon les instructions fournies par le fabricant afin d'éliminer les inhibiteurs de PCR présents dans les fèces. Les quantités et les qualités des ADNs ont été mesurées au Nanodrop et au Qubit (quantification fluorométrique).

Quantification des *Salmonella* et séquençage 16S

Pour le détail des méthodes utilisées pour la quantification des salmonelles et le séquençage 16S, se référer à la partie « Methods » de l'article 1. En résumé, la quantification du nombre de *Salmonella* dans les 48 ADNs extraits des fèces à J7 PI a été réalisée par ddPCR en ciblant le gène *InvA* spécifique à *Salmonella* (Figure 2). Le séquençage 16S des 96 ADNs à J6 et J7PI a été réalisé sur la plateforme @bridge de l'INRAE de Jouy-en-Josas en utilisant la technologie Illumina MiSeq.

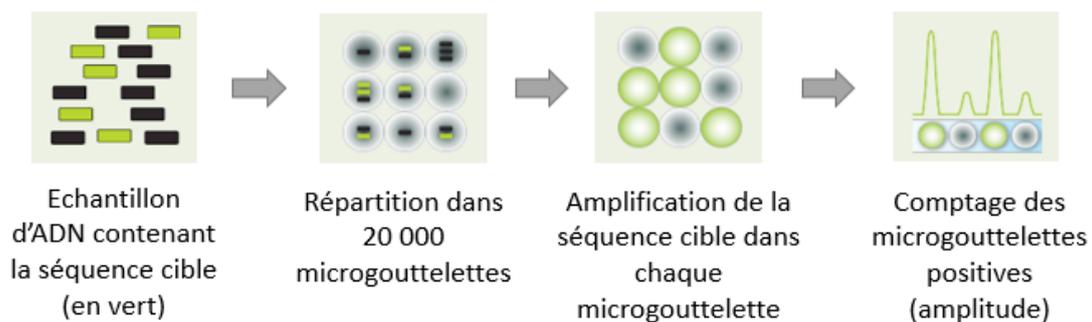


Figure 2 : Rappel du principe de la quantification d'une séquence cible dans un échantillon d'ADN par ddPCR. Dans notre cas, la séquence cible est le gène *InvA* spécifique à *Salmonella*.

Analyses bio-informatiques et bio-statistiques

Pour le détail des méthodes utilisées pour les analyses bio-informatiques et bio-statistiques, se référer à la partie « Methods » de l'article 1. En résumé, les analyses de bio-informatique des séquences 16S ont été réalisées avec le pipeline FROGS pour l'identification des OTUs et l'élaboration des tables d'abondance. Les analyses de bio-statistiques ont été réalisées sous R version 3.5-5 avec les packages phyloseq (1.24.2) et vegan (2.5-3) pour les analyses de diversité et pour la normalisation des données et le package metagenomeSeq (1.24.1) pour identifier les OTUs différenciellement abondantes. Enfin, une analyse sPLSDA (*sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis*) a été réalisée avec le package MixOmic (6.10.6).

3) Résultats et discussion

Extractions des ADN de fientes

Pour les extractions d'ADN de fèces, très peu de matériel biologique était disponible, en moyenne environ 30 mg. Ces faibles quantités ne nous ont pas permis de renouveler les extractions sur les échantillons n'ayant pas fonctionné. Avant l'utilisation du protocole élaboré par des collègues de l'INRAE à Nouzilly, un autre protocole d'extraction plus classique (phénol/chloroforme) avait été utilisé. La quantité d'ADN extraite était correcte (environ 100 ng/μL) mais les qualités des ADN étaient trop faibles, ne permettant pas les amplifications des régions 16S des chromosomes bactériens pour le séquençage 16S. La présence d'inhibiteur de PCR comme l'urée ou les sels biliaires dans ces échantillons extraits par cette méthode pourrait expliquer ces résultats non concluants. Avec le protocole élaboré à Nouzilly, nous avons pu extraire en moyenne 5ng/μL d'ADN soit une faible quantité, mais de qualité suffisante pour permettre les amplifications des régions 16S des chromosomes bactériens. On peut toutefois se demander si des quantités aussi faibles d'ADN sont bien représentatives de l'ensemble de l'ADN, donc des bactéries, présent dans l'échantillon.

Mesure de la quantité de *Salmonella* dans les fientes à J7 PI par ddPCR

Nous avons analysé la quantité de *Salmonella* dans les fientes à J7 PI par ddPCR en ciblant le gène *InvA* spécifique de *Salmonella* Enteritidis. Comme présenté sur la Figure 3, la quantification par ddPCR a fonctionné seulement sur deux échantillons d'ADN. En effet, les deux échantillons des deux premières colonnes de la Figure 3, présentent des microgouttelettes positives (en bleu) montrant la présence du gène *InvA* spécifique à SE dans

ces échantillons (même profil que les deux témoins positifs). Les échantillons suivants ne présentent pas assez de microgouttelettes positives (comparés aux témoins négatifs) pour mesurer une quantité de *Salmonella* dans les échantillons.

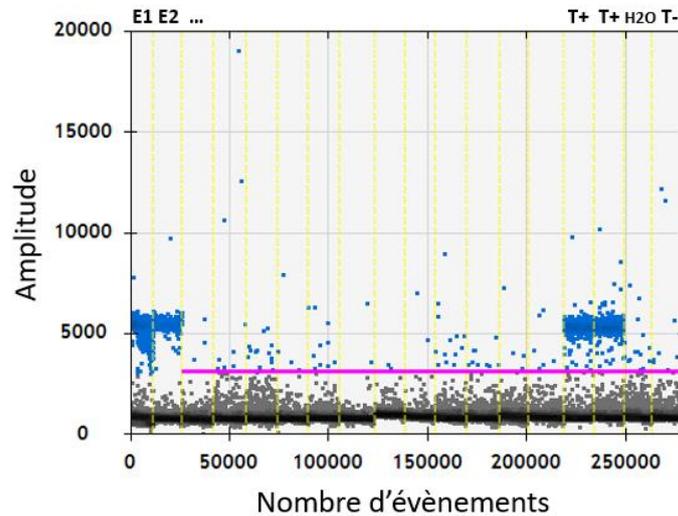


Figure 3 : Quantification du nombre de *Salmonella* dans les échantillons d'ADN extraits des fientes à J7 PI. Les quatre dernières colonnes sont des témoins positifs (T+ ; solution pure de *Salmonella* à 100 ng/ μ L) et négatifs (H₂O et T- : fientes à J6 ; sans *Salmonella*). Les deux premières colonnes sont des échantillons pour lesquels une quantification a pu être réalisée (E1 et E2). Les colonnes suivantes sont des échantillons pour lesquels la quantification n'a pas fonctionné. La ligne rose représente l'amplitude seuil pour laquelle une microgouttelette est définie comme positive ou négative (fixé en fonction des témoins négatifs). Les points bleus représentent les microgouttelettes positives et les points gris, les microgouttelettes négatives.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats non concluants. La première serait que les faibles quantités d'ADN extraites sur les fientes ne permettent pas d'obtenir une bonne représentativité de l'ensemble des ADNs présents dans les fientes. Le gène cible *invA* spécifique à *Salmonella* n'aurait donc pas été suffisamment extrait pour être quantifié. La deuxième hypothèse serait que les ADNs cibles sont bien présents et de manière représentative dans les échantillons d'ADN mais que la ddPCR n'est pas assez sensible pour les quantifier. Il y aurait donc très peu de *Salmonella* dans les fientes à J7 PI. Néanmoins, une étude montre qu'il y a bien excrétion de salmonelles dans les fientes 7 jours après infection chez de jeunes individus de 14 jours, en quantité suffisante (10⁶ CFU/g) pour être mesurée en frais sur gélose [15]. La technique de ddPCR, capable de détecter de très faibles quantités d'ADN cible (plus sensible que la PCR en temps réel) devrait donc pouvoir quantifier les salmonelles dans nos échantillons. L'étude citée ci-dessus a néanmoins été menée sur une

autre lignée expérimentale : la lignée PA12. La cinétique d'excrétion chez les lignées N et 6₁ pourrait être différente.

En conclusion, nous ne pourrions pas exploiter les résultats de ddPCR sur les fientes à J7 PI. De plus, ce résultat nous conduit à considérer les résultats 16S présentés dans les parties suivantes avec prudence. En effet, si les ADN extraits ne sont pas représentatifs des ADN présents dans les fientes (hypothèse 1) alors les résultats de séquençage 16S pourraient être biaisés.

Analyse du microbiote fécal par séquençage des ARNs ribosomiques 16S

Après séquençage, nous avons obtenu plus de 18 700 000 séquences avec une moyenne de 98 000 séquences par échantillon. A partir de ces séquences, nous avons identifié 275 OTUs avec un pourcentage d'affiliation de 100% au niveau de la famille et de 73% au niveau du genre. Pour éviter des effets liés aux différences de profondeur de séquençage entre échantillons, chaque échantillon a été normalisé à 17 081 séquences pour la suite des analyses.

Le nombre de 275 OTUs identifiées est bien plus faible que les nombres mentionnés par d'autres études sur les fientes : 1025 OTUs [291], 3088 OTUs [302] ou 975 OTUs [303]. Néanmoins, ces études étaient faites sur des fientes d'individus plus âgés, jusqu'à 114 jours d'âge. Des individus plus âgés ont un microbiote intestinal beaucoup plus diversifié [304], ce qui pourrait expliquer le nombre plus important d'OTUs identifiées. En outre les animaux ont été élevés en isolateurs dès 7 jours d'âge, si bien que leur microbiote n'a pas pu beaucoup s'enrichir. Néanmoins, les faibles quantités d'ADN extraites sur les fientes pourraient également expliquer ce faible nombre d'OTUs : les OTUs présentes en faible abondance dans les fientes n'ayant pas pu être séquencées ou n'ayant pas passé le contrôle qualité.

La composition des 96 échantillons de fiente au niveau du phylum est similaire à celle identifiée lors de précédentes études [291, 302, 303]. Les *Firmicutes* suivis par les *Proteobacteria* et les *Actinobacteria* dominent la composition du microbiote fécal à 6 et 12 jours d'âge (Figure 4). Cette composition au niveau du phylum est presque similaire à celle que nous avons observée dans le microbiote caecal à J19, dans lequel les *Actinobacteria* sont remplacées par les *Bacteroidetes* (Article 1). Au niveau de la famille, la plupart, notamment les plus abondantes ont également été retrouvées dans de précédentes études [291, 303].

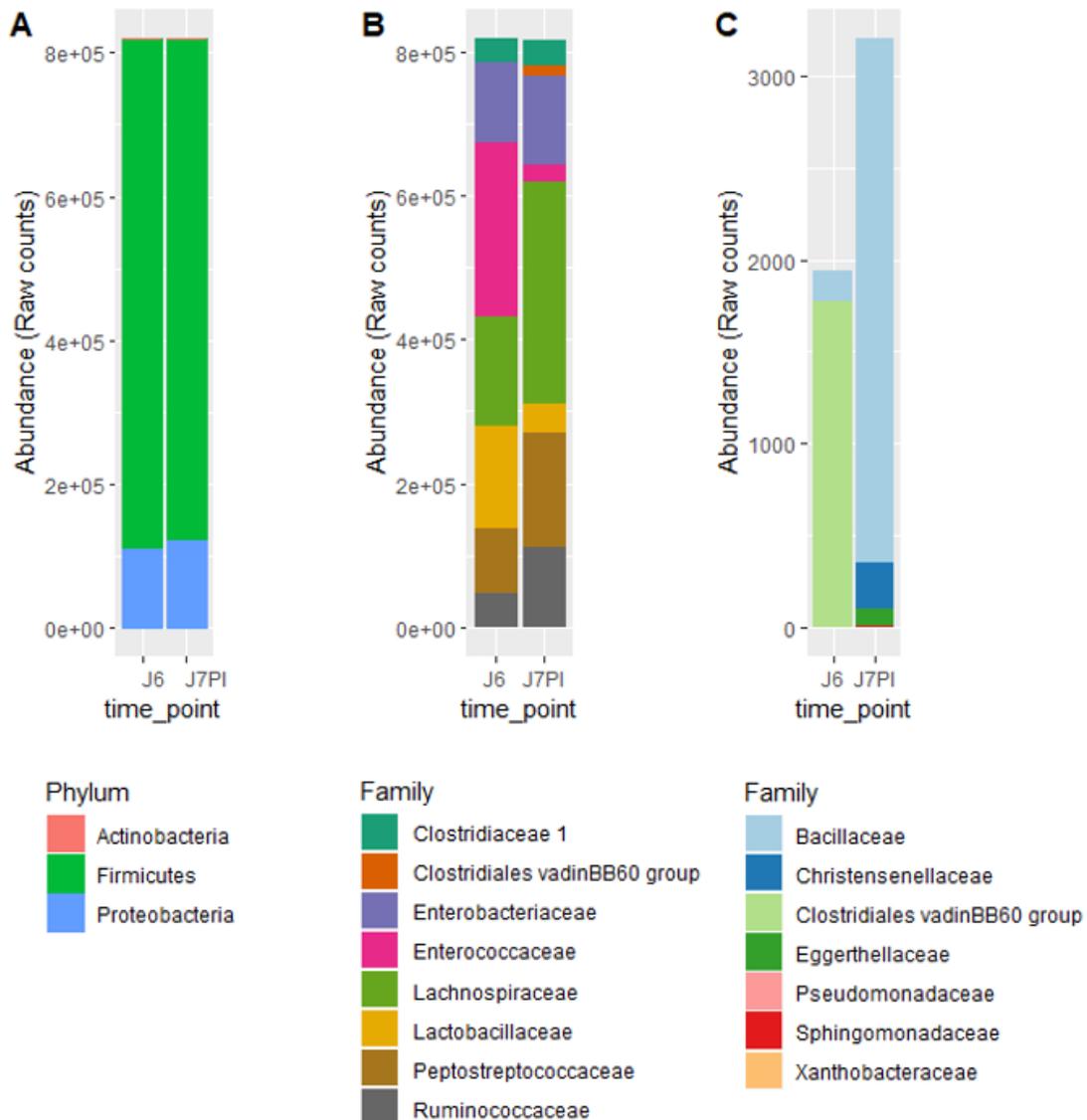


Figure 4 : Composition du microbiote fécal à J6 et J7 PI au niveau du phylum (A) et de la famille (B et C). Afin de mieux observer les familles présentes en faible abondance, nous avons séparé celles étant fortement abondantes (B) et celle faiblement abondantes (C).

Comparaisons de la composition du microbiote fécal avant et après infection

Nous avons tout d'abord comparé la diversité et la composition du microbiote fécal entre J6, soit avant infection, et J14, soit 7 jours après infection.

Les analyses de diversité (alpha-, beta- et richesse) montrent des différences significatives ($P < 0,05$) entre le microbiote fécal à J6 et le microbiote fécal à J7 PI (Figure 5). Les tests de significativité ont été réalisés en prenant en compte l'ensemble des covariables « expérimentation », « sexe », « lignée » et « isolateur ». Nous observons que l'alpha-diversité et la richesse sont plus importantes à J7 PI qu'à J6, ce qui semble logique compte

tenu de l'effet de l'âge sur la composition du microbiote intestinal [305]. En effet, les individus étant plus âgés, le microbiote est plus diversifié. L'infection par *Salmonella* à J7 ne semble pas impacter cette diversification du microbiote. De plus, nous observons que la beta-diversité est plus faible à J7 PI qu'à J6 ; autrement dit, les variations individuelles du microbiote à J7 PI sont moins importantes qu'à J6. Avec l'âge, la composition du microbiote semble donc se stabiliser, comme cela a déjà pu être montré dans d'autres études [195, 200].

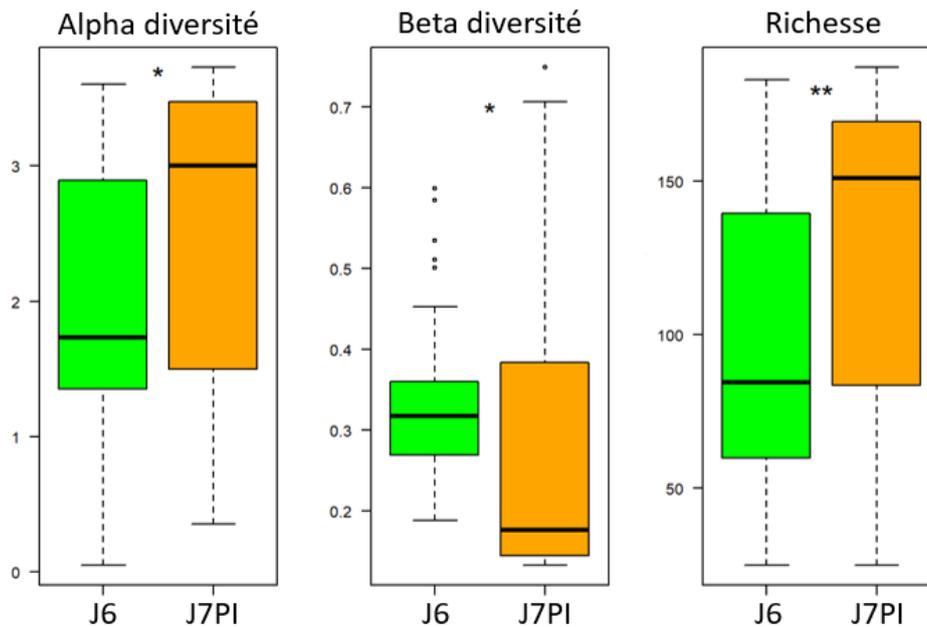


Figure 5 : Alpha- (Shannon index), Beta- (Whittaker index) diversité et Richesse à J6 et à J7 PI. Des différences significatives sont observées ($P < 0,05$) en prenant en compte les covariables expérimentation, sexe, lignée et isolateur.

Il est important de remarquer qu'il existe des différences significatives ($P < 0,01$) de diversité entre les deux expérimentations menées à un mois d'intervalle, en janvier et février 2017 (Figure 6) en prenant en compte les covariables « sexe », « lignée », « isolateur » et « date d'échantillonnage » (J6 ou J7 PI). L'expérimentation 2 présente une alpha-diversité et une richesse plus grande, et une beta-diversité plus faible que l'expérimentation 1. Ces différences entre expérimentations montrent que les effets environnementaux, malgré des conditions expérimentales fortement contrôlées (hygiène, température, nourriture, ...), ne sont pas négligeables lors d'une étude de microbiotes, comme cela a pu être montré dans d'autres expérimentations [227, 306].

Finalement, aucun effet du sexe et de la lignée sur la diversité n'a été observé en prenant en compte l'ensemble des covariables.

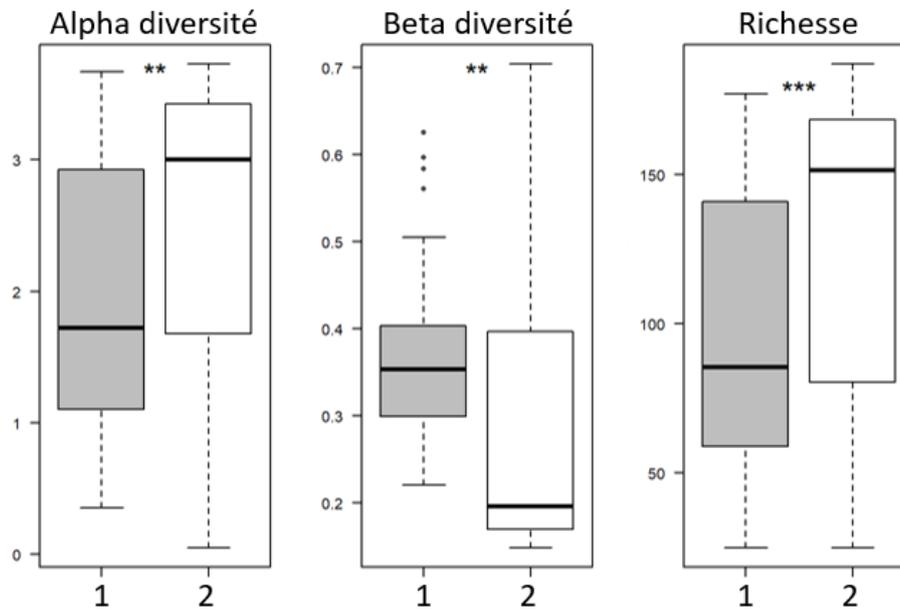


Figure 6 : Alpha- (Shannon index), Beta- (Whittaker index) diversité et Richesse entre les deux expérimentations menées à un mois d'intervalle (ensemble des individus J6 et J7 PI). Des différences significatives sont observées ($P < 0,01$) en prenant en compte les covariables « sexe », « lignée », « isolateur » et « date d'échantillonnage » (J6 ou J7 PI).

Nous avons poursuivi par une analyse NMDS (*Non-metric multidimensional scaling*) en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. La représentation NMDS en Figure 7 montre deux clusters bien distincts : un pour les échantillons prélevés à J6 en vert et un pour les échantillons prélevés à J7 PI en orange. La composition du microbiote fécal est donc différente entre J6 et J7 PI. Une analyse Permanova prenant en compte les covariables « expérimentation », « lignées », « isolateur » et « sexe », confirme cet effet significatif ($P < 0,001$). Comme pour la diversité, cette différence de composition du microbiote peut être associée à l'âge. Des individus plus âgés ne présentent pas les mêmes compositions de microbiote. A partir de ces données, il est néanmoins impossible de savoir si l'infection par SE à J7 a eu un effet sur cette composition du microbiote. Pour cela, il aurait fallu pouvoir analyser le microbiote fécal d'individus non infectés à J14 et le comparer à nos individus infectés.

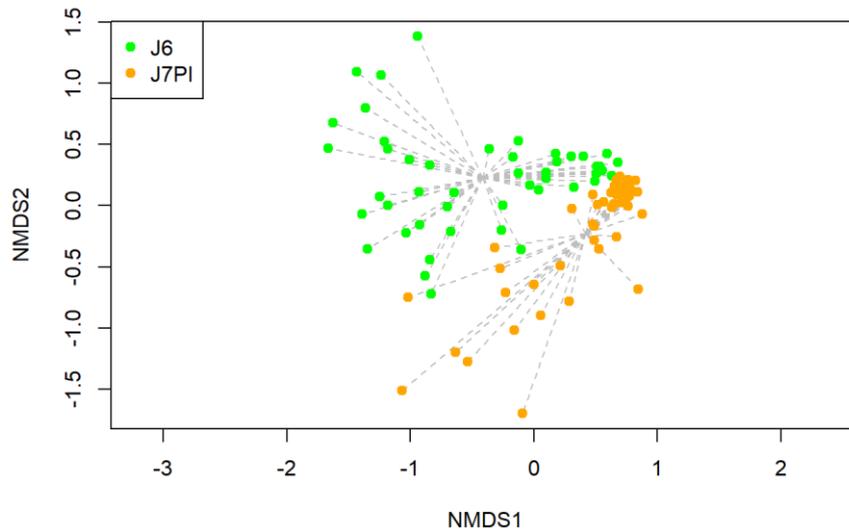


Figure 7 : Représentation NMDS de la composition en OTUs du microbiote fécal en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Effet significatif (Permanova, $P < 0,001$) de la date d'échantillonnage (J6 ou J7 PI).

Comme pour les analyses de diversité, il est important de remarquer qu'il existe des différences significatives (Permanova, $P < 0,01$) de composition du microbiote entre les deux expérimentations menées à un mois d'intervalle. La représentation NMDS des échantillons à J6 en Figure 8 (similaire pour J7 PI) ne montre pourtant pas deux clusters bien distincts entre les échantillons de la première expérimentation et ceux de la deuxième. Ces observations confirment, néanmoins, l'effet important de l'environnement dans une étude de composition du microbiote.

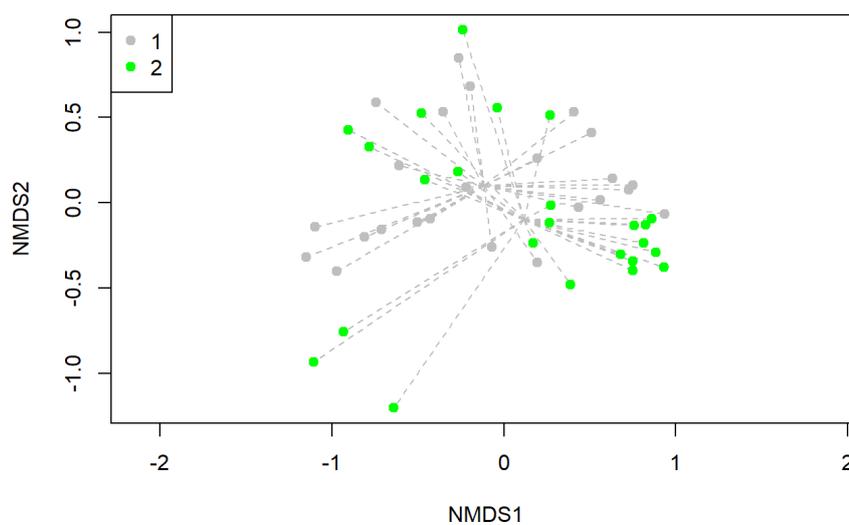


Figure 8 : Représentation NMDS de la composition en OTUs du microbiote fécal à J6 en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Effet significatif (Permanova, $P < 0,01$) de l'expérimentation.

Nous avons ensuite utilisé le package *metagenomeSeq* pour identifier les taxons différentiellement abondants (DA) entre J6 et J7 PI, à différents niveaux taxonomiques (OTUs, familles et genres). Nous avons obtenu 79 OTUs sur les 275 identifiées, 3 familles sur les 14 identifiées et enfin 12 genres sur les 42 identifiés (Figure 9), significativement DA en prenant en compte les covariables « sexe », « expérimentation » et « lignée ». Comme dans d'autres études, nous observons les *Lactobacillaceae* plus abondantes chez les plus jeunes individus [307, 308]. Leur tolérance pour l'oxygène leur permettant de se développer dans l'intestin dans les premiers jours de vie des individus. Les *Clostridiales*, notamment du genre *Lachnospiraceae* ou *Ruminococcaceae* et les *Peptostreptococcaceae* sont plus abondants à J7 PI qu'à J6. Des études ont montré que ces types de bactéries apparaissent dans la deuxième semaine après éclosion [226].

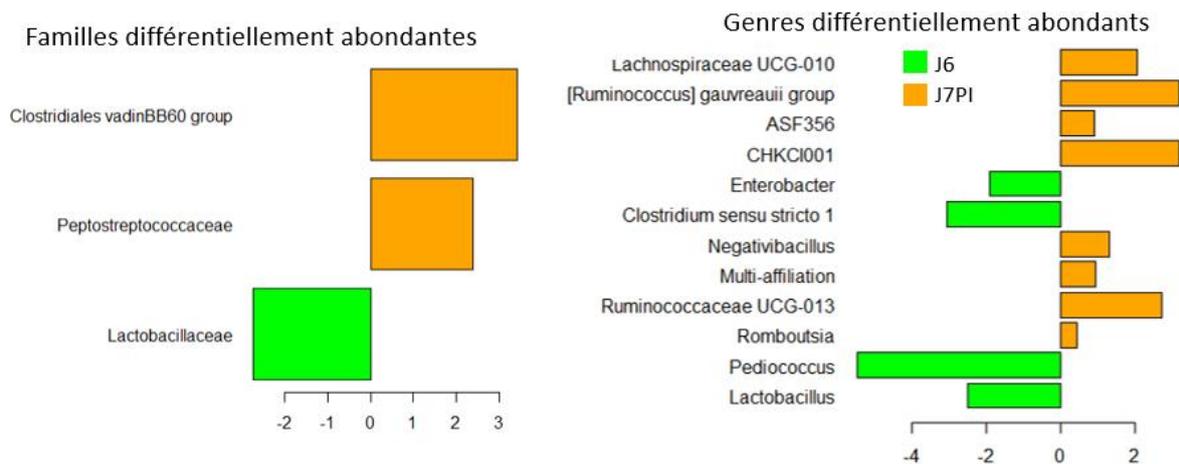


Figure 9 : Représentation des 12 genres différentiellement abondants sur les 41 identifiés entre J6 (vert) et J7 (orange) après correction avec les covariables « sexe », « expérimentation » et « lignée ». L'axe des abscisses représente la différence d'abondance entre J6 et J7 PI en \log_2 fold-changes.

Différences entre lignées N et 6₁ avant infection (J6) et après infection (J7 PI)

Nous avons ensuite comparé les différences de diversité et de composition du microbiote entre lignées N et 6₁ avant infection (J6) et après infection (J7PI) séparément.

Nous n'avons pas observé de différence de diversité entre lignées N et 6₁ que ce soit à J6 ou à J7 PI en prenant en compte les covariables « sexe » et « expérimentation ». Ces résultats ne

sont pas différents de ce que nous avons trouvé pour le microbiote caecal à J19 (Article 1). L'âge des individus est le facteur ayant le plus d'impact sur la diversité du microbiote.

Nous remarquons également que le sexe n'a pas d'effet sur la diversité du microbiote indépendamment à J6 et à J7 PI en prenant en compte les covariables « lignée » et « expérimentation ». De même, nous n'avons pas observé d'effet de l'expérimentation à J6 ; cependant nous en avons trouvé un à J7 PI (Figure 10). L'expérimentation 2 présente une alpha-diversité et une richesse plus grande et une beta-diversité plus faible que l'expérimentation 1. A partir des valeurs de quantité de *Salmonella* dans les caecas à J19, nous avons par ailleurs montré que l'infection était en moyenne plus élevée dans l'expérimentation 2 que dans l'expérimentation 1. Nous avons également identifié une différence de beta-diversité à J19 dans les caecas (plus faible dans l'expérimentation 2) mais aucune différence d'alpha-diversité entre expérimentation. Nous pourrions émettre l'hypothèse que les différences de diversité identifiées après infection entre expérimentations pourraient être expliquées par un impact du niveau d'infection par SE. Cependant, des études comparant des individus infectés et non infectés par SE ne montrent pas de différence de diversité entre les groupes [245, 248].

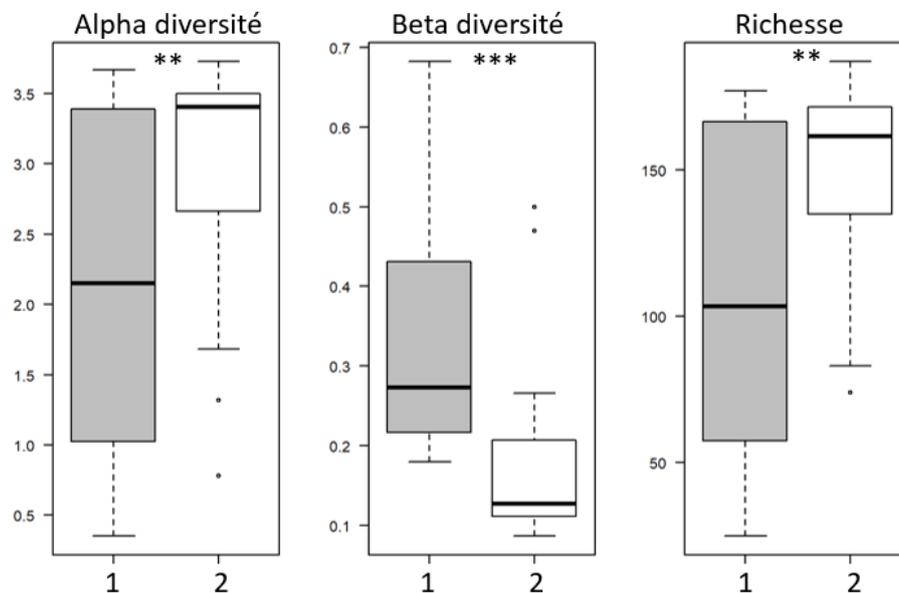


Figure 10 : Alpha- (Shannon index), Beta- (Whittaker index) diversité et richesse entre les deux expérimentations menées à un mois d'intervalle sur les microbiotes à J7PI. Des différences significatives sont observées ($P < 0,01$) en prenant en compte les covariables sexe et lignée.

Nous avons poursuivi par une analyse NMDS (*Non-metric multidimensional scaling*) en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. L'effet de la lignée sur le microbiote intestinal a été étudié à J6 puis à J7 PI (Figure 11, A et B). Une différence significative après correction par les covariables « expérimentation », « sexe » et « isolateur », a été identifiée entre la composition de la lignée N et de la lignée 6₁ à J6 (Permanova, $p < 0,01$) mais aucune différence significative n'a été identifiée à J7 PI. Néanmoins à J7 PI, en séparant les deux expérimentations (Figure 11, C et D), une différence significative a été identifiée pour l'expérimentation 1 après correction par les covariables « sexe » et « isolateur » (Permanova, $P < 0,05$). Il est possible que le faible nombre d'individus dans l'analyse à J7 PI ne permette pas d'identifier une différence significative. En effet, la représentation NMDS semble montrer un regroupement des individus issus de la même lignées (Figure 11B).

Bien que les animaux aient été élevés ensemble au sol dans strictement les mêmes conditions environnementales de l'éclosion jusqu'à la séparation dans les isolateurs à J7, des différences de microbiote entre lignées ont été observées dès J6 et confirmées dans les deux expérimentations. Une hypothèse probable est que cette différence de composition est expliquée par la génétique de l'hôte.

De plus, les compositions différentes entre lignées observées à J6 ont été conservées à J7 PI dans l'expérimentation 1 après séparation des individus en isolateur et après infection par *Salmonella* (Figure 11C). Ces différences semblent également être expliquées par la génétique de l'hôte puisque comme expliqué précédemment, l'infection par SE semble avoir peu d'impact sur le microbiote [245–248].

Dans l'expérimentation 2, la différence de composition à J7 PI entre lignées n'est pas significative (Figure 11D). Nous avons également observé des différences entre lignées plus faibles dans les caecas dans l'expérimentation 2 à J19. Cela pourrait être également expliqué par le fait que l'infection était en moyenne plus élevée dans l'expérimentation 2, diminuant les contrastes observables entre lignées. Mais comme expliqué précédemment l'infection par SE semble avoir peu d'impact sur le microbiote [245–248]. Une autre explication serait le faible nombre d'individus dans l'analyse (12 par groupe) ne permettant pas d'identifier des différences significatives.

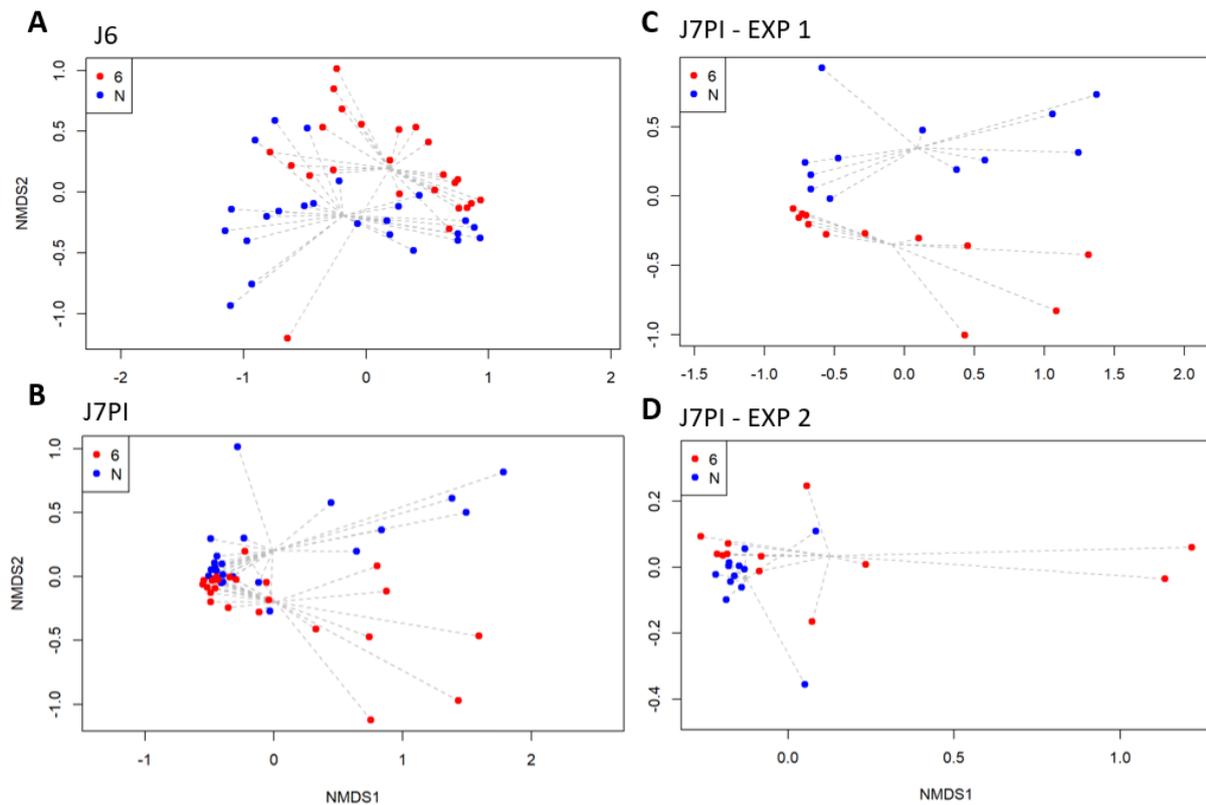


Figure 11 : Représentation NMDS de la composition en OTUs du microbiote fécal en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis des individus à J6 (A), des individus à J7 PI (B) et des individus à J7 PI pour l'expérience 1 (C) et l'expérience 2 (D). Effet significatif de la lignée à J6 (permanova, $P < 0,01$) et à J7 PI-EXP1 (permanova, $P < 0,05$).

Nous avons ensuite utilisé le package MetagenomeSeq pour identifier les taxons différenciellement abondants (DA) entre la lignée N et la lignée 6₁ respectivement à J6, à J7 PI-Exp1 et à J7 PI-exp2, à différents niveaux taxonomiques (OTUs, familles et genres). Sur les 275 OTUs identifiées, nous avons obtenu respectivement 60, 80 et 12 OTUs DA entre les lignées N et 6₁.

Les OTUs ont ensuite été regroupées par familles puis par genres. A J6, 2 familles sur les 14 identifiées et 8 genres sur les 42 identifiés sont significativement DA entre lignées en prenant en compte les covariables « sexe » et « expérimentation » (Figure 12A). A J7 PI-Exp1, nous avons identifié 6 familles et 11 genres DA entre lignées en prenant en compte les covariables « sexe » et « expérimentation » (Figure 12B). A J7 PI-Exp2, nous avons identifié 2 familles et 3 genres DA entre lignées (Figure 12C). Certains des genres identifiés en Figure 12 ont été également identifiés comme DA à J19 dans le contenu caecal. Néanmoins, certains sont inversement plus abondants entre lignées, par exemple les *Enterococcus* à J6 ou les

Lachnospiraceae UCG-010 à J7 PI-Exp1. De manière intéressante, même si les différences de composition globale du microbiote entre lignées à J7 PI – exp2 ne sont pas significatives, nous observons une différence d'abondance des *Christensenellaceae* (famille et genre) à J7 PI-exp2. Or nous avons identifié cette famille bactérienne comme signature de la résistance à SE à J19 dans le microbiote caecal dans notre précédente étude (Article 1). Ainsi, une différence d'abondance d'un seul taxa très important fonctionnellement, pourrait avoir un impact sur la résistance à SE, sans changer l'allure générale de la composition du microbiote. Néanmoins, la question de la pertinence des différences d'abondance obtenues se pose, compte tenu des faibles quantités d'ADN extraites, possiblement non représentatives de l'échantillon de fèces. De plus, nous recherchons des bactéries capables de limiter la propagation de SE, donc des bactéries en compétition avec SE au niveau des sites de réplication du pathogène, soit dans les caecas. La composition dans les fèces n'étant qu'une approximation de la composition du microbiote au niveau des caecas [226, 301, 302], les résultats doivent donc être interprétés avec prudence.

Ainsi, dans ce design expérimental, des différences de microbiote fécal avant infection ont été identifiées entre les lignées N et 6₁. Nous avons également montré des différences en moyenne significatives de portage de *Salmonella* entre les deux lignées à J19 dans les caeca: la lignée N étant plus résistante et la lignée 6₁ étant plus sensible. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse qu'une différence de microbiote avant infection, certainement contrôlée par la génétique de l'hôte, pourrait expliquer une part des différences de résistance à SE entre lignées observées à J19.

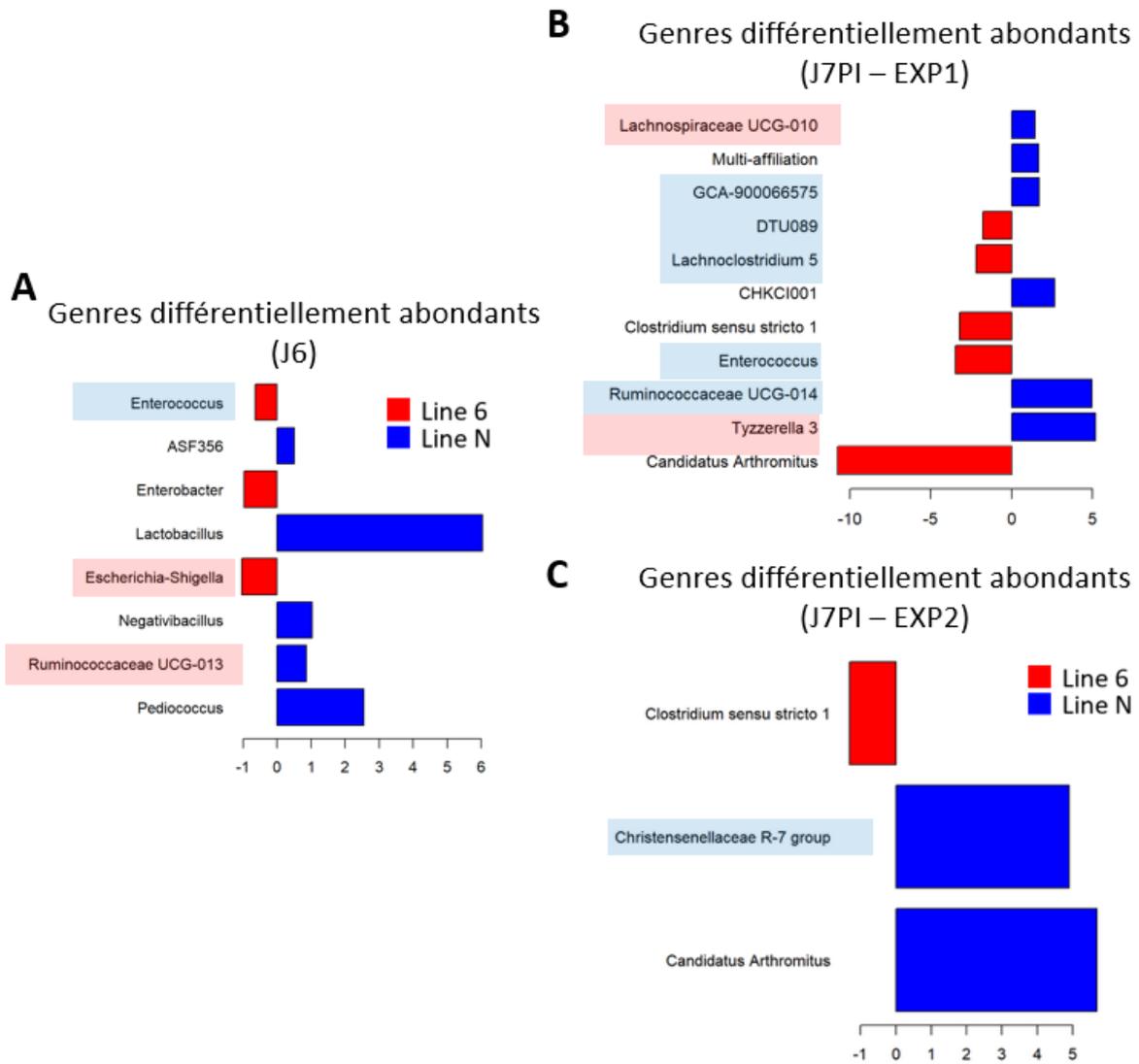
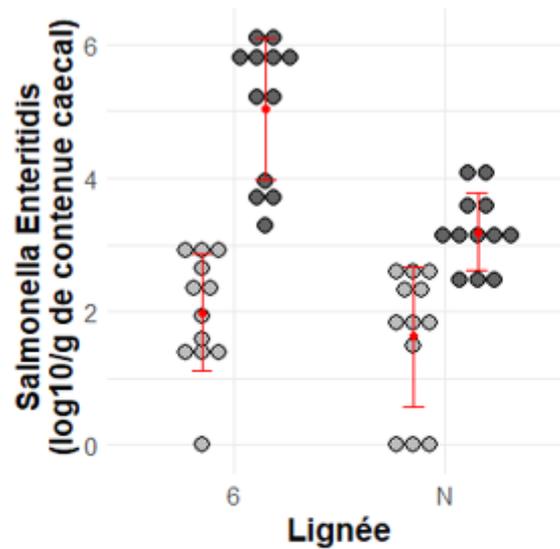


Figure 12 : Genres différentiellement abondants entre la lignée N et la 6₁ à J6 (A), à J7 PI – Exp1 (B) et à J7 PI – Exp2 (C). Les noms de genres respectivement surlignés en rouge et en bleu sont des genres identifiés comme plus abondants respectivement dans la lignée 6 et la lignée N dans le contenu caecal à J19. L'axe des abscisses représente la différence d'abondance entre lignées en log₂ fold-changes.

Peut-on prédire le niveau de portage caecal (J19) intra-lignée à partir des compositions fécales à J6 avant infection ?

Nous avons ensuite comparé les différences de diversité et de composition de microbiote entre échantillons provenant d'animaux identifiés comme étant faibles et forts porteurs à J19 dans la lignée 6₁ puis dans la lignée N, avant infection (J6). Les groupes faible et fort porteur ont été constitués en se basant sur la quantification des *Salmonella* dans le contenu caecal à J19 (Figure 13).



Lignée	6		N	
Groupe	Faible	Fort	Faible	Fort
Moyenne	2,0	5,0	1,6	3,2
Ecart type	0,9	1,1	1	0,6

Figure 13 : Groupes faible (gris clair) et fort (gris foncé) porteurs de *Salmonella* en fonction de la lignée, basés sur les comptages de *Salmonella* dans le contenu caecal à J19. Le tableau donne les moyennes et les écart-types pour chaque groupe d'individus.

Le choix des individus pour la lignée 6₁ permet d'identifier deux groupes bien distincts (3 log de différences) entre forts et faibles porteurs de SE. Les analyses du microbiote à J6 ne montrent pas de différence significative de diversité et de composition globale du microbiote (permanova, Pvalue = 0,38) entre les deux groupes (Figure 14, A). Néanmoins, 35 OTUs DA sur les 275 ont pu être identifiées entre faibles et forts porteurs. Il est possible que certaines de ces OTUs DA à J6 expliquent les différences de portages observés à J19. Nous avons regroupé ces OTUs au niveau de la famille et du genre bactérien. Une seule famille est plus abondante chez les forts porteurs de *Salmonella* : *Clostridiales vadinBB60 group* et un seul genre est plus abondant chez les faibles porteurs de *Salmonella* : *Pediococcus*.

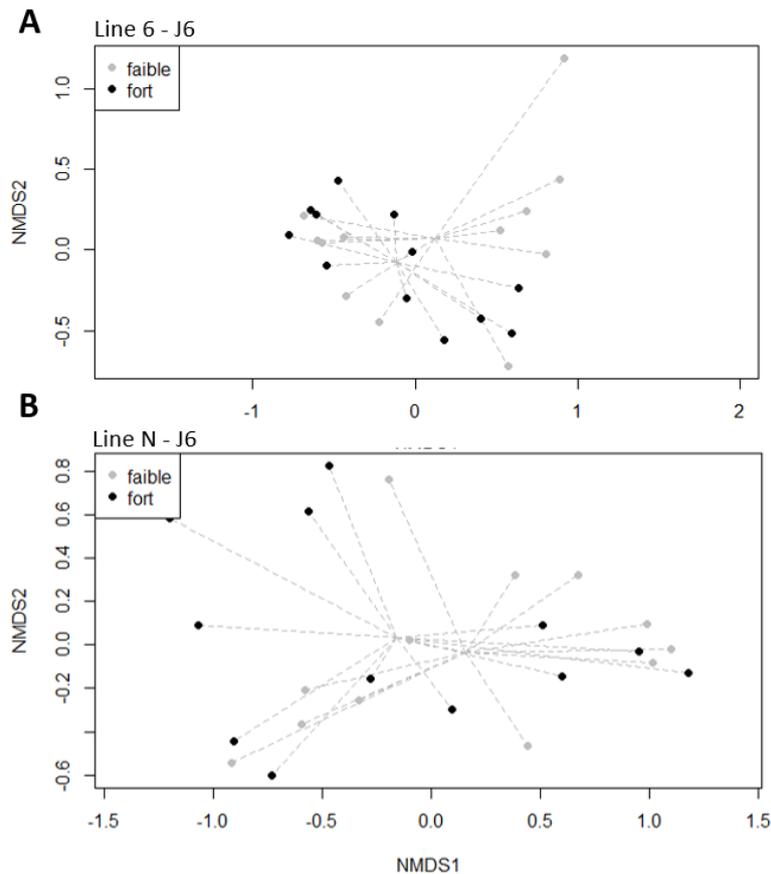


Figure 14 : Représentation NMDS de la composition en OTUs du microbiote fécal en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis des individus de la lignée 6₁ à J6 (A) et à J7 (B). Pas de différence de la composition du microbiote caecal entre faibles et forts porteurs de *Salmonella*.

Le choix des individus pour la lignée N après équilibrage avec les covariables « expérimentation », « sexe » et « isolateur » ne permet pas d'identifier deux groupes bien distincts entre faibles et forts porteurs. Comme pour la lignée 6₁, les analyses du microbiote fécal à J6 entre ces deux groupes ne montrent pas de différence significative de diversité et de composition du microbiote (permanova, Pvalue = 0,55) (Figure 14, B). Et pourtant, 30 OTUs DA sur les 275 ont pu être identifiées entre faibles et forts porteurs. Certaines de ces OTUs DA à J6 pourraient expliquer les différences de portages observées à J19. Nous avons regroupé ces OTUs au niveau de la famille et du genre bactérien. Une seule famille est plus abondante chez les faibles porteurs de *Salmonella* : les *Enterococcaceae*. Trois genres bactériens sont plus abondants chez les faibles porteurs de *Salmonella* : *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Negativibacillus* et un genre est plus abondant chez les forts porteurs de *salmonella* : *Escherichia-Shigella*. Le genre *Enterococcus* a également été identifié comme plus abondant

dans les faibles porteurs de SE à 7 jours d'âge dans une autre lignée expérimentale : la lignée PA12 [251]. De manière intéressante, le transfert du microbiote de ces faibles porteurs de SE et donc de cette bactérie vers de nouveaux individus, transfère également le caractère faible porteurs à ces individus [251]. Les genres bactériens identifiés comme plus abondants chez les individus résistants à SE tel que *Pediococcus* et *Enterococcus* pourraient donc avoir un effet bénéfique contre SE. Il a déjà été montré qu'une supplémentation symbiotique contenant entre autres les bactéries *Pediococcus acidilactici* et *Enterococcus faecium* [283, 309] ou bien *Pediococcus pentosaceus* seul [274] pouvait diminuer le portage de SE ou de ST chez la poule. Il a également été montré, même si les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien définis, que les bactéries lactiques, dont font partie *Pediococcus* et *Enterococcus*, sont capables de diminuer le portage de SE [310].

Nous avons ensuite testé s'il était possible de prédire le phénotype faible ou fort porteurs de *Salmonella* à J19 à partir des données de microbiote fécal à J6 avant infection. Nous avons réalisé pour cela deux analyses sPLSDA, une pour la lignée 6₁ et une pour la lignée N (Figure 15). Ces études montrent une faible puissance de discrimination entre les groupes faibles et forts porteurs de SE. Plus de 50 OTUs dans les deux analyses sont nécessaires pour discriminer les groupes. Cette faible puissance pourrait être expliquée soit par une variabilité de composition intra-groupe plus forte que la variabilité inter-groupe, soit par les faibles effectifs dans les analyses, soit par les deux. Les difficultés d'extraction d'ADN et la représentativité des données obtenues pourraient aussi expliquer ces résultats non concluants. Ainsi, malgré des OTUs DA entre groupe faibles et fort porteurs, il ne semble pas possible de prédire le phénotype à J19 à partir de données de microbiote fécal avant infection à J6.

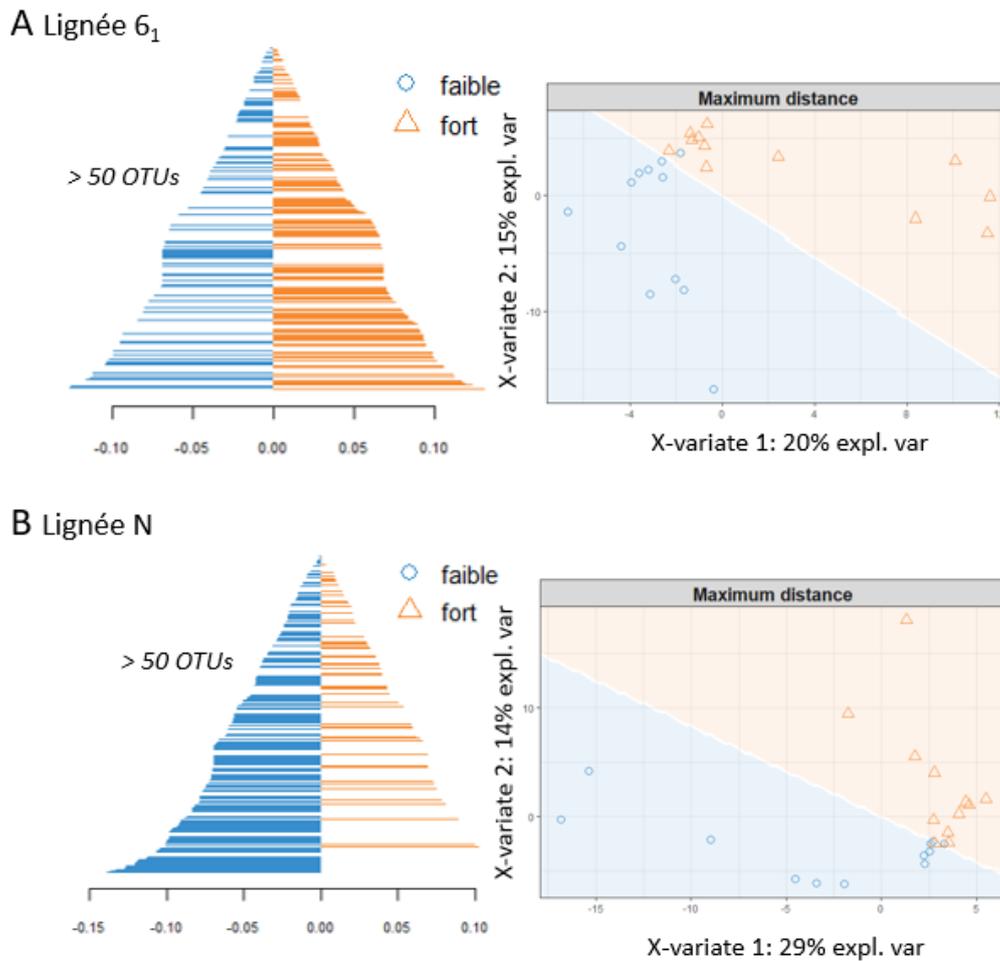


Figure 15 : Analyse sPLSDA entre les faibles et les forts porteurs de SE à J19 basée sur la composition du microbiote fécal à J6 dans la lignée 6₁ (A) et dans la lignée N (B).

4) Conclusion

Les difficultés d'extraction d'ADN sur les fèces rencontrées dans cette étude nous conduisent à considérer les résultats avec prudence. Nous avons néanmoins montré une différence significative de diversité et de composition du microbiote entre J6 et J7 PI, pouvant être expliquée par une évolution du microbiote liée à l'âge des individus. Nous avons également montré que la génétique de l'hôte avait un impact sur la composition du microbiote avant infection et nous avons émis l'hypothèse que ces différences de composition, contrôlées par la génétique de l'hôte, pourraient expliquer une part des différences de résistance à *S. Enteritidis* observées à J19 entre lignées. De plus, quelle que soit la lignée expérimentale, aucune différence globale de composition du microbiote intra-lignée entre faibles et forts porteurs de SE à J19 n'a été observée. Une analyse sPLSDA semble montrer qu'il est difficile

de prédire le portage de *Salmonella* à J19 à partir des données de microbiote fécal à J6. Des bactéries significativement DA entre les groupes ont pourtant été identifiées (*Pediococcus* et *Enterococcus*) et pourraient avoir un impact sur la résistance à SE.

Un point important à soulever est que nous avons ajouté un biais dans l'analyse en choisissant des individus sur la base de leur portage caecal à J19. Les résultats auraient peut-être été différents si nous avons choisi les individus représentatifs de la diversité phénotypique observée. Néanmoins, nous n'aurions peut-être pas pu observer les différences d'abondance en OTUs entre les faibles et les forts porteurs de SE.

Globalement, dans cette étude, nous avons montré que le portage de SE pouvait être expliqué en partie par une interaction entre la génétique de l'hôte et la composition du microbiote dans les deux lignées étudiées.

IV. Article 3 : Identification de nouveaux loci impliqués dans la résistance à une infection par SE dans les souris du CC et du DO

Cette étude a été menée à l'Institut Pasteur sur le modèle « souris ». Au total, 208 souris issues de 35 lignées du Collaborative Cross (CC) et 192 souris du Diversity Outbred (DO) ont été infectées par SE. Le génotype des lignées du CC est connu (disponible en ligne) et les souris du DO utilisées ont été génotypées sur la puce MUGA. Les charges bactériennes dans le foie et la rate ont été mesurées 22 jours après l'infection par SE. Les objectifs de cette étude sont :

- D'évaluer la variabilité de portage dans deux organes cibles, le foie et la rate, après infection par SE dans les lignées du CC et d'identifier des lignées extrêmes résistantes ou sensibles à SE ;
- D'évaluer la variabilité de portage au sein de la population des souris du DO ;
- D'associer le génotype au phénotype afin d'identifier des QTLs et des gènes candidats associés au portage des salmonelles.

Les résultats ont montré une large diversité phénotypique entre les lignées du CC et entre les souris DO. Des individus sont capables d'éliminer complètement la bactérie dans le foie ou la rate alors que d'autres présentent plus de 6 log dans la rate et plus de 5 log dans le foie. Avec les CC, un QTL significatif ($E < 0,1$) a été identifié sur le chromosome 1 associé à la charge bactérienne dans le foie. Chez les souris DO, trois QTLs significatifs ($E < 0,05$) ont été identifiés sur le chromosome 2 pour la rate et sur le chromosome 4 et 17 pour le foie. L'utilisation des DO a permis d'obtenir une très bonne résolution d'identification des QTL en réduisant les intervalles de confiance de détection à moins de 5 Mb. Enfin, en utilisant les effets alléliques des lignées fondatrices et les données de séquence des fondateurs, les intervalles de confiance de deux QTLs sur le chromosome 2 et 4 ont pu être réduits à un seul gène : *Gm13211* et *Lingo2*, respectivement. En sélectionnant les variants non-synonymes (missense, nonsense ou stop) ou les variants d'épissage, nous avons identifié des gènes sous le QTL du chromosome 17 dont certains semblent potentiellement intéressants : par exemple, *Btnl4*, *Tap2*, *Bag6* et *Lst1*.

Cette étude a été rédigée sous forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement dans un journal scientifique pour publication.

1 Identification of new loci involved in the host susceptibility to *Salmonella* 2 enterica Enteritidis in Collaborative Cross and Diversity Outbred mice

3 Authors:

4 Anaïs CAZALS^{1,2}, Jing ZHANG¹, Laurine CONQUET¹, Pascal CAMPAGNE³, Xavier MONTAGUTELLI¹ and
5 Jean JAUBERT^{1*}

6 Institutions:

7 ¹Mouse Genetics Laboratory, Department of Genomes and Genetics, Institut Pasteur, 75724 Paris,
8 France

9 ²Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

10 ³Bioinformatics and Biostatistics Hub, Computational Biology Department, Institut Pasteur, 75724
11 Paris, France.

12

13 *Corresponding Author:

14 Jean Jaubert: jean.jaubert@pasteur.fr

15 ABSTRACT

16 Salmonellosis is a zoonosis due to the consumption of contaminated farm products such as egg and
17 meat. It is the third leading cause of human death among diarrheal diseases worldwide. Host
18 susceptibility varies between individuals depending on different factors including host genetics. The
19 persistence of the bacteria in the human body can lead to chronic and asymptomatic carriage, a
20 possible environment reservoir for the bacteria' spread. Studies of the host genetics using new mice
21 models could help dissect mechanisms involved in *Salmonella* susceptibility in human.

22 In this study, we have investigated the host response to *S. Enteritidis* infection in two new murine
23 genetic reference population: the Collaborative Cross (CC) and the Diversity Outcross (DO) mice. We
24 intravenously challenged 208 CC from 35 CC strains and 192 female DO mice with 10³ colony forming
25 units (CFUs). Bacterial loads were assed in spleen and liver at 22 days post-infection. We identified
26 large phenotypic diversity both between CC strains and in DO mice. In CC strains, one significant ($E < 0.1$)
27 QTL was identified on chromosome 1 associated with liver bacterial load. In DO mice three significant
28 ($E < 0.05$) QTLs were identified, on chromosome 2 associated with spleen bacterial load, and on
29 chromosomes 4 and 17 with liver bacterial load. Using a 1.5 LOD drop credible interval method, we

30 reduced the QTLs' interval to small regions (under 5 Mb) in DO. Finally, using founder allelic effects
31 and founder sequence data, we were able to reduce for two QTLs to a single candidate gene level.

32 The use of CC and DO allowed the identification of new host susceptibility loci associated with
33 *Salmonella* Enteritidis infection. DO population allowed a higher mapping resolution and the
34 identification of single candidate genes. On the other hand, we identified CC strains with extreme
35 phenotypes that could serve as new models for future studies.

36 **KEYWORDS**

37 *Salmonella* Enteritidis, Host genetics, Collaborative Cross, Diversity Outbred, QTL mapping

38 **BACKGROUND**

39 *Salmonella* is a gram-negative bacterium responsible of human food-borne intoxication through the
40 consumption of contaminated farms products. According to the serovar, it can cause typhoid or
41 paratyphoid enteric fever (*S. Typhi* and *S. Paratyphi*) or gastrointestinal salmonellosis (non-typhoidal
42 *Salmonella* or NTS, such as *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*). In 2010, nearly 21 million cases of
43 typhoid and paratyphoid fevers and over 190,000 deaths per year were reported worldwide [1]. The
44 annual mortality has increased by 39% between 1990 and 2010 [2]. After several weeks of illness, the
45 patient can completely eliminate the bacteria. However, in 5% of cases, he may become an
46 asymptomatic healthy carrier, a phenomenon known as chronic carriage [3]. This environmental
47 reservoir could explain the continuous resurgence of infections in the human population. In contrast,
48 NTS infections have a large host spectrum. Livestock farms are the main environmental reservoirs of
49 NTS causing salmonellosis in humans. Worldwide, the annual number of cases of food poisoning by
50 NTS has been estimated in 2010 at more than 150 million with nearly 60,000 deaths [2]. Different
51 factors could impact *Salmonella* infections susceptibility including the bacterial serovar, the
52 environment or the host genetics [4]. The identification of host genetic loci associated with the
53 differences in host response to *Salmonella* infection could help to better understand underlying
54 biological mechanisms and develop new effective therapies.

55 Classical mouse inbred strains have been successfully used to study the host response to *Salmonella*
56 infection. Infection with *S. Typhimurium* (ST) has been widely used as an experimental model of human
57 typhoid fever [5]. Different approaches identified quantitative trait loci (QTL) and genes associated
58 with differences in the host response to infection, including *Slc11a1*, *Tlr4* or genes from the major
59 histocompatibility complex (*H2* complex) [4–6].

60 More recently, a new model of infection was developed by Caron and collaborators to study chronic
61 carriage using the less virulent serotype, *S. Enteritidis* (SE) [7]. They infected intravenously C57BL/6J
62 (B6) and 129S6/SvEvTac (129S6) strains with 10^3 colony forming units (CFUs). B6 mice were able to
63 completely clear the bacterium 42 days after infection while, 129S6 mice developed a long-term
64 carriage status with bacterial replication in spleen or liver even 42 days after infection. Using an F2
65 cross between B6 and 129S6 and further congenic mice, they identified and validated 10 distinct QTL
66 regions named *Ses1* to *Ses10* (for *Salmonella* Enteritidis Susceptibility) [7–9]. In these chronic carriage
67 model, they showed the role of *Slc11a1* gene in the persistence of the infection in mice [7, 10].

68 Classical inbred strains used in all these studies are derived from a small pool of progenitors, and have
69 a low genetic diversity when compared to human population. Thus, loci could be missed. Furthermore
70 F2 crosses between 2 different strains identify QTL regions with wide critical intervals, making it
71 challenging to identify candidate genes [11]. New genetic reference populations (GRP) such as the
72 Collaborative Cross (CC) strains and the Diversity Outbred (DO) mice were more recently developed to
73 better reflect the diversity existing in the *Mus musculus* species [12]. These two GRP populations were
74 derived from the same eight distinct founder strains including five classical laboratory strains but also
75 three wild-derived strains. The CC population accounts for almost 90% of the known genetic variation
76 present in laboratory mice originating from *M. musculus* species [13]. It contains approximately equal
77 genetic contribution from each founder with high degrees of genetic recombination. More than 90%
78 of loci are homozygous with known genotypes. In contrast, DO is a heterozygous outbreeding
79 population derived from 160 pre-CC [12]. We previously published the identification of new QTLs and
80 genes involved in host response differences to ST infection using CC population [14, 15].

81 In the current study, we used both CC and DO mice to identify new QTLs involved in host response
82 variation to SE infection (carriage model). We challenged with SE 208 male and female CC mice from
83 35 CC strains and 192 female DO mice and assessed the bacterial loads in spleen and liver at day 22 post-
84 infection. We identified CC strains with extreme phenotypes that constitute new potential models. We
85 also identified new QTLs associated with bacterial loads and were able for two of them to narrow down
86 to only a few candidate genes.

87 MATERIAL AND METHODS

88 Animals and ethics approval

89 All animal breeding and experiments conformed to European Directive 2010/63/EU and the French
90 regulation of February 1st, 2013 on the protection of animals used for scientific purposes. Institut

91 Pasteur's Animal Ethics Committee-CETEA (registered by French Research Ministry under n°89)
92 approved experiments under numbers dap160089. Collaborative Cross mice were purchased from the
93 Systems Genetics Core Facility at the University of North Carolina (UNC) [16], previously generated and
94 bred at Tel Aviv University in Israel [17], Geniad in Australia [18], and Oak Ridge National Laboratory in
95 the US [19], and further bred and maintained at the Institut Pasteur under specific-pathogen-free (SPF)
96 conditions. C57BL/6J (B6) and 129S2/SvPasCrl (129) SPF mice were obtained from Charles River France
97 and used as resistant (low bacterial burden in target organs) and susceptible (high bacterial burden)
98 controls respectively. Diversity outbred (DO) female mice were purchased at generation G₂₅ from The
99 Jackson Laboratory (JAX stock number 009376), and used for the experiment. A total of 208 mice
100 (males and females, 7-17 weeks) from 35 CC strains were used in eight experiments. A total of 192
101 female DO mice (7-9 weeks-old) were used in four experiments.

102

103 *Salmonella* Enteritidis infection

104 Mice were confined in a biosafety level 3 (BSL-3) animal facility a few days prior to infection. *Salmonella*
105 Enteritidis strain LA5 [20] was used for infection. One mL of bacteria frozen culture was grown in 50
106 mL of Trypticase soy broth (Biorad) at 37°C to reach the exponential phase, with an optical density at
107 600 nm of 0.1-0.2. The exact bacterial density was determined by plating 10⁻⁵ dilutions onto tryptic soy
108 agar. Bacterial suspension was diluted to 5,000 CFU/ ml in PBS. Mice were infected by injection in the
109 caudal vein with 1,000 CFU of *Salmonella* Enteritidis in 200 µl. The infectious dose was verified
110 following infection by serial dilutions of the inoculum plated on trypticase soy agar. Infected animals
111 were monitored daily post infection, and body-condition scoring (score <2) was used for clinical
112 endpoint.

113

114 *In vivo* bacterial burden

115 Mice were killed by cervical dislocation at day 22 post infection. Spleen and a chunk of right liver lobe
116 were removed aseptically, weighed, and placed in 2 mL of isotonic saline. Samples were further
117 homogenized using a tissue homogenizer (T25 Ultra-Turrax, IKA). The resulting homogenate was
118 diluted in 1× PBS and serial dilutions were plated on tryptic soy agar to determine bacterial load per
119 gram of organ.

120

121 Genotyping

122 CC strains have been previously genotyped at Wellcome Trust Centre for Human Genetics (Oxford, UK)
123 and at UNC (Chapel Hill, USA) with several high-density arrays, including Mouse Universal Genotyping
124 Array (MUGA and MEGA-MUGA) containing respectively 7.5 and 77.8K SNPs [21] and Mouse Diversity
125 Array (MDA) containing 620K SNPs [22].

126 For each DO mouse, DNA was extracted from 0.2-0.5cm tail samples. Genotyping was performed by
127 Neogen/Geneseek (Lincoln, NE, USA) using MUGA array.

128 Statistical analysis

129 Statistical analysis was performed using R software (version 3.6.1). Bacterial load was reported as log₁₀
130 (CFUs) per gram of organ. Type I ANOVA was used to assess sex, age and experiment effects. Pearson's
131 r coefficient was used to determine correlation between bacterial loads in spleen and liver. For each
132 experiment with CC strains, B6 mean load and standard deviation were calculated and used for data
133 normalization across experiments.

134 QTL mapping

135 For both CC and DO populations, QTL mapping was performed using R/qtl2 package [23] version 0.24.
136 For CC population, genome scan was performed on normalized data using the scan1 function with a
137 linear mixed model and using a kinship matrix. Significance is reported as Logarithm of the Odds ratio
138 (LOD) score. Genome-wide significance ($E < 0.63$, $E < 0.1$ and $E < 0.05$) was estimated by running 1000
139 permutation tests in which phenotype and genotype data are shuffled without replacement. QTL
140 regions were defined using a 1.5 LOD drop interval method.

141 For DO population, genotype probabilities at each marker locus for each DO animal were calculated
142 from MUGA array data with a Hidden Markov Model (HMM). Then, a genome scan was performed
143 using the scan1 function with an additive model and a kinship matrix. LOD scores, genome-wide
144 significant thresholds ($E < 0.63$, $E < 0.1$ and $E < 0.05$) based on 1000 permutations and 1.5 LOD drop
145 interval were calculated as for CC strains.

146 Founder effect estimation, merge analysis and candidate genes selection

147 To identify potentially causal SNPs in each QTL interval we used the merge analysis strategy ([24]. Most
148 SNPs have only two alleles, thus we merged the eight CC founders into (typically) two groups according
149 to their allelic variation based on sequence data in the founder strains. Instead of testing for
150 phenotypic differences between all eight founders to test for a QTL in a given interval, we tested for

151 differences between the groups of merged founders: the reduction in the dimension of the test helped
152 to increase merge logP-values comparing to interval logP-values, if a QTL is caused by these variants.
153 Merge analysis provides an efficient tool to prioritize SNPs within QTL intervals.

154 To obtain information on genes' annotation, expression, GO function or known mutation phenotype,
155 several public databases were used, including Mouse Genome Informatics [25] and ENSEMBL [26].

156 RESULTS

157 Variability of response to SE infection in CC strains

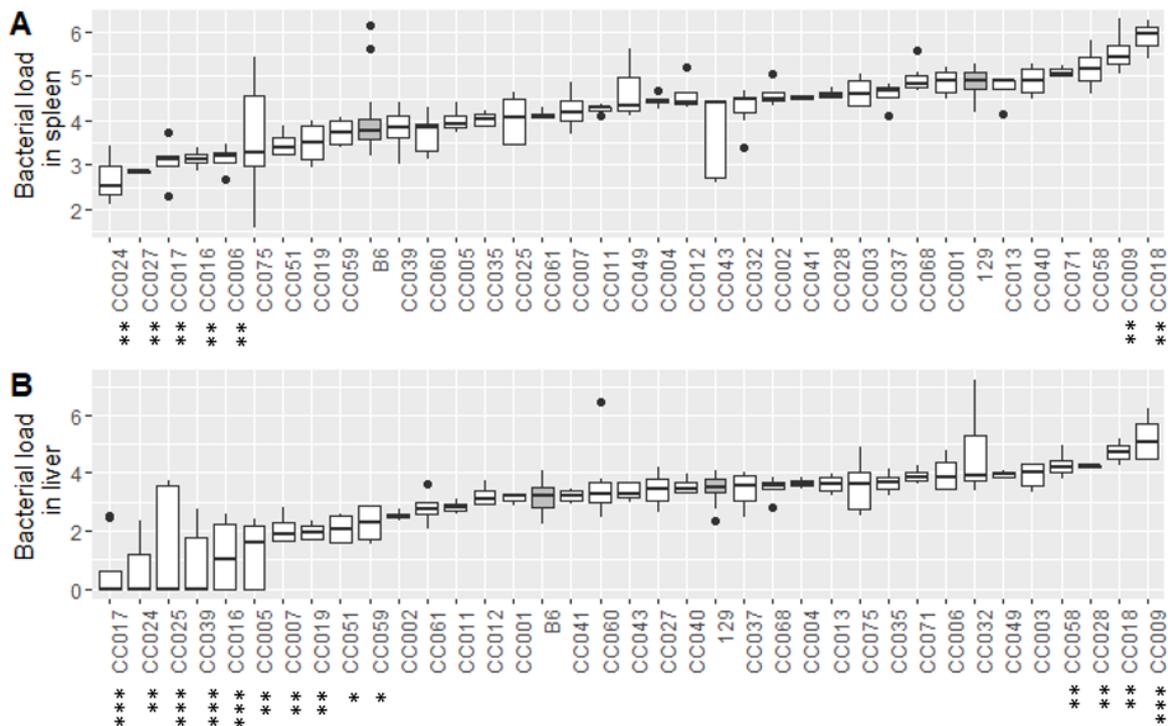
158 A total of 208 mice from 35 CC strains were infected with SE (Additional file 3). Bacterial loads in spleen
159 and liver were assessed at 22 days post-infection (Figure 1). In spleen, B6 resistant strain had a median
160 bacterial load of 3.76 \log_{10} (CFUs/g) while 129 susceptible strain showed a median of 4.89. In liver, B6
161 resistant strain had a median bacterial load of 3.19 while 129 susceptible strain showed a median of
162 3.48. The 35 CC strains challenged demonstrated a high degree of variability with median bacterial
163 loads ranging from 2.52 to 5.96 in spleen and from zero to 5.05 in liver. ANOVA test showed a
164 significant impact of the strain on the phenotype (p-value < 0.001 for spleen and liver).
165 CC024/GeniUnc, CC017/Unc and CC016/GeniUnc were the most resistant strains in both spleen and
166 liver (0.8-fold lower spleen and 2-fold lower liver CFUs levels than B6 control mice). Some mice in these
167 CC strains were able to eliminate all bacteria in the liver. CC018/Unc and CC009/Unc were the most
168 susceptible strains in both spleen and liver (0.7-fold higher spleen and 1.3-fold higher liver CFUs levels
169 than 129 control mice). CC006 /TauUnc and CC075 /Unc are two particular strains, which have a
170 significant lower SE bacterial load in spleen compared to B6 and a higher, but not significant, SE
171 bacterial load in liver compared to 129. Correlation between spleen and liver phenotypes was low
172 (Pearson $R^2 = 0.64$).

173

174 Covariants in CC experiment

175 Type I ANOVA test was performed to assess sex (females and males), age (7-17 weeks) and experiment
176 (eight distinct experiments) effects on host resistance to *S. Enteritidis* at 22 days post-infection. Sex
177 effect was not significant for spleen and liver (p-value of 0.88 and 0.08, respectively). Age and
178 experiment were significant for both spleen and liver (p value < 0.001). Data were normalized between
179 experiments using B6 mean load and standard deviation. Age and sex were further used as covariant
180 factors in the genome scan analysis.

181



182

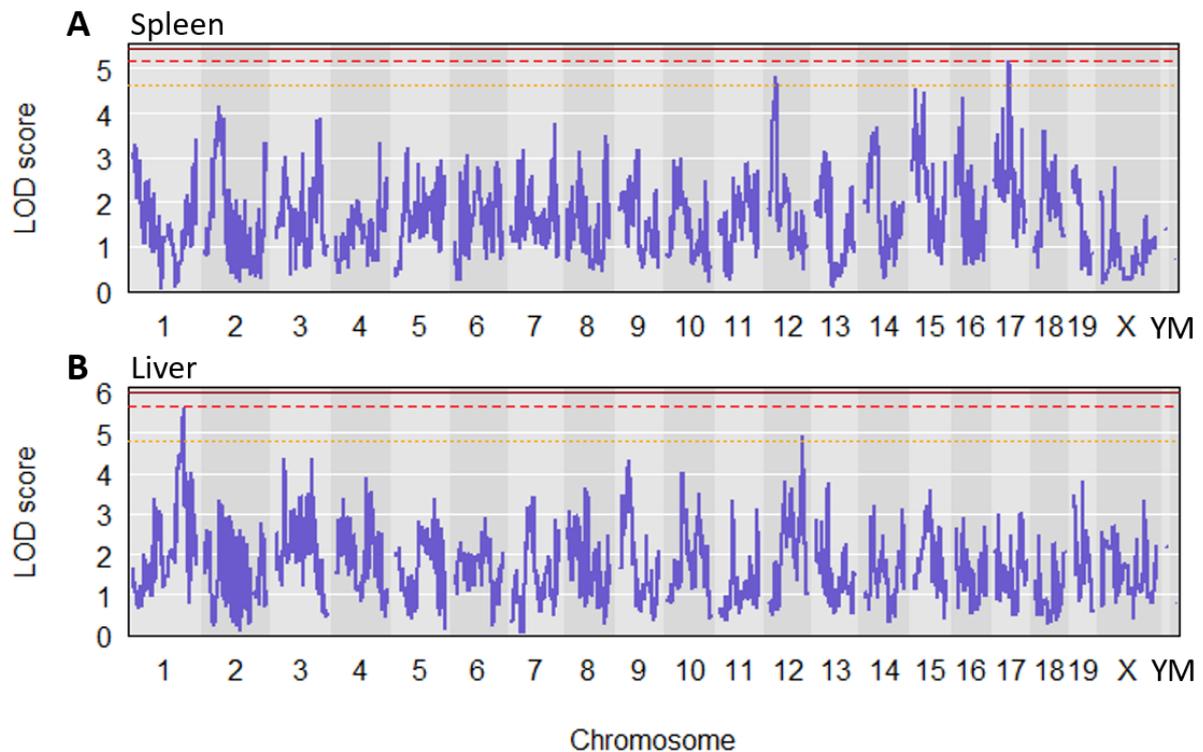
183 **Figure 1. Bacterial loads in CC, B6, and 129 control strains at day 22 post-infection with *Salmonella***
 184 ***Enteritidis*.** Groups of 7-15 weeks old mice for 35 CC strains (white boxes), B6 and 129 (greyed boxes),
 185 were inoculated with 10^3 CFUs of *Salmonella Enteritidis* strain LA5 and euthanized 22 days after
 186 infection for organ bacterial load assessment. Results are presented as the \log_{10} (CFUs/gram of
 187 tissue) in the spleen (A) and the liver (B). The phenotype of each strain is shown as boxes and whisker
 188 plots. The bottom, medium, and top bands of boxes correspond to the first, second, and third
 189 quartiles. The minimum and maximum bacterial load values for each strain are represented by the
 190 ends of whiskers. CC009/Unc and CC018/Unc showed a high level of bacteria in both organs
 191 compared to 129 susceptible control mice (5-10 folds higher levels), while CC016/GeniUncJ,
 192 CC017/Unc, and CC024/GeniUnc had lower levels (>10 fold difference) than B6 resistant control mice.
 193 Mean bacterial loads between extreme CC strains and control resistant or susceptible strains were
 194 compared by a one-way ANOVA test. Asterisks indicate respective P-value of $P < 0.1$ (*), $P < 0.01$ (**),
 195 $P < 0.001$ (***)).

196

197 Identification of QTLs associated with SE load in CC strains

198 To identify the genomic loci that control the host response variation to SE among CC strains, we
 199 performed QTL mapping on bacterial loads in spleen and liver at day 22 post-infection. Figure 2 and
 200 Table 1 summarize QTL mapping results with significant levels, peak position, and interval. For liver
 201 bacterial load we identified one significant QTL region on chromosome 17 (*Ses11*) with the most
 202 significant association (genome-wide level $E < 0.1$). The peak is located at 45.93 Mbp (GRC Build 37)
 203 with a LOD score of 5.17 and a confidence interval ranging from 26.44 to 52.17 Mbp. Over one

204 thousand genes are located in this interval. Several suggestive QTLs were also identified at the
 205 genome-wide level of $E < 0.63$. One associated with spleen bacterial load on chromosome 12 (*Ses13*)
 206 and two associated with liver bacterial load on chromosomes 1 (*Ses12*) and 12 (*Ses14*).



207

208 **Figure 2. QTLs associated with bacterial loads in spleen and liver after *S. Enteritidis* infection in CC**
 209 **strains.** Genome-wide associations for bacterial loads in spleen (A) and liver (B) in 35 CC strains. The
 210 mouse genome location is on the X-axis and significance (LOD score) on the Y-axis, with genome-wide
 211 thresholds of association at $E < 0.63$, $E < 0.1$, and $E < 0.05$ levels indicated respectively by horizontal
 212 orange (dots), red (dash) and brown (full) lines. For spleen bacterial load, only one QTL (*Ses11*) on
 213 chromosome 17 reached the significant ($E < 0.1$) level and one QTL (*Ses13*) on chromosome 12 reached
 214 the suggestive level ($E < 0.63$). For liver bacterial load, only suggestive ($E < 0.63$) QTLs were identified on
 215 chromosomes 1 (*Ses12*) and 12 (*Ses14*).

216

217 Variability of response to SE infection in DO

218 A total of 196 mice were infected with SE and bacterial loads in spleen and liver were assessed at 22
 219 days post-infection. In spleen, we observed a large phenotypic variation of bacterial loads ranging from
 220 zero to 5.55 \log_{10} (CFUs/g). Seven DO animals (3.6% of total DO mice tested) demonstrated a strong
 221 capacity of clearing infection with no detectable bacteria in their spleen. In liver, we observed a large
 222 phenotypic variation with bacterial loads ranging from zero to 4.69. Eighty-two DO animals (43% of the

223 total DO mice tested) had successfully cleared the infection (no detectable bacteria in their liver).
 224 Correlation between spleen and liver phenotypes was very low (Pearson $R^2 = 0.24$).

QTL	Population	Target organ	Chr	Peak (Mbp)	LOD	Sig. Level	Interval (Mbp)	Nb of genes or pseudogenes	High allelic effect pattern	Genes with significant SNPs	Genes containing non synonymous or splicing SNPs
Ses13	CC	spleen	12	22.29	4.82	0.62	16.15-32.31	435	-	-	-
Ses11	CC	spleen	17	45.93	5.17	0.1	26.44-52.17	1102	-	-	-
Ses15	DO	spleen	2	8.15	10.69	0.01	7.73-9.36	14	C57BL/6J	1 (Gm13211)	0
Ses17a	DO	spleen	17	34.23	8.60	0.1	30.77-35.53	330	-	35	<i>Btn14</i>
Ses12	CC	liver	1	153.79	5.60	0.62	137.78-155.24	297	-	-	-
Ses14	CC	liver	12	104.62	4.90	0.62	51.60-110.18	1505	-	-	-
Ses16	DO	liver	4	36.38	7.66	0.01	34.72-38.66	42	NZO_HILtJ and PWK_PhJ	1 (Lingo2)	0
Ses17b	DO	liver	17	34.23	10.03	0.05	30.77-35.53	330	-	59	<i>Col11a2</i> , <i>Tap2</i> , <i>Bag6</i> , <i>Atp6v1g2</i> , <i>Mir6975</i> , <i>Gm18733</i> , <i>Ly6g6f</i> and <i>Lst1</i>

225 **Table1. Summary of QTLs associated with bacterial loads in spleen and liver post-*S. Enteritidis***
 226 **infection in CC strains and DO mice.** QTL nomenclature, Population, Target organ, chromosome (Chr),
 227 Peak position (in Mbp, GRC build 38), LOD score, genome-wide significance level (Sig. level), QTL
 228 confidence interval (in Mb), are given. Numbers of coding genes or pseudogenes, High allelic effect
 229 founder origin, Genes carrying significant SNPs post SNP merge analysis and Genes with non-
 230 synonymous or splicing SNP variants are also presented.

231

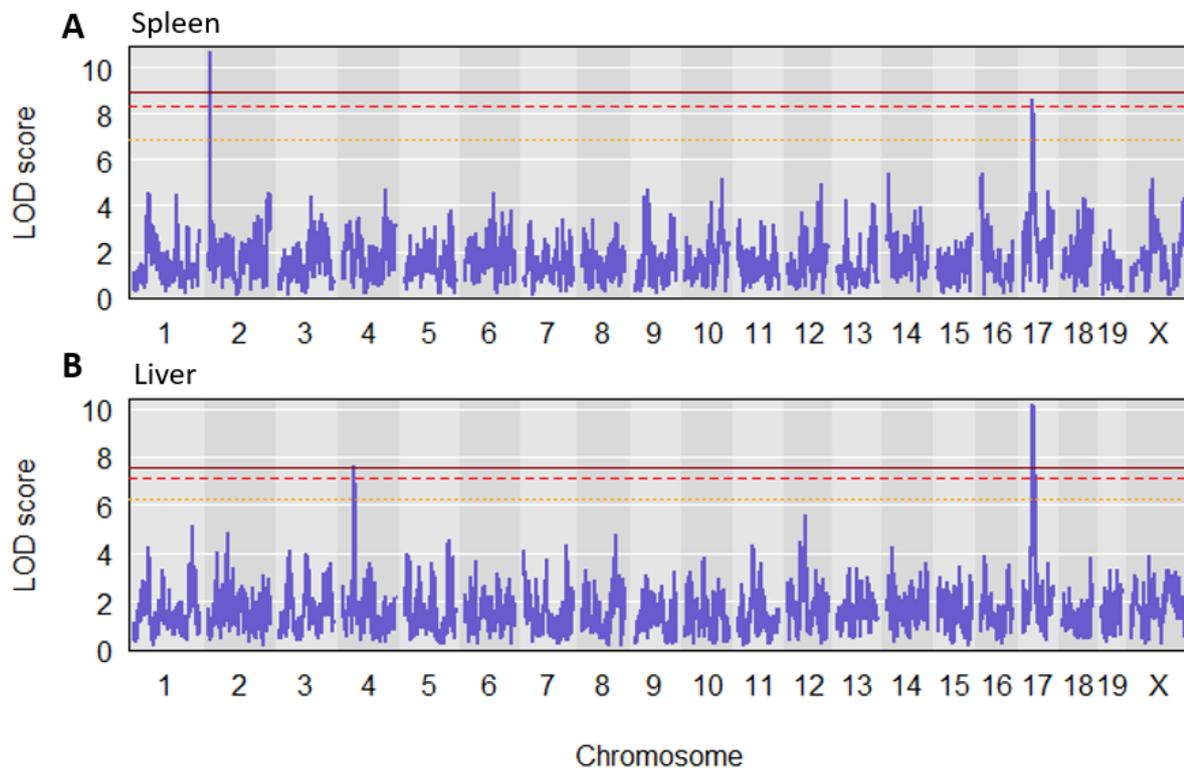
232 Covariants in DO experiment

233 Type I ANOVA test was performed to assess age (7-9 weeks) and batch (four experiments) effects on
 234 host resistance to SE. No significant differences were found neither for age (p value of 0.09 and 0.4 for
 235 spleen and liver, respectively) nor for batch factors (p value of 0.23 and 0.47 for spleen and liver,
 236 respectively). Thus, QTL mapping was performed without covariant.

237 Identification of QTLs associated with SE load in DO mice

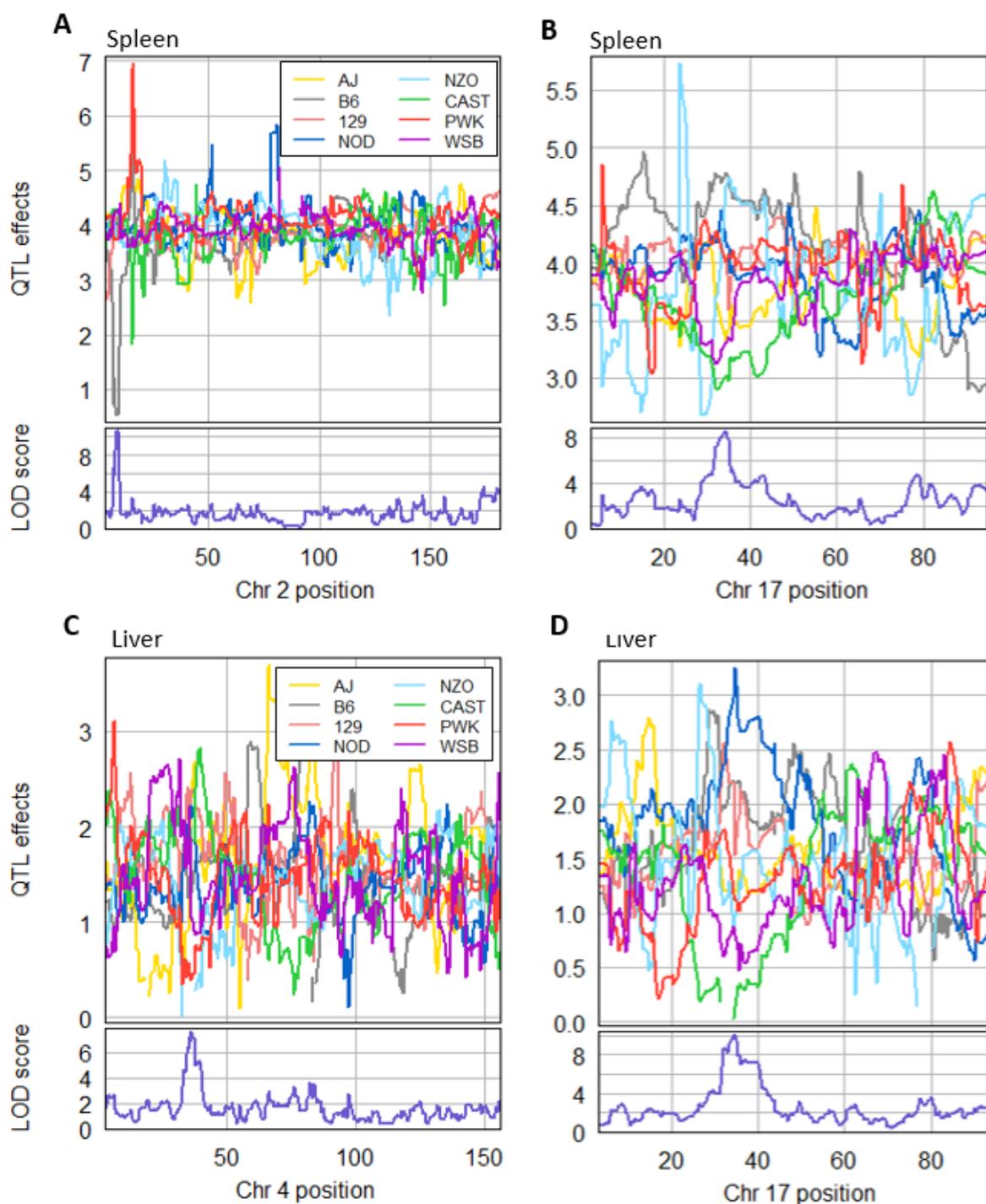
238 Likewise to CC strains, we performed QTL mapping on bacterial loads in spleen and liver at day 22 post-
 239 infection in DO mice. Figure 3 and Table 1 summarize QTL mapping results with significant levels, peak
 240 position, and interval. Three significant QTLs associated with spleen or liver bacterial loads were
 241 identified (*Ses15* to *Ses17*). The first QTL on chromosome 2 (*Ses15*) is associated with spleen bacterial
 242 load ($E < 0.01$). The peak is located at 8.15 Mbp (GRC Build 37) with a LOD score of 10.69 and a
 243 confidence interval between 7.73 and 9.36 Mbp (1.5 LOD drop interval). The second QTL, on

244 chromosome 4 (*Ses16*) is associated with liver bacterial load ($E < 0.01$). The peak is localized at 36.38
 245 Mbp (LOD=7.66; interval = 34.72-38.66 Mbp). The third QTL (*Ses17*) was identified on chromosome 17
 246 with a peak at 34.23 Mbp (confidence interval = 30.77 - 35.53 Mbp) and was associated both with
 247 spleen ($E < 0.1$) and liver ($E < 0.05$) bacterial loads, with LOD scores of 8.60 and 10.03 respectively.



248

249 **Figure 3. Genome-wide linkage analysis for spleen (A) and liver (B) bacterial loads in DO mice at**
 250 **day 22 post-infection with *Salmonella Enteritidis*.** Genome-wide associations for bacterial loads in
 251 spleen (A) and liver (B) in DO mice. The mouse genome location is on the X-axis and significance (LOD
 252 score) on the Y-axis. Genome-wide significance thresholds of association, calculated after 1000
 253 permutations, are represented by horizontal lines for $P < 0.05$ (full brown line), $P < 0.1$ (red dashed line)
 254 and $P < 0.63$ (orange dotted line). Mapping revealed one significant QTL (*Ses15*) on chromosome 2
 255 ($P < 0.05$) and one suggestive QTL (*Ses17a*) on chromosome 17 ($P < 0.1$) associated with bacterial load
 256 in spleen (A), and two significant QTLs ($P < 0.05$) on chromosome 4 (*Ses16*) and 17 (*Ses17b*) associated
 257 with liver bacterial load (B).



258

259 **Figure 4. Founder contribution.** Genome scan and founder contribution for significant QTLs in spleen,260 *Ses15* (A) and *Ses17a* (B) and in liver *Ses16* (C) and *Ses17* (D). Each of the 8 founders is in a different

261 color. The mouse genome location is on the X-axis (bottom) and Y-axis shows the estimated

262 phenotypic effects contributed by each founder haplotype (top). *Ses15* QTL is driven mainly by the B6263 allele (lower values). *Ses17a* is driven mainly by allele contrast between CAST/WSB versus B6/NZO264 alleles. *Ses16* QTL is driven mainly by allele contrast between PWK/NZO versus A/CAST. *Ses17b* is

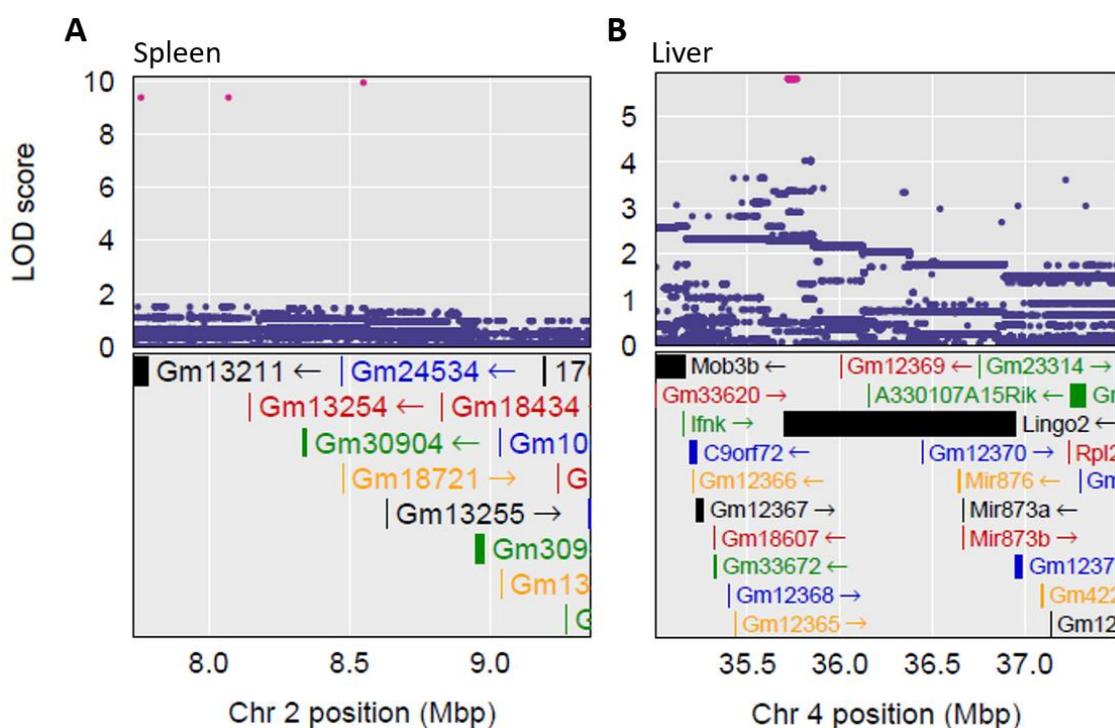
265 driven mainly by allele contrast between CAST/WSB versus NOD alleles.

266 Founder effects analysis and candidate genes

267 We plotted founder contribution coefficients to identify the phenotypic effect contributed by each DO
 268 founder strain at the locus of interest (Figures 4). Merge analysis was performed to narrow down the
 269 number of SNPs and of candidates genes.

270 Within *Ses15* (chromosome 2), decreasing effect is contributed by C57Bl/6J haplotype and increasing
 271 effect by allelic variation inherited from the other seven founder strains (Figure 4A). In the interval
 272 region (7.73-9.36 Mbp), 14 genes were identified. The merge analysis highlighted three SNPs with
 273 maximum LOD value and with the correct allelic effect pattern (genotype at these SNPs divided into
 274 two distinct groups: C57BL/6J versus others). One SNP is in the intronic region of the lincRNA gene
 275 Gm13211 and the two other SNPs are in intergenic region (Figure 5A).

276 Within *Ses16* (chromosome 4), founder coefficient plot showed that NZO/HILtJ and PWK/PhJ alleles
 277 were associated with lower liver bacterial loads (Figure 4C). The interval region (34.72-38.66 Mbp)
 278 contains 42 genes. The merge analysis highlighted 183 SNPs with maximum LOD value and with the
 279 correct allelic effect pattern. All these SNPs are localized in the intronic region of one single gene,
 280 *Lingo2* (Figure 5B).



281
 282 **Figure 5: SNP association plots.** QTL region (*Ses15*) in spleen on chromosome 2 (A) and QTL region
 283 (*Ses16*) in liver on chromosome 4 (B). The most significant SNPs are plotted in pink. The bottom panel
 284 shows all genes present in the interval.

285 *Ses17a* (Chromosome 17) is driven mainly by allelic contrast between CAST/EiJ -WSB/EiJ versus
286 C57BL/6J - NZO/HiLtJ alleles (Figure 4B). The merge analysis highlighted 185 SNPs. The interval region
287 contains 330 genes and 35 of them were further retained as significant SNPs. One SNPs among the 185
288 is a missense SNP and overlap the annotated *Btnl4* gene.

289 *Ses17b* (Chromosome 17) is driven mainly by allelic contrast between CAST/EiJ - WSB/EiJ versus
290 NOD/HiLtJ alleles (Figure 4C). The association analysis highlighted 534 SNPs. The interval region
291 contains 330 genes and 59 of them were significant SNPs. Among these genes, eight contained SNPs
292 associated with missense, nonsense, stop or splice site effect.

293 **DISCUSSION**

294 In this study, we used both CC and DO mice to explore the host genetic diversity, and identify new
295 regions involved in host control of SE infection.

296 Compared to classical laboratory inbred strains, the 35 CC strains tested exhibited broader bacterial
297 load variation in both spleen and liver at day 22 post-infection. Interestingly, some CC strains showed
298 a higher SE bacterial load than 129 susceptible strain both in spleen and liver (CC009/Unc and
299 CC018/Unc) while others showed a lower SE bacterial load than B6 resistant strain (CC024/GeniUnc,
300 CC017/Unc, CC016/GeniUnc). We also identified two strains (CC006/TauUnc and CC075/Unc) which
301 have a significant lower SE bacterial load in spleen compared to B6 and a higher, but not significant,
302 SE bacterial load in liver compared to 129. These results illustrate, as previously shown for *Salmonella*
303 Typhimurium [14, 15], that the host genetic variation across CC strains allows the discovery of new
304 extreme phenotypes not previously observed in classical laboratory strains. These CC strains with
305 extreme phenotypes constitute potential new models to study the pathophysiology of SE infection.

306 We identified only one significant ($E < 0.1$) QTL on chromosome 17 (*Ses11*), and three suggestive
307 ($E < 0.63$) QTLs on chromosomes 1 (*Ses12*) and 12 (*Ses13* and *Ses14*). None of these QTLs were in
308 common between the two explored organs and we observed a low correlation between spleen and
309 liver traits. This could be due to a too small number of CC strains tested, or the effect size of each QTL
310 may be too weak. Another hypothesis could be that different genes and mechanisms control bacterial
311 loads in spleen and liver.

312 *Ses11* is the only significant QTL identified with CC strains, and associated with spleen bacterial load.
313 However, the interval region is large (25Mb), and contains more than 1000 genes. Interestingly, the
314 interval contains the Histocompatibility (H2) complex, which is known to be associated with ST
315 infection in congenic mice [27] and with SE infection in another species model, such as congenic

316 chicken lines [28–30]. Other QTLs (*Ses12*, *13* and *14*) are only suggestive , with large interval regions
317 which did not allowed the identification of potential candidates genes.

318 It has been previously shown that *Slc11a1* gene has a major impact on *Salmonella* susceptibility in
319 laboratory strains. Localized on chromosome 1 (77.3Mb), *Slc11a1* was first associated with ST
320 resistance using F1 and F2 backcrosses between resistant C57BL/6J and susceptible BALB/c [4, 6]
321 strains. A single mutation carried by C57BL/6J, but not by 129S1/SvImJ, is responsible for the loss of
322 function of the protein [31]. Unlike during ST infection, it seems that during SE infection (chronic
323 carriage model), the mutated allele carried by B6 would allow a more rapid elimination of the bacteria
324 [7]. Interestingly, CC009/Unc and CC018/Unc, identified as extreme susceptible strains, both inherited
325 the 129S1/SvImJ susceptible haplotype, that could explain part of their phenotype. However we did
326 not identify any QTL around the *Slc11a1* gene. These results illustrate that a major gene identified
327 using laboratory mice may not have the same impact in a population with a higher genetic diversity.

328

329 The same experimental conditions were used on DO mice, and SE bacterial loads assessed in spleen
330 and liver at day 22 post-infection. Large phenotypic variations were observed reflecting the high
331 genetic variation present in the DO population. Some mice were able to eliminate all bacteria in spleen
332 and in liver (3.9% and 43% of animals with no detectable bacteria respectively). Correlation between
333 spleen and liver traits was very low, and lower than what was observed in CC strains. This could be
334 explained by the high genetic diversity present in DO population with each mice carrying an unique
335 genetic combination with most loci at heterozygous status and allowing more epistatic interactions.

336 In DO mice, significant QTLs were identified with higher mapping resolution than in CC. Intervals for
337 QTLs were reduced to small regions, under 5 Mb. A QTL on chromosome 17 (*Ses17*) was identified both
338 for spleen and liver traits and regions overlapped around the *H2* complex. Interestingly, *Ses17* is
339 included in the confidence interval of *Ses11* identified for spleen bacterial load in CC strains. QTLs on
340 chromosomes 2 (*Ses15*) and 4 (*Ses16*) had critical intervals of 1.6Mb and 3.9Mb and contained only 14
341 and 42 genes, respectively. To refine the intervals and identify potential candidates genes, we used
342 founder allelic contribution and performed merge analysis to identify the most significant SNPs. For
343 *Ses15* and *Ses16*, we could narrow down to single candidate genes *Gm13211* and *Lingo2*, respectively.

344 *Gm13211* is a predicted lincRNA gene with unknown function. *Lingo2* (Leucine rich repeat and Ig
345 domain containing 2) is coding for LINGO2 protein which was shown to interact with APP (Amyloid
346 beta A4 Precursor Protein), which itself interacts with Caspase family proteins. Caspase family proteins
347 are responsible for positive regulation of T cell migration. This function could suggest a role of *Lingo2*

348 in host response to SE infection. However, none of the SNPs identified for these two genes are
349 predicted to have any impact.

350 Under *Ses17* on chromosome 17, using founder allelic contribution and merge analysis more than 300
351 genes still remain. By selecting non-synonymous (missense, nonsense or stop) or splicing variants, we
352 were able to identify one candidate gene under *Ses17a* (*Btnl4*) and eight genes under *Ses17b* (*Col11a2*,
353 *Tap2*, *Bag6*, *Atp6v1g2*, *Mir6975*, *Gm18733*, *Ly6g6f* and *Lst1*). *Btnl4* (Butyrophilin-like 4) gene codes for
354 a signalling receptor which is involved in immune system processes, in T cell receptor signaling pathway
355 and in the regulation of cytokine production. *Btnl* gene family could have an impact on gammadelta T
356 cell compartments in epithelial tissue that contribute to it's integrity [32, 33].

357 Among the eight genes under *Ses17b*, three are associated with immune system functions. Firstly, *Tap2*
358 which acts within several processes including antigen processing and presentation of endogenous
359 peptide antigen via the MHC. It was previously shown *in vitro* that TAP proteins are required during *S.*
360 *Typhimurium* antigen recognition [34]. Secondly, *Bag6* acts within several processes including antigen
361 processing and presentation of peptide antigen via MHC class I, immune response-activating cell
362 surface receptor signaling pathway or natural killer cell activation. Finally, *Lst1* is involved in dendritic
363 development and in the regulation of inflammation [35]. All these genes constitute serious candidate
364 genes associated with host immune response to SE infection.

365 By using CC and DO reference populations, which include three wild-derived founders and captured
366 most of the existing diversity in *M. musculus* species, we expected to identify new host genetic variants
367 associated with SE infection. In previous studies using SE infection and B6 and 129S6 laboratory mice,
368 various QTLs (*Ses1-Ses10*) were identified [7] [8]. None of them are localized in the same regions as in
369 our study. Appart from the difference in the genetic population used, this could be due to the fact that
370 we used slightly different experimental conditions (different SE strain and different time-point post-
371 infection [7]). Similarly, our previous results with ST infection on CC strains identified new and different
372 QTLs than the previously identified ones with classical laboratory strains [14]. Moreover, we found that
373 for two of our significant QTLs (*Ses16* and *Ses17*) it's a contrast with at least one of the three wild-
374 derived founder allele that contributed to the QTL, enhancing the value of wild-derived founders in
375 the CC.

376 CONCLUSION

377 Using CC and DO mice, we identified new QTLs (*Ses 11 to Ses 17*) associated with the host response to
378 SE infection. The high mapping resolution obtained with the DO population allowed to reduce critical
379 intervals and identify single gene candidates under *Ses 15* (*Gm13211*) and *Ses 16* (*Lingo2*). Under

380 *Ses17*, four candidate genes (*Btnl4*, *Tap2*, *Bag6* and *Lst1*) contain non-synonymous SNPs and are
381 associated with immune system functions. In future analysis, it could be interesting to validate these
382 candidate genes using genetically altered mice (eg. KO) to further investigate their impact in host
383 response to SE infection.

384 ABBREVIATIONS

385 CC: Collaborative Cross

386 DO: Diversity Outbred

387 CFU: colony forming unit

388 QTL: Quantitative trait loci

389 ANOVA: analysis of variance

390 LOD: logarithm of the odds

391 ADDITIONAL FILES

392 **Additional file 1:** Table S1. Individual organ bacterial loads at day 22 post-infection with *Salmonella*
393 Enteritidis.

394 **Additional file 2:** Table S2. Genes remaining in interval post-merge analysis

395 **Additional file 3:** Table S3. Details of animals (sex, age-range) tested across CC strains

396 REFERENCES

- 397 1. Crump JA, Luby SP, Mintz ED (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*
398 82:346–353
- 399 2. Kirk MD, Pires SM, Black RE, et al (2015) World Health Organization Estimates of the Global and
400 Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data
401 Synthesis. *PLOS Med* 12:e1001921
- 402 3. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET (2014) *Salmonella* chronic carriage:
403 epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol* 22:648–655
- 404 4. Roy M-F, Malo D (2002) Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice.
405 *Genes Immun* 3:381–393
- 406 5. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB (1980) Genetic
407 control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol*
408 *Baltim Md* 1950 124:20–24

- 409 6. Plant J, Glynn AA (1979) Locating salmonella resistance gene on mouse chromosome 1. *Clin Exp*
410 *Immunol* 37:1–6
- 411 7. Caron J, Loredó-Osti JC, Laroche L, Skamene E, Morgan K, Malo D (2002) Identification of genetic
412 loci controlling bacterial clearance in experimental *Salmonella enteritidis* infection: an
413 unexpected role of *Nramp1* (*Slc11a1*) in the persistence of infection in mice. *Genes Immun*
414 3:196–204
- 415 8. Caron J, Loredó-Osti JC, Morgan K, Malo D (2005) Mapping of interactions and mouse congenic
416 strains identified novel epistatic QTLs controlling the persistence of *Salmonella Enteritidis* in
417 mice. *Genes Immun* 6:500–508
- 418 9. Chevenon M, Naccache M, Eva MM, Khan RT, Malo D (2013) Functional validation of the genetic
419 architecture of *Salmonella Enteritidis* persistence in 129S6 mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm*
420 *Genome Soc* 24:218–227
- 421 10. Caron J, Larivière L, Nacache M, Tam M, Stevenson MM, McKerly C, Gros P, Malo D (2006)
422 Influence of *Slc11a1* on the outcome of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infection in mice
423 is associated with Th polarization. *Infect Immun* 74:2787–2802
- 424 11. Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R (2005) Strategies for mapping and cloning quantitative trait
425 genes in rodents. *Nat Rev Genet* 6:271–286
- 426 12. Saul MC, Philip VM, Reinholdt LG, Center for Systems Neurogenetics of Addiction, Chesler EJ
427 (2019) High-Diversity Mouse Populations for Complex Traits. *Trends Genet TIG* 35:501–514
- 428 13. Roberts A, Pardo-Manuel de Villena F, Wang W, McMillan L, Threadgill DW (2007) The
429 polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide
430 resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics. *Mamm Genome Off J*
431 *Int Mamm Genome Soc* 18:473–481
- 432 14. Zhang J, Malo D, Mott R, Panthier J-J, Montagutelli X, Jaubert J (2018) Identification of new loci
433 involved in the host susceptibility to *Salmonella Typhimurium* in collaborative cross mice. *BMC*
434 *Genomics* 19:303
- 435 15. Zhang J, Teh M, Kim J, Eva MM, Cayrol R, Meade R, Nijnik A, Montagutelli X, Malo D, Jaubert J
436 (2019) A Loss-of-Function Mutation in the Integrin Alpha L (*Itgal*) Gene Contributes to
437 Susceptibility to *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Infection in Collaborative Cross Strain
438 CC042. *Infect Immun* 88:e00656-19
- 439 16. Welsh CE, Miller DR, Manly KF, Wang J, McMillan L, Morahan G, Mott R, Iraqi FA, Threadgill DW,
440 De Villena FPM (2012) Status and access to the Collaborative Cross population. *Mamm Genome*
441 23:706–712
- 442 17. Iraqi FA, Churchill G, Mott R (2008) The Collaborative Cross, developing a resource for
443 mammalian systems genetics: A status report of the Wellcome Trust cohort. *Mamm Genome*
444 19:379–381
- 445 18. Morahan G, Balmer L, Monley D (2008) Establishment of “The Gene Mine”: a resource for rapid
446 identification of complex trait genes. *Mamm Genome* 19:390–393
- 447 19. Chesler EJ, Miller DR, Branstetter LR, et al (2008) The Collaborative Cross at Oak Ridge National
448 Laboratory: developing a powerful resource for systems genetics. *Mamm Genome Off J Int*
449 *Mamm Genome Soc* 19:382–9

- 450 20. Copper GL, Venables LM, Nicholas RAJ, Cullen GA, Hormaeche CE (1992) Vaccination of chickens
451 with chicken-derived Salmonella enteritidis phage type 4 aroA live oral salmonella vaccines.
452 Vaccine 10:247–254
- 453 21. Collaborative Cross Consortium CC (2012) The genome architecture of the Collaborative Cross
454 mouse genetic reference population. Genetics 190:389–401
- 455 22. Yang H, Ding Y, Hutchins LN, Szatkiewicz J, Bell TA, Paigen BJ, Graber JH, de Villena FP, Churchill
456 GA (2009) A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. Nat Methods
457 6:663–666
- 458 23. Broman KW, Gatti DM, Simecek P, Furlotte NA, Prins P, Sen S, Yandell BS, Churchill GA (2019)
459 R/qt12: Software for Mapping Quantitative Trait Loci with High-Dimensional Data and
460 Multiparent Populations. Genetics 211:495–502
- 461 24. Yalcin B, Flint J, Mott R (2005) Using Progenitor Strain Information to Identify Quantitative Trait
462 Nucleotides in Outbred Mice. Genetics 681:673–681
- 463 25. MGI-Mouse Genome Informatics-The international database resource for the laboratory mouse.
464 <http://www.informatics.jax.org/>.
- 465 26. Ensembl genome browser. <http://www.ensembl.org/index.html>.
- 466 27. Hormaeche CE, Harrington KA, Joysey HS (1985) Natural resistance to salmonellae in mice:
467 control by genes within the major histocompatibility complex. J Infect Dis 152:1050–1056
- 468 28. Cotter PF, Taylor RL, Abplanalp H (1998) B-complex associated immunity to Salmonella enteritidis
469 challenge in congenic chickens. Poult Sci 77:1846–1851
- 470 29. Lamont SJ, Kaiser MG, Liu W (2002) Candidate genes for resistance to Salmonella enteritidis
471 colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. Vet Immunol Immunopathol
472 87:423–428
- 473 30. Liu W, Miller MM, Lamont SJ (2002) Association of MHC class I and class II gene polymorphisms
474 with vaccine or challenge response to Salmonella enteritidis in young chicks. Immunogenetics
475 54:582–590
- 476 31. Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K, Gros P (1994)
477 Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to
478 infection with intracellular parasites. Genomics 23:51–61
- 479 32. Jandke A, Melandri D, Monin L, et al (2020) Butyrophilin-like proteins display combinatorial
480 diversity in selecting and maintaining signature intraepithelial $\gamma\delta$ T cell compartments. Nat
481 Commun 11:3769
- 482 33. Di Marco Barros R, Roberts NA, Dart RJ, et al (2016) Epithelia Use Butyrophilin-like Molecules to
483 Shape Organ-Specific $\gamma\delta$ T Cell Compartments. Cell 167:203-218.e17
- 484 34. Ugrinovic S, Brooks CG, Robson J, Blacklaws BA, Hormaeche CE, Robinson JH (2005) H2-M3 major
485 histocompatibility complex class Ib-restricted CD8 T cells induced by Salmonella enterica serovar
486 Typhimurium infection recognize proteins released by Salmonella serovar Typhimurium. Infect
487 Immun 73:8002–8008
- 488 35. Fabisik M, Tureckova J, Pavliuchenko N, et al (2021) Regulation of Inflammatory Response by
489 Transmembrane Adaptor Protein LST1. Front Immunol 12:618332

CONCLUSION GENERALE

I. Discussion générale

Diminuer le portage de *Salmonella* Enteritidis dans les élevages avicoles, c'est diminuer la transmission de la bactérie à l'Homme en limitant les intoxications alimentaires dues à la consommation d'aliments contaminés. L'objectif de cette thèse a été d'identifier des facteurs génétiques et microbiens contrôlant la réponse à une infection par SE. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux, chez deux espèces animales : la poule et la souris. Nous avons pu exploiter les avantages de ces deux modèles de manière complémentaire afin d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans la réponse à une infection par *Salmonella*.

1) Deux modèles expérimentaux complémentaires

Les élevages de production avicole étant un des principaux réservoirs des salmonelles, de nombreuses études de transmission et de portage de la bactérie mais aussi des études sur des candidats vaccins, ont permis de mieux comprendre les mécanismes immunitaires de l'hôte impliqués lors d'une infection par *Salmonella* [311]. Plus récemment, les avancées en matière de séquençage ont conduit à une multitude d'études sur le microbiote, notamment chez la poule, permettant de mieux comprendre le rôle de celui-ci dans la réponse à l'infection par *Salmonella* [250, 250, 251], connu depuis longtemps chez cette espèce (Nurmi and Rantala 1973; Mead and Barrow 1990). Par ailleurs, les études génétiques menées sur le portage des salmonelles ont conduit à la démonstration du rôle de la génétique de l'hôte dans le portage et à l'identification de nombreux QTL d'effets faibles à modérés [312]. Enfin, des études ont montré l'existence d'un impact de la lignée génétique sur le microbiote [313–315]. Au cours de cette thèse, nous avons mené une étude visant à mieux comprendre les effets combinés de la génétique et du microbiote de l'hôte sur le portage de SE.

Le modèle « souris » a quant à lui été largement utilisé dans les études génétiques de la réponse à une infection par *Salmonella* [97, 100, 104, 105]. La souris est un très bon modèle expérimental de par ses facilités d'élevage et de manipulation à façon du génome. Elle est un modèle d'étude pour l'homme mais aussi pour d'autres espèces animales. Ainsi des gènes et des mécanismes identifiés d'abord chez la souris ont été validés chez la poule (*Tlr4* et *Slc11a1*)

même s'ils ne semblent pas être autant impliqués chez cette dernière [97, 160–163]. Le développement des nouvelles populations génétiquement très diversifiées telles que le CC et le DO a permis d'optimiser les études génétiques chez la souris [107]. L'utilisation de ces populations nous a permis dans cette thèse d'identifier plusieurs gènes candidats associés à la résistance à SE. Certains de ces gènes ont déjà été associés à une modulation du microbiote intestinal. Ils pourraient donc jouer sur la résistance à SE *via* leur effet sur le microbiote. De telles populations ne sont malheureusement pas disponibles dans le modèle « poulet », qui ne possède pas tous les avantages de la souris comme modèle d'étude.

2) Discussion des résultats obtenus dans le modèle « poulet »

Dans le modèle « poulet » nous avons étudié l'impact de la lignée expérimentale (N ou 6₁) sur le portage des salmonelles dans les caecas, la composition du microbiote caecal et fécal et l'expression des gènes dans les tonsilles caecales. Deux expérimentations à un mois d'intervalle ont été menées. L'objectif de cette étude était d'approfondir nos connaissances sur les relations entre l'hôte, son microbiote caecal et le niveau d'infection par SE.

Chez la poule, des études ont déjà montré l'impact de la génétique de l'hôte sur la résistance à SE en utilisant différents modèles d'infection et en travaillant sur différents fonds génétiques [313–315]. Notre étude a été menée sur deux lignées expérimentales, les lignées N et 6₁, avec un modèle d'infection en isolateurs. Ce design expérimental a permis de confirmer les différences de portage de SE entre les lignées N et 6₁ déjà observées dans d'autres modèles expérimentaux d'élevage en groupe au sol [76, 123]. L'utilisation de ces isolateurs permet également d'augmenter les variabilités de portage observées entre individus [15]. Nous avons ainsi pu identifier, en moyenne, une différence significative entre les individus de la lignée N et 6₁ (Pvalue < 0,001) et une variabilité plus grande dans la lignée 6₁ (Ecart-type = 1,29) comparée à la lignée N (Ecart-type = 0,68). En réduisant fortement l'homogénéisation de composition habituellement observée avec des animaux au sol, l'utilisation des isolateurs permet de mieux révéler les différences individuelles de microbiote caecal et fécal. Les grandes variabilités de portage intra et inter-lignée ont certainement facilité l'étude des différences d'expression des gènes dans les tonsilles caecales entre les lignées et entre les individus résistants et sensibles.

Des différences de microbiote entre lignées N et 6₁ : un contrôle génétique ?

Dans notre étude, nous avons montré que le fond génétique (lignée N ou 6₁) avait un fort impact sur la composition du microbiote fécal avant infection par SE (Permanova, Pvalue < 0,01) et sur la composition du microbiote caecal après infection (Permanova, Pvalue < 0,001). Ces différences de microbiote pourraient être expliquées par la génétique de l'hôte. L'écosystème intestinal de l'hôte, modulé par la génétique de l'hôte, pourrait modifier le type de bactéries pouvant coloniser l'intestin des individus en favorisant ou en défavorisant certaines bactéries. Des études chez la poule mais aussi chez l'Homme et la souris, ont en effet déjà montré qu'il existait un impact de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote [235, 236, 290, 293–295]. Chez la poule des QTLs associés à l'abondance de certains taxa ont été identifiés, démontrant l'existence d'un contrôle génétique de la composition du microbiote [289, 290].

Cependant, même si la génétique nous semble la cause la plus probable des variations de microbiote observées entre lignées, d'autres facteurs pourraient intervenir (Figure 34). Avant l'infection à J7 (Figure 34A), les individus de la lignée N et 6₁ ont été élevés ensemble au sol dans un environnement contrôlé, dans des conditions d'élevage très similaires (même alimentation, même unité expérimentale, mêmes manipulateurs, ...). Pourtant un impact environnemental n'est pas totalement à exclure car les lignées N et 6₁, dont sont issus les œufs utilisés pour l'expérimentation, sont élevées et maintenues séparément. Le microbiote présent au niveau de la coquille de l'œuf avant l'éclosion pourrait donc être différent. Pour limiter l'effet de ces différences dans notre expérimentation, les œufs ont été nettoyés avant l'éclosion afin de diminuer au maximum les charges bactériennes sur les coquilles. Malgré ces mesures préventives, il est possible qu'une faible charge bactérienne demeure sur les œufs et qu'à l'éclosion, les individus des lignées N ou 6₁ entrent en contact avec des bactéries différentes, pouvant coloniser l'intestin des individus de manière différente. Il a été en effet montré que de très faibles différences environnementales pouvaient, avec l'âge, expliquer d'importantes différences de composition de microbiote [227]. Même si cela semble peu probable, on ne peut donc pas totalement exclure l'hypothèse d'une différence d'exposition environnementale à l'éclosion conduisant à des différences de composition du microbiote entre lignée N et 6.

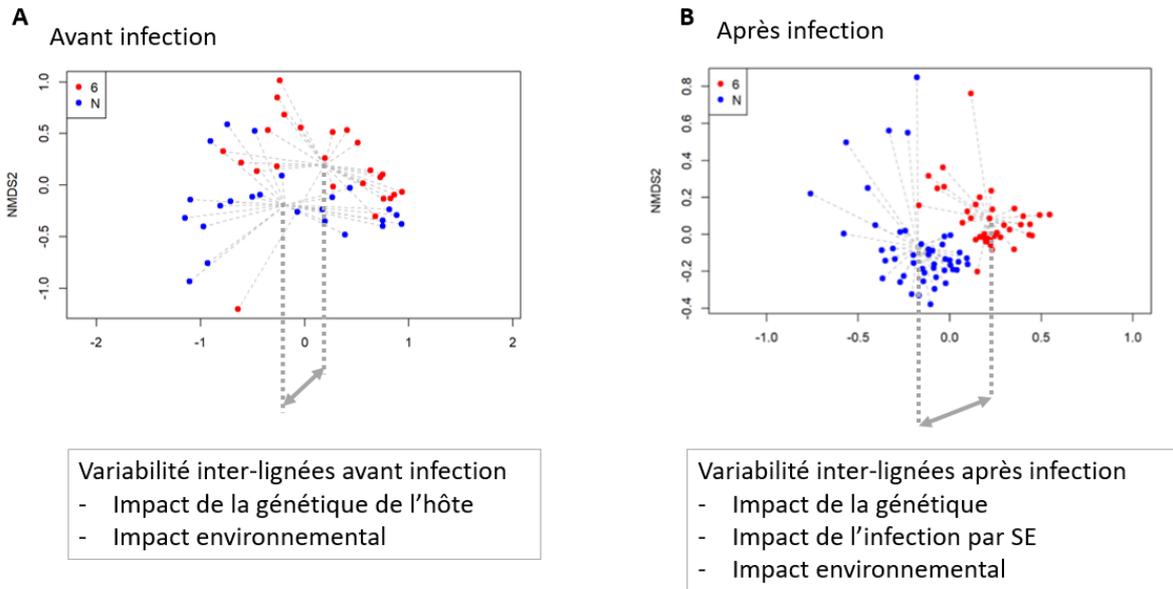


Figure 34 : Potentielles explications des variabilités de composition du microbiote observées entre lignées avant et après infection. (Données issues de l'expérience 1)

A J19 soit 12 jours après l'infection (Figure 34B), des différences de composition de microbiote ont encore été observées entre les lignées. A ce stade, ces différences pourraient être expliquées par plusieurs facteurs. Le premier étant la génétique des individus, comme pour la composition du microbiote fécal à J7. Les variations génétiques entre les lignées pourraient expliquer une différence de colonisation et de maintien de certains taxa au niveau du système digestif. Une deuxième hypothèse serait un impact de l'infection par SE. La lignée 6 étant en moyenne plus sensible que la lignée N, l'infection plus forte dans la lignée 6₁ pourrait faire évoluer le microbiote vers une composition différente de celle de la lignée N. Néanmoins, de nombreuses études comparant des individus infectés et non infectés de même fond génétique ont montré que SE n'avait que très peu d'impact sur la composition du microbiote caecal [245–248]. L'infection par SE ne serait donc pas le principal facteur jouant sur la composition du microbiote. Enfin, le dernier facteur pouvant expliquer la différence de microbiote entre les lignées pourrait être l'environnement, malgré des conditions expérimentales contrôlées. Nous avons élevé les individus en isolateurs, un dispositif limitant les interactions entre les individus et l'environnement. Les lignées ont été séparées dans ces isolateurs. Il aurait été intéressant de regrouper dans un même isolateur des individus de ces deux lignées afin de voir si l'effet lignées était toujours important dans ces conditions. Néanmoins, deux isolateurs ont été attribués à chaque lignée et aucune différence significative n'a été observée entre ces

isolateurs. Cette observation suggère que les différences observées avant séparation dans les isolateurs sont conservées après séparation. Ainsi, le facteur environnemental ne semble pas être le facteur ayant le plus fort impact sur les différences de microbiote observées entre les lignées.

Cependant, une étude menée par Chintoan-Uta et ses collaborateurs sur la résistance à *Campylobacter* dans ces mêmes lignées N et 6₁, n'a pas permis d'identifier ces différences de composition du microbiote caecal malgré des différences d'abondance de certaines OTUs [124]. Deux hypothèses pourraient expliquer ces résultats non-concordants. La première est l'âge des animaux lors du prélèvement caecal : 21 jours pour l'étude de Chintoan-Uta et 7 jours (fécal) ou 19 jours (caecal) dans notre étude. L'hypothèse serait donc qu'avec l'âge, le microbiote se stabilise et converge entre les lignées N et 6₁. En effet, l'âge semble être le facteur le plus important jouant sur la composition du microbiote d'un individu [226]. La deuxième hypothèse, plus probable, serait que le faible nombre d'individus utilisé dans l'étude de Chintoan-Uta, seulement 5 par lignée, ne permette pas d'obtenir des résultats significatifs. En effet, même si le test statistique (Permanova) pour évaluer la différence entre le microbiote des deux lignées n'est pas significatif dans leur étude, la représentation NMDS semble bien montrer un regroupement des échantillons par lignée. C'est pourquoi nous pouvons suggérer qu'avec un nombre plus important d'individus, le test aurait pu être significatif. Ainsi, nous pouvons conclure que dans un dispositif expérimental où l'environnement est contrôlé, les différences de microbiote observées entre lignée N et 6₁ sont expliquées par les différences génétiques entre ces deux lignées.

Quel impact du microbiote sur la résistance à SE ?

Nous avons montré un effet important du fond génétique dans les lignées N ou 6₁ sur la composition du microbiote. Il est donc intéressant de se demander dans quelles mesures ces différences de microbiote peuvent avoir un impact sur la résistance à SE puisque dans ces mêmes lignées, en moyenne, des différences de sensibilité ont été observées. Il est difficile de répondre à cette question en comparant les deux lignées puisque l'effet génétique et l'effet du microbiote sont confondus.

En effet, considérons l'équation génétique simplifiée suivante :

$$P = G + E + M + e$$

Avec :

P : le phénotype soit la sensibilité à SE

G : la génétique de l'hôte

E : l'environnement

M : le microbiote de l'hôte

e : les erreurs du modèle

En comparant les lignées N et 6₁ dans notre modèle expérimental où l'environnement est contrôlé (E fixé), l'équation peut être encore simplifiée ainsi : $P = G + M + e$. Par ailleurs, pour essayer de mieux comprendre l'implication du microbiote dans la résistance à SE, nous avons comparé le microbiote des individus faibles et forts porteurs au sein d'une même lignée. Dans ce cas précis, on peut considérer que l'environnement est contrôlé (E fixé) et même faire l'hypothèse que la génétique varie peu (G fixé), et on peut donc simplifier encore l'équation ainsi : $P = M + e$. Il est néanmoins important de remarquer que cette dernière hypothèse est assez forte car même si nous travaillons sur des lignées maintenues par croisements consanguins, il reste une variabilité génétique résiduelle entre les individus au sein d'une même lignée. De plus, des variabilités environnementales résiduelles ne peuvent être totalement exclues (E reste variable). Néanmoins, nous pouvons faire l'exercice de comprendre les résultats à l'aide de cette équation simplifiée.

Ainsi dans la lignée 6₁, en comparant faibles et forts porteurs, nous avons identifié des différences significatives de composition du microbiote (Pvalue < 0,01) et 39 OTUs différenciellement abondantes dans l'expérimentation 1. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence de microbiote entre groupes (Figure 35) :

- H1 : une conséquence directe de l'infection par SE. La forte multiplication des salmonelles dans les caecae pourrait modifier l'environnement du microbiote, jouant

sur sa composition. Mais il a déjà été montré qu'il existait peu d'impact de l'infection par SE sur le microbiote [245–248]. De plus, cela supposerait que l'infection eut été différente entre les faibles et les forts porteurs dans la lignées 6₁, par exemple une différence de dose d'injection.

- H2 : un impact des variabilités génétiques résiduelles existantes entre les individus (G variable) sur la composition du microbiote. Un génotypage des individus pourrait être utilisé pour vérifier cette hypothèse.
- H3 : une différence de réponse de l'hôte à l'infection, par exemple la modification de l'expression des gènes de l'immunité, impactant indirectement la composition du microbiote. Les données disponibles d'expression des gènes dans les tonsilles caecales montrent en effet que des gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été identifiés au sein de la lignée 6₁ entre les faibles et forts porteurs. Ces différences montrent bien qu'il existe des différences de réponse de l'hôte entre faible et fort porteurs au sein de la lignée 6₁. Mais comment expliquer ces différences de réponse à l'infection ? Des différences d'infection (dose, manipulation), des différences de génétique (variabilités résiduelles) ? Une différence de composition du microbiote avant infection ? Ce qui nous amène à l'hypothèse H4.
- H4 : des différences de composition préexistantes à J6, par exemple à cause de différences d'exposition environnementale avant séparation dans les isolateurs, pourraient conduire à des différences de réponse de l'hôte à l'infection par SE pouvant faire évoluer différemment le microbiote. L'étude sur le microbiote fécal a en effet montré que certaines des OTUs DA entre faibles et forts porteurs dans la lignées 6₁, notamment les bactéries du genre *Pediococcus*, pourraient avoir un impact sur la résistance à SE [274, 283, 309].
- H5 : des différences de composition préexistantes à J6 pourraient être maintenues dans le temps indépendamment de l'infection par SE.

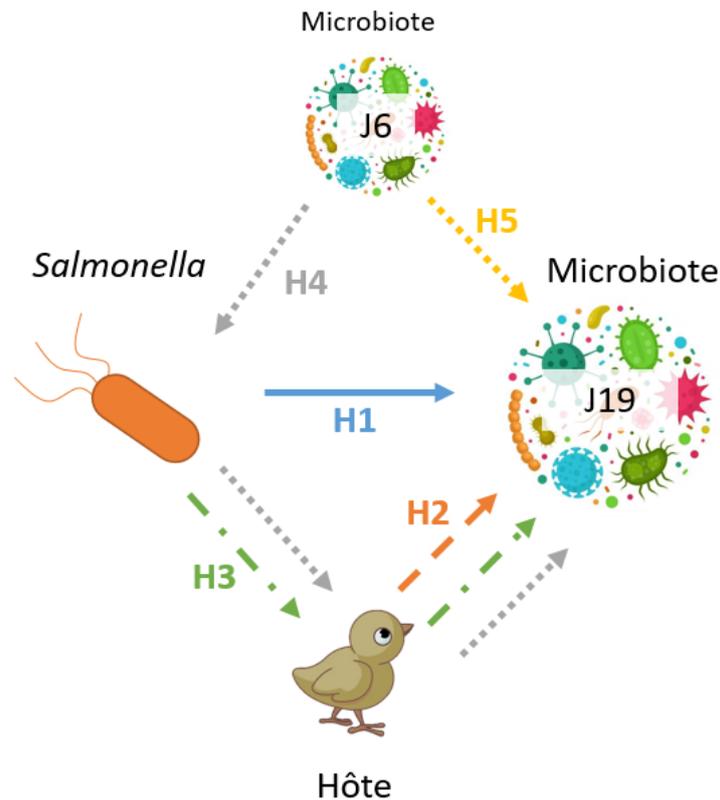


Figure 35 : Potentielles explications de variabilité de composition du microbiote observée entre faibles et forts porteurs de SE à J19 dans la lignée 6₁.
(H = hypothèse)

Dans la lignée N, nous n'avons pas identifié de différence de microbiote entre faibles et forts porteur. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat. Une première serait que du fait de la faible variabilité de portage au sein de la lignée N, nous n'avons pas identifié des groupes faibles et forts porteurs suffisamment contrastés pour identifier des différences de microbiote (P n'est pas assez variable au sein de la lignée). Cette faible variabilité pourrait être expliquée par l'absence d'impact de la variabilité génétique résiduelle sur le microbiote et/ou le portage de la lignée N, à la différence de la lignée 6₁. Une deuxième hypothèse serait que dans la lignée N comparée à la lignée 6₁, les mécanismes de résistance à SE impliquent moins le microbiote caecal. Les différences de portage, faibles mais existantes, entre les groupes pourraient être expliquées par d'autres mécanismes au niveau de l'hôte. En utilisant les données de transcriptomique dans les tonsilles caecales, nous avons montré qu'il existait en effet des différences d'expression de plus de 1000 gènes entre faibles et forts porteurs dans la lignée N. C'est beaucoup plus que dans la lignée 6₁ où seulement 97 DEGs ont été identifiés. Ces 1000 gènes sont également des gènes différents de ceux identifiés dans la lignée 6₁. Notre hypothèse est donc que les mécanismes de résistance à SE sont différents entre les lignées.

Pour conclure, les mécanismes de résistance à SE semblent différents entre la lignée G_1 et la lignée N. Il semble probable que le microbiote soit plus impliqué dans la lignée G_1 . Un résumé des résultats obtenus pour l'expérimentation 1 et les hypothèses expliquant ces résultats ont été représentés dans la Figure 36.

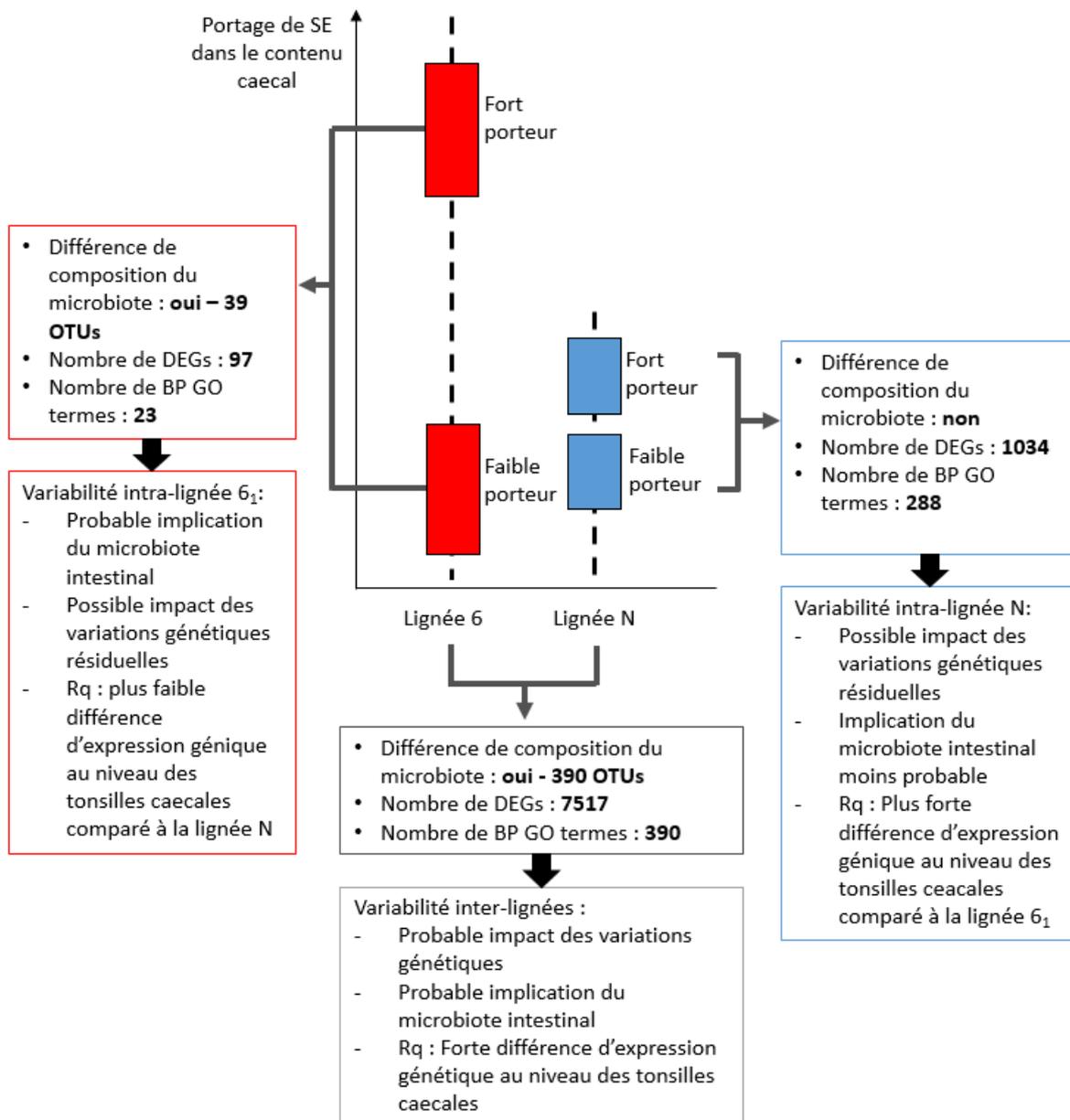


Figure 36 : Résumé des résultats obtenus et hypothèses formulées pour expliquer les variabilités de portage observées intra et inter-lignées.

La figure représente les résultats obtenus entre les individus de la lignée G_1 en rouge et les individus de la lignée N en bleu, pour l'expérimentation 1 présentant les plus fortes variabilités intra-lignée.

Les bactéries, les gènes et les mécanismes signatures de la résistance à SE

Afin d'identifier des bactéries, des gènes et des mécanismes d'intérêt signatures de la résistance à SE, nous avons combiné les résultats des analyses entre lignées avec ceux des analyses intra-lignée. Ainsi, certaines bactéries et certains gènes plus abondants/exprimés dans la lignée résistante N et dans les animaux résistants de la lignée sensible 6₁ sont connus pour être impliqués dans la résistance à SE. Combiner les résultats semble donc intéressant pour cibler les bactéries, les gènes et les mécanismes d'intérêt.

Ainsi, des voies métaboliques réalisées par le microbiote telles que celle des acides gras à chaîne courte (SCFA), ou celle de la dégradation du catéchol ont été identifiées (Article 1). Les SCFA ont des fonctions immunitaires [316, 317] et de maintien de l'équilibre intestinal reconnues [318]. Chez la souris, il a été montré que l'acide butyrique, faisant partie des SCFAs, pouvait augmenter la capacité de l'hôte à résister à une infection par un pathogène en restaurant la barrière gastro-intestinale [319]. Il a été également démontré que l'augmentation des SCFAs dans une culture *in vitro* de cellules intestinales aviaires diminue la pathogénicité de *Salmonella*, bloquant son entrée dans l'organisme [261]. Le mécanisme de dégradation du catéchol pourrait, quant à lui, limiter la pathogénicité des salmonelles en dégradant des molécules, les auto-inducteurs 3, nécessaires à la colonisation et à la propagation de la bactérie dans l'organisme de l'hôte [320–322] mais aussi dans l'environnement [323].

Des voies de signalisation et des gènes d'intérêt ont également été identifiés chez l'hôte dans les tonsilles caecales. Par exemple, la voie de signalisation des récepteurs transmembranaires de la protéine tyrosine kinase, enrichie chez les individus résistants à SE, pourrait entraîner l'activation de facteurs de transcription spécifiques affectant directement la réponse immunitaire innée lors d'une infection par SE [148, 324]. Les gènes identifiés tels que NOS2, DMXL1, MHCIBF2, CLDN7, SIRT5, ENTPD1, SYT7, SLC22A23, sont surexprimés chez les individus résistants et sont impliqués dans des fonctions immunitaires, ce qui en fait de potentiels candidats pour de futures études (Article 2). D'autres gènes identifiés pourraient être impliqués dans cette résistance à SE à travers la modulation du microbiote intestinal. C'est le cas de FUT2, S100B et MUC4 (Article 2). Ainsi, il pourrait y avoir un dialogue entre l'hôte et le microbiote impactant la réponse de l'hôte à l'infection par SE.

Un dialogue entre l'hôte et son microbiote favorisant la résistance à SE

La confrontation des données de description du microbiote et de l'expression des gènes dans les tonsilles caecales nous conduit à émettre l'hypothèse que c'est le dialogue entre l'hôte et son microbiote qui pourrait déterminer le résultats d'une infection par SE. Pour illustrer cette hypothèse, nous allons ici discuter du gène *Fut2* et d'une famille de bactérie, les *Christensenellaceae*. Les deux sont associés à la résistance de l'hôte à l'infection par SE : plus exprimés/abondants à la fois dans la lignée N résistante et chez les faibles porteurs de la lignée 6₁ (Article 1 et 2).

La famille des *Christensenellaceae* a déjà été associée à un impact bénéfique pour la santé chez l'Homme et chez la souris [325]. Par exemple, elle a été associée à la longévité [326], à des impacts bénéfiques sur l'obésité [327, 328] et à la santé métabolique [325]. La capacité des *Christensenellaceae* à produire de l'acide butyrique, un SCFA, leur confère un réel intérêt comme décrit précédemment. Les *Christensenellaceae* sont l'une des familles bactériennes les plus héréditaires du microbiote intestinal humain [328]. Même si cette héritabilité n'a pas été encore évaluée chez le poulet, nous pourrions supposer que les variations génétiques de l'hôte entre les lignées N et 6₁ pourraient entraîner des variations de l'abondance des *Christensenellaceae*, qui pourraient à leur tour affecter la résistance de l'hôte à *Salmonella*.

Fut2 est un gène codant l'enzyme α -1,2-fucosyltransférase impliquée dans la glycosylation au niveau du tractus gastro-intestinal. Chez la souris et chez l'Homme, il a été montré qu'un individu "non sécréteur", hétérozygote pour une mutation de perte de fonction, est plus sensible aux maladies intestinales chroniques telles que la maladie de Crohn et aux infections pathogènes [329] telles que *Salmonella* Typhimurium [330, 331]. En outre, le polymorphisme dans *Fut2* a été associé à la composition et à la diversité du microbiote fécal humain [332], ce qui pourrait expliquer les interactions hôte-microbe et la sensibilité aux infections [333]. Enfin, il a été montré que *Fut2* était associé à l'abondance des *Christensenellaceae* [325].

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que *Fut2* pourrait être un gène indirectement associé à la résistance à SE par la modulation de la composition du microbiote, en augmentant notamment l'abondance de bactéries compétitives contre *Salmonella* telles que les *Christensenellaceae*.

Nous pourrions imaginer que ce genre d'interaction, de dialogue entre l'hôte et son microbiote conférant un avantage lors d'une infection par un pathogène, pourrait être observé avec d'autres gènes comme S100B ou MUC4 et d'autres bactéries du microbiote. Dans la Figure 37, nous avons récapitulé les mécanismes pouvant intervenir dans la résistance de l'hôte à une infection par SE dans un environnement expérimental contrôlé.

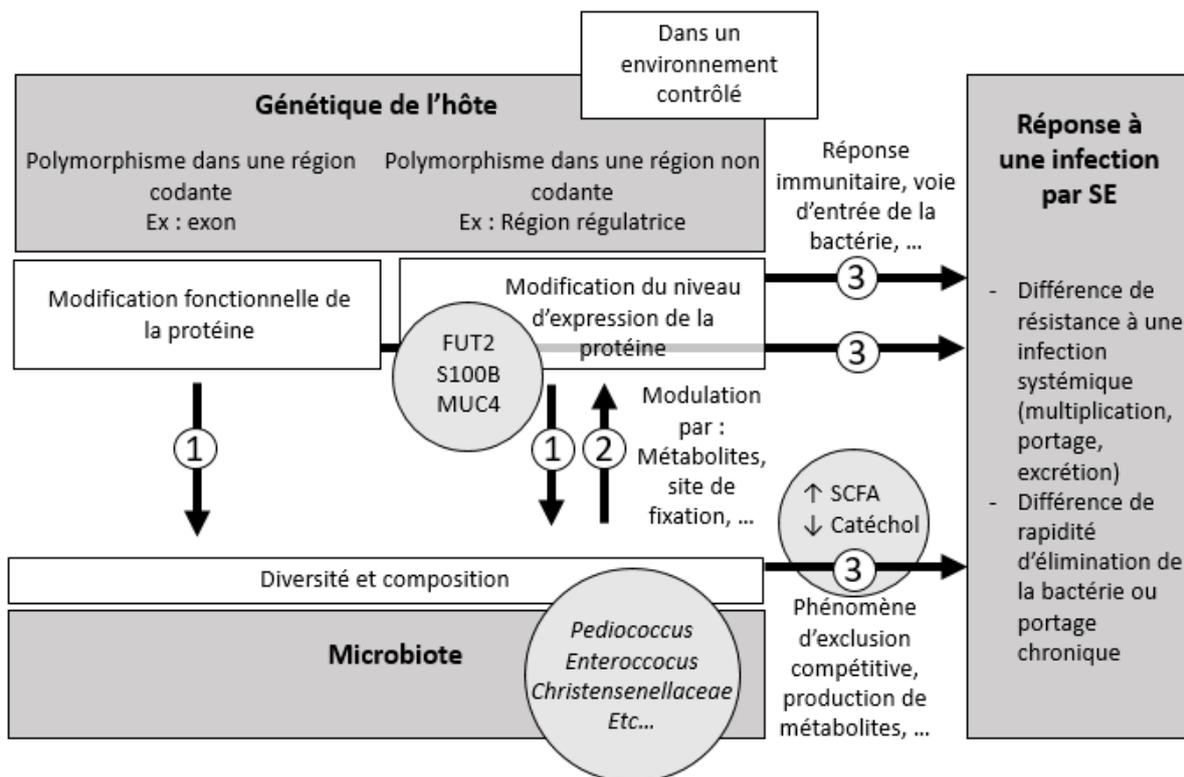


Figure 37 : Bilan des mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance de l'hôte à une infection par SE dans un environnement contrôlé.

Au niveau de l'hôte, des polymorphismes présents dans les régions codantes ou non codantes peuvent avoir un impact sur la diversité et la composition du microbiote intestinal de l'hôte. Cette composition du microbiote pourrait quant à elle avoir un impact sur l'expression des gènes au niveau de l'hôte. L'ensemble de ces interactions pourrait moduler la réponse de l'hôte à une infection par SE.

L'utilisation d'isolateurs dans le design expérimental

Nous avons utilisé des isolateurs afin de diminuer les re-contaminations entre les individus par *Salmonella* et ainsi d'identifier une plus large variabilité individuelle de portage dans une même lignée expérimentale. En effet, l'utilisation au sol de tapis roulants, sous des grilles, permet d'éliminer les fientes contaminées, évitant ainsi leur ingestion par les animaux. L'air est également renouvelé en continu. L'efficacité de ces isolateurs a été montrée dans une

précédente étude à l'INRAE sur une lignée expérimentale de White Leghorn : la lignée PA12 [15]. Avec l'utilisation d'isolateurs, nous observons dès 4 jours après l'infection par SE, des individus présentant une très faible charge bactérienne dans les fientes alors que dans un élevage au sol en groupe, l'ensemble des individus présente une forte charge bactérienne dans les fientes (Figure 38). Les isolateurs augmentent donc la variabilité de portage individuelle au sein d'une même lignée expérimentale, ici PA12. Dans notre design expérimental, l'utilisation des isolateurs a également permis d'observer cette forte différence de portage de SE au sein des lignées expérimentales N et 6₁. Cette variabilité étant plus importante au sein de la lignée 6₁.

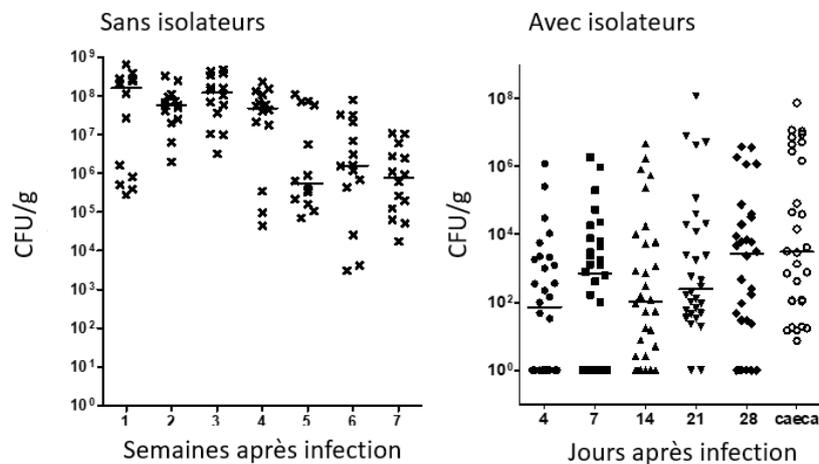


Figure 38 : Charge bactérienne après infection par SE dans les fientes ou les caecae d'individus de la lignée de White Leghorn PA12 avec ou sans l'utilisation d'isoleur. La variabilité individuelle est plus importante avec l'utilisation d'isoleur [15].

Au-delà d'une diminution de la re-contamination entre individus par SE, nous pouvons également supposer que l'utilisation des isolateurs évite l'homogénéisation des microbiotes, par une diminution de l'ingestion des fientes contenant des bactéries commensales des animaux. L'effet environnemental est ainsi mieux contrôlé et permet d'accentuer les éventuelles variabilités de composition du microbiote entre individus au sein d'une même lignée ou entre lignées. Dans notre étude comme dans celle de Kempf *et al.*, des différences de microbiote caecal ou fécal ont alors pu être identifiées au sein d'une même lignée expérimentale (respectivement, 6₁ et PA12) entre faibles porteurs et forts porteurs de SE [251]. Des différences qui n'auraient peut-être pas pu être observées sans l'utilisation de ces isolateurs.

L'utilisation de la ddPCR

Une ddPCR a été utilisée pour le comptage des SE dans les caecas plutôt qu'un comptage sur gélose en frais, classiquement utilisé. En effet, suite à une contamination par une *E. coli* commensale, résistante à la streptomycine, l'antibiotique utilisé pour le comptage sur gélose, nous n'avons pas pu réaliser les comptages sur gélose. Une nouvelle technique de ddPCR a été développée. Une recherche bibliographique a permis d'identifier le gène *InvA*, spécifique à SE et présent en une seule copie dans le génome de la bactérie [334]. C'est ce gène qui est ciblé et quantifié par la technique de ddPCR.

L'utilisation de la ddPCR possède un avantage intéressant : la possibilité de congélation des échantillons de fientes et/ou de caecas sans avoir à les analyser immédiatement en frais le jour de la campagne d'échantillonnage. En effet, les étalements sur gélose peuvent être très chronophages puisque plusieurs étalements doivent être réalisés par individus : plusieurs dilutions par échantillon, afin de tomber dans la gamme de dilution permettant le comptage sur gélose, et plusieurs types de tissus possibles par individus. Un nombre limité d'individus et d'échantillons peut ainsi être traité sur une journée de travail. De plus, le lendemain des étalements, des échantillons mal étalés, pas assez ou trop dilués, doivent être ré-analysés. Ce ré-étalement ne garantit pas l'exactitude des résultats du fait d'une possible multiplication des bactéries dans l'échantillon même celui-ci est conservé au réfrigérateur. L'avantage de la ddPCR est de pouvoir travailler sur des échantillons congelés et donc de désolidariser dans le temps la récupération des échantillons et leurs analyses.

Une autre remarque importante est que le comptage en frais permet le dénombrement des bactéries vivantes à l'instant du prélèvement. La ddPCR compte l'ensemble des ADN cibles présent dans l'échantillon donc des bactéries vivantes et mortes. Les deux analyses ne donnent donc pas exactement les mêmes résultats. L'interprétation des résultats pour des échantillons de fèces doit donc être différente. Avec la première technique, nous évaluons les bactéries vivantes excrétées dans l'environnement et donc pouvant réinfecter un congénère. Avec la technique de ddPCR, nous mesurons la quantité de bactéries vivantes et mortes, donc nous évaluons plutôt la capacité de l'hôte à limiter la multiplication de la bactérie dans son organisme. Une étude de corrélation entre les deux méthodes a été menée mais les résultats ne semblent pas être corrélés (P value=0,35).

Utilisation du 16S plutôt que le séquençage complet de l'ADN

Les analyses 16S sont encore la référence dans l'étude de la composition taxonomique du microbiote. Elles sont peu coûteuses et ne nécessitent pas de larges structures computationnelles. Elles s'appuient également sur des bases de données de références mises à jour régulièrement. Mais cette technique présente des biais d'analyses. Par exemple, une même séquence 16S peut appartenir à différentes espèces n'ayant pas les mêmes fonctions au sein d'un microbiote. Ces espèces sont ainsi comptabilisées ensemble, entraînant une perte d'information fonctionnelle, en plus d'une mauvaise identification taxonomique. Inversement, certaines espèces, voire souches, possèdent plusieurs séquences 16S différentes. En outre ce type d'analyse est très sensible à la méthode d'extraction d'ADN et aux méthodes bio-informatiques et bio-statistiques employées, qui tendent à différer grandement entre études. Le séquençage complet de l'ADN, *Whole Genome Sequencing* (WGS) en anglais, évite ce genre de biais d'analyse. Il permet de travailler directement sur les gènes présents dans un échantillon et donc d'accéder à la composition taxonomique mais également aux fonctions potentielles d'un microbiote, sans biais majeur de quantification. Il permet également de prendre en compte tous les micro-organismes présents dans un échantillon : virus, champignons, archées et bactéries. Mais ce séquençage complet reste complexe à mettre en œuvre. Les coûts restent élevés et la technique nécessite une profondeur de séquençage importante et une bonne couverture afin d'identifier les micro-organismes en faible abondance dans les échantillons, ce qui peut augmenter fortement les coûts de séquençage [335] et nécessite de larges structures computationnelles. Chez l'Homme ou les animaux, des études comparatives entre les deux techniques ont montré que le WGS permet de détecter une plus grande diversité taxonomique et améliore le niveau d'affiliation taxonomique comparé aux analyses 16S [336, 337].

Dans notre étude, certaines bactéries, théoriquement bénéfiques pour la santé, ont été identifiées comme plus abondantes dans la lignée sensible à SE, par exemple, le genre *Blautia*, producteur de butyrate [338] ayant des effets anti-inflammatoires bénéfiques [339]. L'étude au niveau des gènes et des fonctions grâce au WGS pourrait offrir des résultats plus proches de la réalité biologique, évitant ces gaps d'interprétations.

3) Discussion des résultats obtenus dans le modèle « souris »

Dans le modèle « souris », nous avons étudié l'impact du fonds génétique sur le portage chronique des salmonelles dans le foie et la rate 22 jours après infection en utilisant deux nouvelles populations génétiques de référence (GRPs) : les lignées du Collaboratives Cross (CC) et les souris du Diversity Outbred (DO). Ces populations sont issues de huit lignées parentales dont cinq lignées classiques de laboratoire et trois lignées d'origine sauvage. Elles contiennent près de 90% des variations génétiques observées dans l'espèce *Mus Musculus* [109]. Avec l'utilisation de ces GRPs, nous nous attendions à identifier de nouveaux QTLs et de nouveaux gènes candidats associés à la sensibilité de l'hôte au portage de SE. Par manque de temps lié à l'épidémie de Covid19, nous n'avons pas pu réaliser une étude d'infection par SE (voie orale) dans les lignées du CC pour l'étude du portage intestinale en lien avec la composition du microbiote intestinal.

L'identification de nouveaux phénotypes d'intérêt

Comparées aux deux lignées expérimentales classiques de laboratoire, B6 et 129, les 35 lignées du CC testées dans l'étude ont montré une très large variabilité phénotypique quel que soit l'organe cible, foie ou rate. Certaines CC ont montré des phénotypes extrêmes : plus résistantes que la lignée résistante B6 (ex : CC024/GeniUnc) ou plus sensibles que la lignée sensible 129 (Ex : CC018/Unc) quel que soit l'organe cible étudié. D'autres lignées du CC ont montré une combinaison phénotypique différente, avec une sensibilité à SE opposée entre les deux organes cibles : plus résistante dans la rate que la lignée résistante B6 et plus sensible dans le foie que la lignée sensible 129 (ex : CC006/TauUnc), suggérant que des mécanismes de résistance différents pourraient être impliqués dans les deux organes. La faible corrélation ($R^2 = 0,64$) entre les charges moyennes dans le foie et la rate dans les 35 CC testées (Figure 39), appuie cette hypothèse. Les lignées d'intérêt s'éloignant de la droite de régression telles que CC006/TauUnc pourraient servir de nouveaux modèles expérimentaux permettant de mieux disséquer ces mécanismes de résistance.

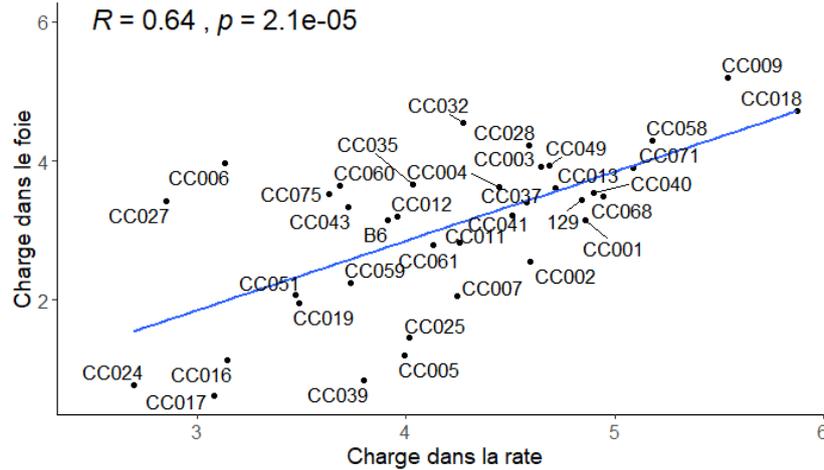


Figure 39 : Corrélation entre la moyenne de la charge bactérienne dans le foie et dans la rate pour l'ensemble des lignées du CC testées.

La droite bleue est une droite de régression linéaire. Un test de corrélation de Pearson a été réalisé ($R=0,64$, $p = 1,8e-05$).

Ces résultats montrent qu'avec la diversité génétique des CC, nous pouvons repérer de nouveaux phénotypes extrêmes ou d'intérêt qui n'auraient pas forcément pu être identifiés dans les lignées classiques de laboratoire.

L'étude avec les souris du DO montre également une très large diversité phénotypique. Celle-ci peut être expliquée par une large variabilité génétique existante entre les individus de par l'accumulation d'évènements de recombinaison lors des accouplements non consanguins ou « *Outbred* ». La faible corrélation ($R = 0,24$) entre les individus (Figure 40) suggère également que des mécanismes différents pourraient être impliqués dans les deux organes cibles. Cette plus faible corrélation dans les DO que dans les CC pourrait être expliquée par l'état hétérozygote des allèles chez les individus DO pouvant augmenter les interactions d'épistasie entre les régions du génome. Nous remarquons également que certaines souris semblent capables d'éliminer complètement les bactéries dans les deux organes cibles (absence de détection de bactéries). Nous discuterons des problèmes que cela peut impliquer lors d'analyses de type QTL mapping (cf. paragraphe distribution des données).

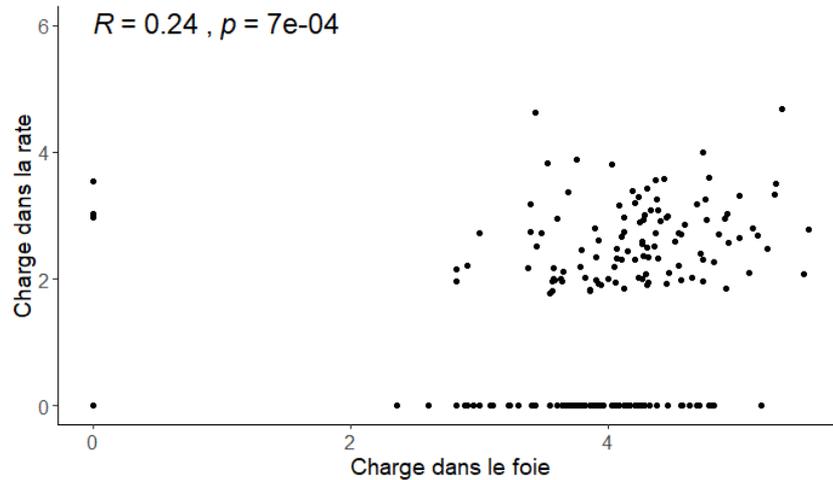


Figure 40 : Corrélation entre la charge bactérienne dans le foie et dans la rate pour les souris du DO.

Un test de corrélation de Pearson a été réalisé ($R=0,24$, $p = 7e-04$).

L'identification de nouveaux loci associés à SE

L'utilisation des CC et des DO a permis d'identifier de nouveaux QTLs (*Ses11-Ses17*), différents de ceux identifiés dans les précédentes études sur des lignées classiques de laboratoire (*Ses1-Ses10*), suggérant que de nouveaux mécanismes de sensibilité à SE ont été identifiés. L'utilisation des trois lignées sauvages dans les croisements qui ont permis d'obtenir les CC et les DO pourrait expliquer ces nouveaux résultats. En effet, pour *Ses16* et *Ses17*, au moins une des trois lignées sauvages explique les variabilités phénotypiques observées. Ce constat montre bien l'intérêt de ces nouvelles populations murines dans les études de génétique quantitative.

Des résultats faiblement significatifs avec les lignées du CC

Même si l'utilisation des CC a permis d'identifier quatre QTLs, seulement un (*Ses11*) dépasse le seuil de significativité ($E < 0,1$) et les larges intervalles de confiance de ces QTLs n'ont pas permis d'identifier un nombre limité de gènes candidats. Il est possible que le nombre limité de CC dans notre analyse ($n = 35$), ne soit pas suffisant pour obtenir des pics de LOD scores suffisamment élevés. Des simulations ont pourtant montré que l'utilisation de 30 lignées du CC permet d'identifier à 90% les 8 allèles des lignées parentales (Figure 41). En effet, mathématiquement, en supposant que toutes les CC possèdent des allèles parentaux différents, la chance de détecter les huit allèles augmente avec le nombre de CC utilisées dans l'analyse. Ainsi, avec 10 CC il n'y a presque aucune chance d'identifier les huit allèles, alors

qu'avec 20 CC, la probabilité augmente à 50%. De plus, la plupart des SNPs ne présentant que deux allèles, la probabilité de détecter un allèle que plusieurs fondateurs partagent est donc plus élevée que si les huit allèles des fondateurs étaient différents. Ainsi, avec les 35 lignées utilisées dans notre analyse, nous sommes capables d'identifier correctement les allèles des SNPs. Une autre étude menée dans notre laboratoire de recherche a réussi à identifier des QTLs significatifs en utilisant le même nombre de CC [106]. Le nombre de lignées dans l'analyse semble donc être correct.

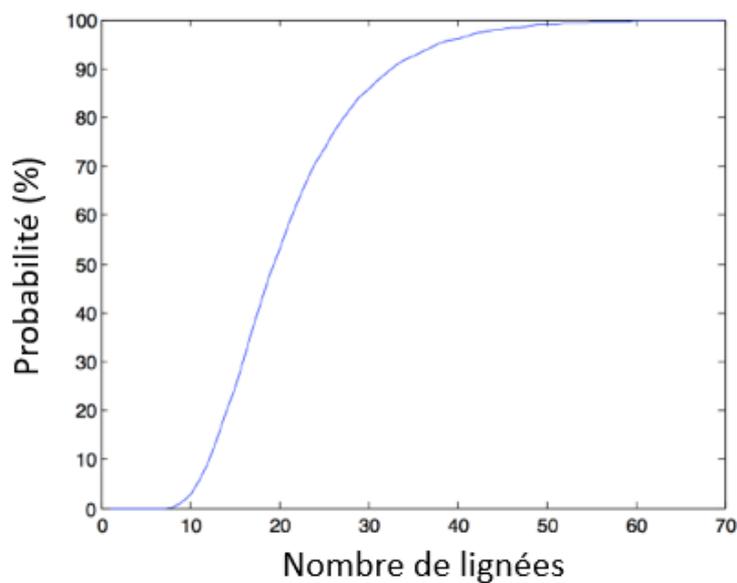


Figure 41 : Probabilités théoriques de détection de chacun des allèles des huit lignées parentales des CC en fonction du nombre de lignées dans l'analyse.

Une deuxième hypothèse pouvant expliquer ces résultats CC peu significatifs serait la reproductibilité entre expérimentations et la méthode de normalisation des données utilisées. En effet, il est techniquement impossible d'analyser l'ensemble des souris des 35 lignées du CC dans une même expérimentation pour des questions techniques : i) temps de traitement des échantillons (maximum 50 échantillons par expérimentation) et ii) disponibilité simultanée des souris (âge et sexe adéquats, en nombre suffisant). Les ANOVA réalisées sur les charges bactériennes dans les organes cibles montrent qu'il existe un effet significatif de l'expérimentation ($P < 0,001$). Ces effets pourraient être expliqués par différents facteurs tels que des différences de dose injectées, des conditions environnementales contrôlées mais pouvant varier (températures, humidité), des manipulateurs différents... Afin de normaliser entre expérimentations, des souris contrôles B6 ont été ajoutées dans chaque expérimentation (Figure 42, A et B). Nous pouvons constater que la reproductivité des

expérimentations peut être très variable. Par exemple dans l'expérimentation n°53, la moyenne des souris contrôle B6 dans la rate est bien plus élevée que dans les autres expérimentations, pourtant les valeurs semblent normales dans le foie. Une normalisation sur cette expérimentation abaisse fortement les valeurs des charges bactériennes dans la rate de l'ensemble des CC testées dans cette expérimentation. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les résultats de cette expérimentation n°53 : i) seules les souris B6 contrôles présentent une charge bactérienne plus importante du fait d'un biais de manipulation (dose injectée plus grande, ...) ; ii) l'ensemble des souris dans cette expérimentation présentent une charge bactérienne plus importante. Des souris de deux lignées du CC dans cette expérimentation ont également été testées dans d'autres expérimentations : la CC075 et la CC032 (Figure 42, C). L'hypothèse 2, soutenant que l'ensemble des souris dans cette expérimentation présente une infection plus importante dans la rate semble se confirmer pour la lignée CC075 (Test ANOVA, $P < 0,001$) mais semble moins flagrant pour la lignée CC032 (Test ANOVA, $P = 0,2$). Des tests de QTL mapping avec ou sans cette expérimentation ont été réalisés, montrant que les profils de LOD scores obtenus n'étaient pas modifiés mais que les seuils de significativité étaient différents. Le choix de retirer cette expérimentation des analyses n'a pas été retenue.

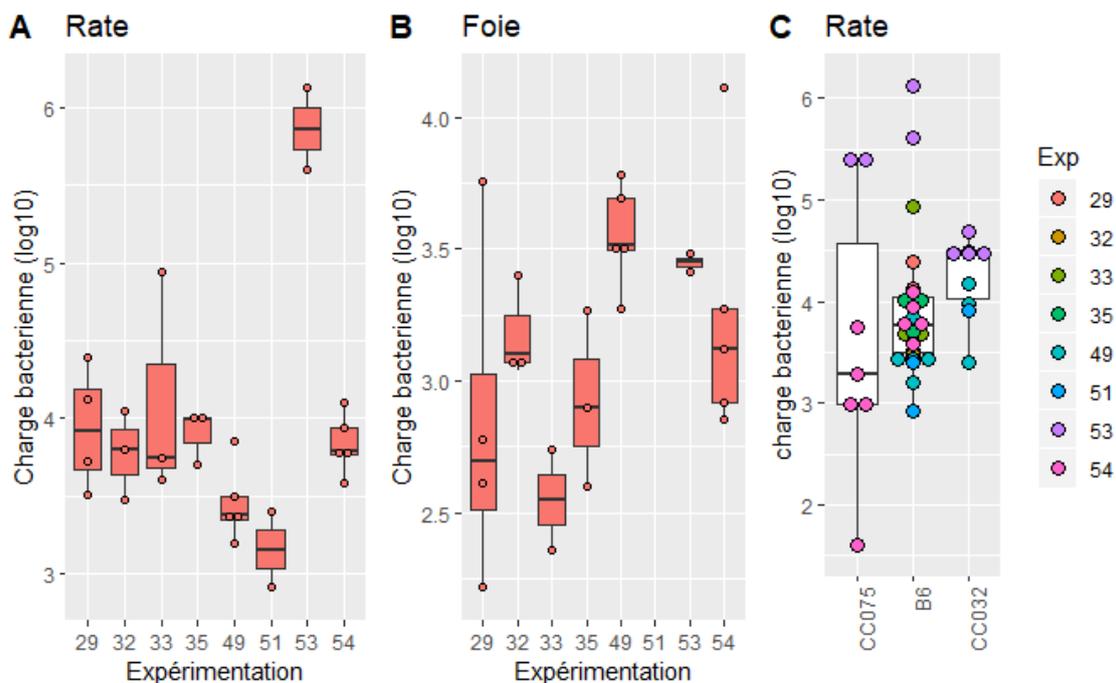


Figure 42 : Normalisation sur les charges des souris contrôle B6.

Charge bactérienne des souris de la lignée contrôle B6 en fonction des 8 expérimentations dans la rate (A) et le foie (B). Charge bactérienne dans la rate pour la lignée CC075, CC032 et pour les souris contrôle B6, en fonction de l'expérimentation (C).

Une fois le choix des expérimentations à conserver réalisé, des normalisations sur les charges bactériennes peuvent être réalisées en utilisant les valeurs moyennes et les écart-types des souris contrôles B6 dans chaque expérimentation. Deux normalisations ont été testées : une première normalisation en se basant sur les moyennes et les écart-types des souris contrôles B6 et une deuxième normalisation qui est en fait une résidualisation en se basant sur les moyennes des B6 contrôles (Tableau 6). Nous avons testé l'effet de ces normalisations sur les profils de LOD score et sur les valeurs de seuils de significativité des pics. Des différences importantes de résultats ont été observées selon la méthode de normalisation employée, en termes de localisation des pics et de significativité. Seule la normalisation avec la première méthode permet d'identifier un QTL significatif sur le chromosome 17. Ce QTL correspond à une région également identifiée sur le même chromosome avec les souris du DO. Ces différents tests montrent bien l'importance de la reproductibilité des expérimentations et du choix des normalisations appliquées sur les données pour la détection de QTLs. D'autres études de QTL mapping sur les lignées du CC ont fait le choix d'utiliser d'autres méthodes de normalisation : une résidualisation [106] voire même aucune normalisation [340].

Normalisation 1	Normalisation 2
$X_i = \frac{x_i - \mu_{B6,j,i}}{sd_{B6,j,i}}$	Modèle: $Y_i = b_0 + b_1 X_i + \varepsilon_i$ $e_i = y_i - \hat{y}_i$
Avec : - X_i : la valeur normalisée de la charge en <i>Salmonella</i> pour la souris i - x_i : la charge en <i>Salmonella</i> pour la souris i - $\mu_{B6,j,i}$: la moyenne des B6 dans l'expérimentation j, à laquelle appartient la souris i - $sd_{B6,j,i}$: l'écart-type des B6 dans l'expérimentation j, à laquelle appartient la souris i	Avec : - Y_i : charge en <i>Salmonella</i> pour la souris i - X_i : la moyenne des B6 dans l'expérimentation à laquelle appartient la souris i - b_0 et b_1 : paramètres du modèle - ε_i : erreurs - e_i : résidus - y_i : la charge en <i>Salmonella</i> pour la souris i - \hat{y}_i : la valeur prédite de y par le modèle
X_i est utilisé comme phénotype normalisé	e_i est utilisé comme phénotype normalisé

Tableau 6 : Présentation des deux types de normalisations testés.

Pour limiter l'effet de l'expérimentation ou bien vérifier l'effet de la normalisation sur les données, il semble intéressant d'analyser des souris d'une même lignée du CC dans plusieurs expérimentations, comme cela a été fait pour les lignées CC075 et CC032 dans notre étude. Un design expérimental statistiquement optimal serait d'analyser chaque lignée du CC testées dans chaque expérimentation, mais ce design théorique est impossible à mettre en œuvre en pratique. Comme expliqué précédemment, il est difficile de choisir par avance les CC qui pourront être analysées dans l'expérimentation du fait du manque d'information sur la disponibilité des souris ayant l'âge et le sexe adéquat.

Une résolution de QTL mapping très fine avec les souris du DO

Comme espéré, l'utilisation des souris du DO a permis d'identifier des QTL avec une très fine résolution, les intervalles de confiance étant réduits à moins de 5 Mb. Un des QTLs identifiés, sur le chromosome 17 (*Ses17*), correspond à celui identifié avec les lignées du CC et contient le complexe d'Histocompatibilité (*H2*) connu pour son implication dans la sensibilité de l'hôte à une infection par *Salmonella* [176]. Sous ce QTL, neuf gènes candidats contenant un ou plusieurs SNPs non-synonymes ont été identifiés. Les deux autres QTLs identifiés, quant à eux, contiennent au total moins de 50 gènes. L'utilisation des informations sur les allèles des fondateurs et les résultats des analyses d'association (SNPs les plus significatifs) a permis de réduire à un gène candidat unique pour chacun des deux QTLs, *Gm13211* et *Lingo2* respectivement. Pour la charge bactérienne dans la rate, les deux QTLs (*Ses15* et *Ses17a*) expliquent ensemble 41% de la variance phénotypique et pour le foie, *Ses16* et *Ses17b* expliquent 38% de la variance. Ces estimations ont été réalisées en utilisant l'équation suivante : $1 - 10^{-\frac{2}{n}LOD}$ [341], où n est le nombre d'individus dans l'analyse et LOD est la valeur de LOD score au pic du QTL. Le DO est donc un très bon outil expérimental permettant l'identification de régions restreintes et des gènes candidats pouvant expliquer une part importante des variations phénotypiques observées.

De nouvelles études seront néanmoins nécessaires pour confirmer les gènes candidats identifiés, par des méthodes d'analyse fonctionnelle *in vivo* ou *in vitro*. En effet, les SNPs significatifs ayant servi à identifier les gènes *Gm13211* et *Lingo2* sont des SNPs présents dans des régions non-codantes des gènes. Il est donc difficile d'interpréter ces résultats. Pour valider ces gènes, il serait intéressant de travailler sur des souris transgéniques KO ou KI pour ces deux gènes dans un fonds génétique connu comme B6 ou 129Sv. Le développement de

nouvelles technologies telles que l'outil CRISPR/Cas9, facilite l'édition des génomes et ces études de validations fonctionnelles.

La distribution des données et la prise en compte des zéros

La distribution des données de DO dans le foie et la rate semble être normale, si on excepte la présence d'individus à zéro, c'est-à-dire ayant potentiellement éliminé complètement la bactérie dans l'organe cible ou ayant un nombre de bactéries sous le seuil de détection (Figure 43). Dans la rate, 7 individus sur les 192 ont totalement éliminé les salmonelles et dans le foie, 82 individus sur les 192 les ont éliminées.

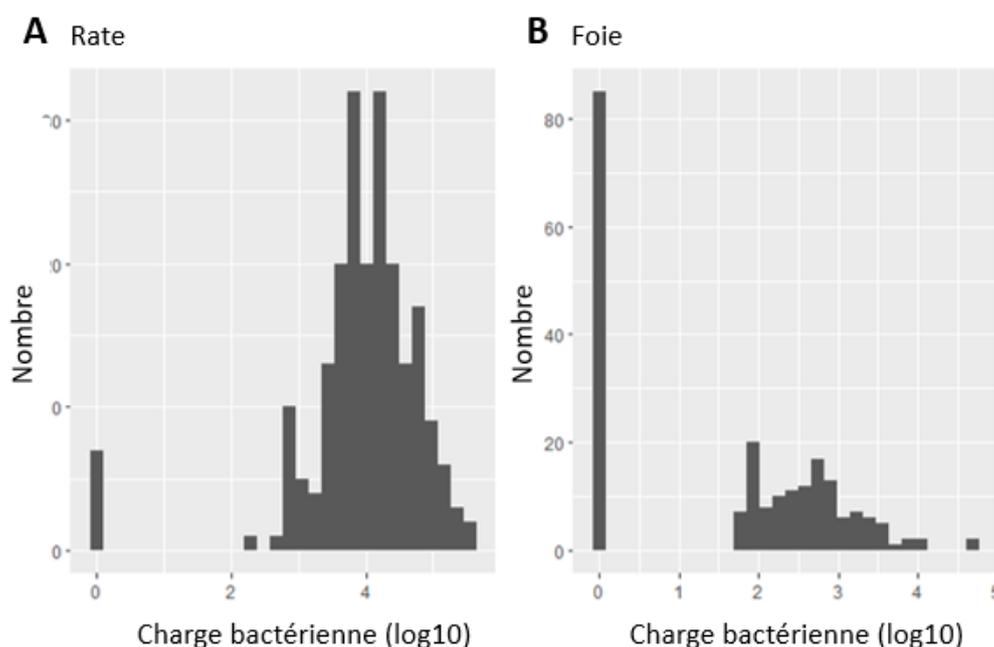


Figure 43 : Distribution des individus en fonction de la charge bactérienne dans la rate (A) et le foie (B).

Il se pose alors la question de la méthode de prise en compte des zéros dans l'analyse de QTL mapping. Nous avons testé deux méthodes : la première consistant à prendre en compte les zéros dans l'analyse et réaliser un test directement sur cette variable continue (scan classique), la deuxième consiste à recoder cette variable continue en variable binaire (0 : absence de bactéries dans l'organe cible, 1 : présence de bactéries dans l'organe cible) et réaliser un scan binaire. La première méthode a été choisie et les résultats sont présentés dans l'article 3 de cette thèse. Les résultats de la deuxième méthode sont présentés dans la Figure 44. Ainsi, la méthode semble avoir un impact important sur les résultats. Dans le foie,

le profil de LOD score avec un scan binaire se rapproche de celui identifié avec le scan sur la variable continue mais les pics sont bien plus faibles. Pour la rate, le profil de LOD score en scan binaire est fortement différent et aucun QTL n'est identifié. Le recodage des phénotypes en variables binaires induit une perte d'information et donc de puissance des analyses.

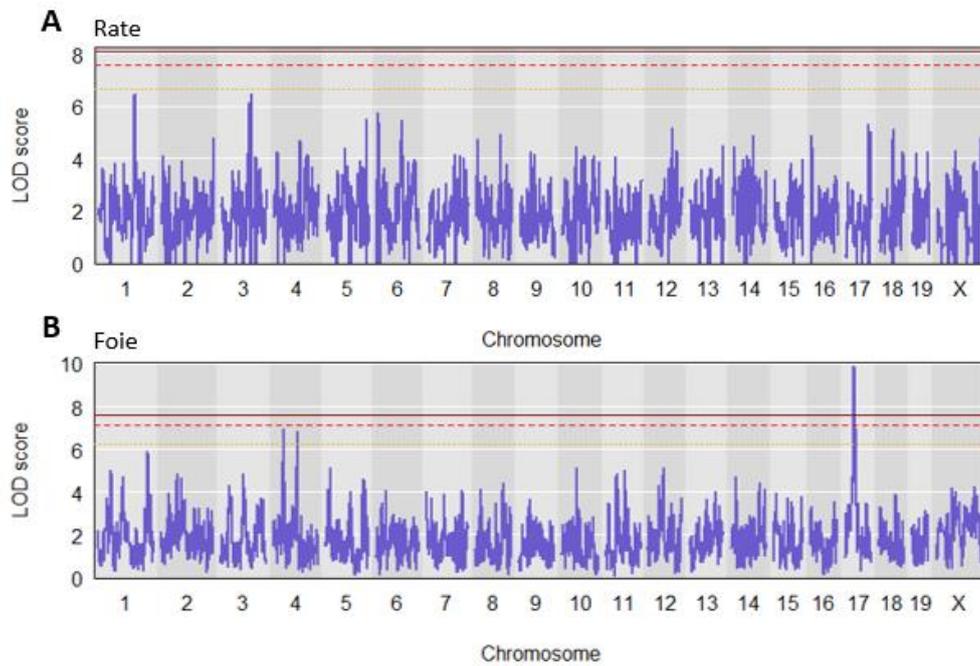


Figure 44 : Génome scan binaire de la charge bactérienne dans la rate (A) et le foie (B).
Seuil de détection des QTLs : $E < 0,63$ (jaune), $E < 0,1$ (rouge pointillé), $E < 0,05$ (rouge foncé).

Les gènes candidats identifiés avec les DO et associations avec le microbiote

Nous avons montré dans notre étude à l'INRAE que le microbiote pouvait être impliqué dans la résistance à SE. Une recherche bibliographique sur trois gènes candidats identifiés grâce au DO montre que ces gènes pourraient avoir un impact sur le microbiote ou sur l'abondance de certaines bactéries commensales de ce microbiote. Tout d'abord, le gène *Lingo2*. Au-delà du fait que LINGO2 interagisse avec les APP (*Amyloid beta A4 Precursor Protein*) qui elles-mêmes interagissent avec des protéines de la famille des Caspase impliquées dans la régulation positive des Lymphocyte T, deux SNPs dans *Lingo2* chez l'Homme ont été associés avec l'abondance du genre bactérien *Blautia* [342]. Ces bactéries sont des productrices de butyrate [338] ayant des effets anti-inflammatoires bénéfiques [339] lors d'une infection par un pathogène. De plus, une étude récente a montré également que LINGO2 et plus précisément son interaction avec les protéines TFF3 de certaines cellules épithéliales de l'intestin serait impliqué dans l'immunité et dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale [343].

Deuxièmement, le gène *Btnl4*. Ce gène pourrait être associé au maintien de l'équilibre intestinal. En effet, les protéines codées par les gènes *Btnl* sont nécessaires pour la sélection et le maintien des lymphocytes T gamma delta impliqués dans le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux intestinaux [344]. Enfin, le gène *Lst1*. Il serait impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire au niveau de l'intestin et dans la modulation de l'abondance des leucocytes [345]. Ces trois gènes pourraient donc être impliqués dans la sensibilité de l'hôte à une infection par SE par le biais de la modulation du microbiote intestinal, confirmant ce que nous avons pu observer dans le modèle « poulet » : la modulation du microbiote fait partie des mécanismes possibles de régulation des salmonelles, en plus des mécanismes immunitaires de l'hôte.

Néanmoins, nous avons identifié ces gènes dans une étude sur les charges bactériennes dans le foie et la rate. Il serait donc intéressant de valider l'effet de ces gènes en réalisant une étude sur les charges de *Salmonella* au niveau de l'intestin ou dans les fèces des animaux. Dans de prochains projets, il serait également très intéressant de mener des études de composition du microbiote dans les lignées du CC. Elles sont en effet un outil privilégié pour l'étude de l'impact de la génétique sur le microbiote associé ou non à un caractère d'intérêt. Il serait possible d'identifier les potentiels QTLs ou SNPs associés à la composition du microbiote comme cela a été pour d'autres caractères : le sommeil [297], la toxicité de molécules cancérigènes [298] ou l'anxiété [299]. Mener le même genre d'étude sur le caractère de résistance à SE serait très intéressant.

II. Perspectives pour la filière avicole

La sélection animale

La sélection génétique d'individus résistants à SE, en sélectionnant directement sur des données de portage de SE pourrait être une solution pour réduire le portage dans les élevages. Cependant, la résistance à SE semble être un caractère multigénique : aucune étude génétique n'a pour l'instant permis d'identifier les gènes causaux pouvant expliquer une large proportion des variabilités phénotypiques observées [312]. Il serait donc nécessaire de sélectionner sur plusieurs gènes, mais lesquels ? De nouvelles études sur des fonds génétiques plus diversifiés pourraient mener à l'identification de nouveaux gènes candidats dont les

effets sur le caractère pourraient être plus importants. Il serait intéressant par exemple de constituer des lignées de poules expérimentales à l'image des CC ou des DO chez la souris. L'utilisation des isolateurs, augmentant les variabilités phénotypiques, pourrait aussi être utilisée dans de nouvelles études : par exemple, une infection en isolateur avec des individus F2 entre les lignées N et G_1 . Les résultats pourraient être différents de ceux qui ont été obtenus en système d'élevage au sol pour lesquels de nombreux QTLs ont été identifiés mais avec des effets faibles à modérés, ne permettant pas l'identification de gènes candidats [123, 152, 154, 155]. Ces études d'association sont néanmoins très coûteuses : nécessitant de gros effectifs dans un milieu contrôlé puisqu'il s'agit de pathogènes zoonotiques. De plus, ces travaux étant menés sur des lignées expérimentales, les résultats devront être validés sur des lignées commerciales pour lesquelles les mécanismes de résistance peuvent différer et pour lesquelles les gènes ou les SNPs identifiés peuvent ne pas être polymorphes.

La sélection génomique ne nécessite pas forcément la connaissance des gènes impliqués dans le caractère, seul les effets de certains SNPs sont utilisés dans les programmes de sélection. Théoriquement, il serait donc possible de sélectionner sur le caractère de résistance de SE. Néanmoins, cette sélection ne devrait pas se faire au détriment d'autres caractères de résistance : autres pathogènes ou autres sérotypes. Par exemple, il a été montré que les QTLs responsables de la résistance à SE ne sont pas les mêmes que ceux contrôlant ST [116]. Ainsi, il semble peu probable de pouvoir sélectionner des individus sur un seul caractère de résistance à un pathogène sans modifier la résistance de l'hôte à d'autres pathogènes. La sélection étant un processus long et coûteux, les sélectionneurs n'ont pour l'instant pas encore mené de tels programmes de sélection.

Un autre moyen de réduction du portage de SE dans les élevages pourrait être une sélection sur la composition du microbiote des individus. En effet, nous avons montré que des bactéries du microbiote intestinal pouvaient jouer un rôle dans la résistance à SE. Sélectionner des individus porteurs de ces bactéries en abondance permettrait de diminuer le portage de SE. Le calcul de valeurs d'héritabilité modérées, en moyenne égale à 0,2, pour certains taxons dans une étude génétique sur des croisement F2 chez la poule, montrant qu'une sélection génétique des animaux sur la composition de leur microbiote est théoriquement possible [290]. Il faudrait donc identifier les bactéries les plus intéressantes à sélectionner et s'assurer que ces bactéries soient héréditaires. La famille des *Christensenellaceae*, une bactérie dont

nous avons montré l'association avec la résistance à SE [346], pourrait être une bonne candidate puisqu'il a déjà été montré qu'elle était héréditaire chez l'Homme [328]. Puis, il serait nécessaire d'identifier les gènes ou les SNPs sur lesquels pratiquer la sélection et vérifier que ces gènes, SNPs, soient polymorphes dans les populations commerciales à sélectionner. Pour cela, il faudrait mener d'importantes études génétiques sur de larges populations (F2, voire avec plus que deux lignées parentales), et tester l'association entre génétique et phénotype, soit par exemple l'abondance en *Christensenellaceae*.

Il est également important de penser la santé intestinale de manière globale chez un individu. En effet, la sélection sur le caractère de résistance à SE ne doit pas être incompatible avec la sélection pour d'autres caractères de production ou de résistance à d'autres maladies. Si nous reprenons l'exemple des *Christensenellaceae*, il ne faudrait pas que l'augmentation de cette famille bactérienne par la sélection favorise la présence d'autres pathogènes tels que *Campylobacter*, par exemple. En effet, notre étude et celle de Chintoan-Uta *et al.* sur les lignées N et 6₁ montrent que ces lignées sont inversement résistantes/sensibles à *Salmonella* Enteritidis et à *Campylobacter* [124]. Il faudra également s'assurer que la sélection sur la résistance à SE n'implique pas le déséquilibre d'autres fonctions intestinales, par exemple, l'efficacité digestive dont on sait qu'elle est associée à la composition du microbiote [290, 291].

Le développement de prébiotiques, de probiotiques ou de postbiotiques

Un autre levier permettant de réduire SE dans les élevages serait la mise au point de prébiotiques favorisant les bactéries du microbiote identifiées comme étant associées à la résistance à SE. Les *Christensenellaceae* pourraient donc faire l'objet d'études pour le développement de tels composés. Il a en effet déjà été montré que des prébiotiques tels que les Galacto-Oligosaccharides (GOS) diminuaient l'infection par ST et favorisaient l'abondance des *Christensenellaceae* [347]. En effet, les *Christensenellaceae* ont la capacité de métaboliser les GOS contrairement à l'hôte ou à *Salmonella*, ce qui pourrait être en défaveur des salmonelles [347, 348]. Il serait donc intéressant de mener le même genre d'étude en infectant au préalable les animaux avec SE.

Plutôt que de favoriser la multiplication des *Christensenellaceae*, il pourrait être intéressant de développer un probiotique composé de ces bactéries. La production de probiotiques doit passer par la mise au point des méthodes de culture de la bactérie (milieu de culture, temps,

condition anaérobie, ...) et il n'est pas assuré que le probiotique puisse coloniser durablement l'intestin des individus inoculés. En effet, une étude a montré que des espèces bactériennes telles que *Enterococci* ou *Bacilli* en culture pure, ne parvenaient pas à coloniser durablement le système digestif de jeunes individus [278]. Pourtant, ces bactéries sont souvent utilisées en tant que probiotiques [226]. La liste des types de bactéries pouvant être transférées entre un adulte et de jeunes poussins montre également que toutes les bactéries ne sont pas capables de coloniser durablement les jeunes [226]. Une étude en 2019 a testé 76 bactéries anaérobies de l'intestin du poulet et a montré que seulement 25 d'entre elles étaient capables de coloniser l'intestin de jeunes poussins [278]. Malheureusement, les *Christensenellaceae* n'ont pas été testées dans cette étude. Des probiotiques de bactéries ne pouvant pas coloniser durablement l'intestin des individus pourraient être utilisés en complément alimentaire quotidiennement afin de maintenir leurs effets bénéfiques. Mais des coûts importants pour la filière pourraient en découler.

Enfin, il pourrait être intéressant de développer des post-biotiques : métabolites naturellement synthétisés par les bactéries intestinales, ayant un effet bénéfique dans la santé intestinale [349, 350] tels que les SCFAs. Ces métabolites pourraient être donnés directement aux animaux et avoir un impact direct sur la multiplication des salmonelles. Le développement de ces post-biotiques nécessitera de mieux comprendre les fonctions réalisées par les bactéries bénéfiques afin de bien cibler les métabolites d'intérêt. La métagénomique et la métatranscriptomique seront deux techniques pertinentes à utiliser dans ces études.

Finalement, le développement de ces prébiotiques et probiotiques, basé sur des études expérimentales dans des conditions environnementales fortement contrôlées, ne garantit pas leur efficacité pour des individus de production élevés en plein air par exemple. En effet, les différences de mode de vie (intérieur/extérieur) et d'alimentation entre ces individus peuvent avoir un effet très important sur la composition du microbiote intestinal [351, 352]. Une différence qui ne permettrait pas d'observer des effets bénéfiques de ces composés sur des animaux élevés en plein air. De même que la sélection d'individus sur la composition de leur microbiote pourrait ne pas être effective sur des animaux élevés en extérieur. Il sera donc nécessaire de confirmer les résultats obtenus dans cette thèse dans différents systèmes de production et sur différentes lignées de poules commerciales.

Pour aller plus loin, il pourrait aussi être intéressant de conjuguer les deux approches : la modulation du microbiote par les prébiotiques ou les probiotiques avec la sélection animale. En effet, il pourrait être intéressant d'optimiser les effets de la sélection génétique par la modulation du microbiote à travers l'alimentation. On pourrait imaginer par exemple sélectionner des individus sur des variants génétiques au niveau du gène *Fut2*, conférant à l'hôte la capacité de favoriser des bactéries bénéfiques contre SE telles que les *Christensenellaceae*. Néanmoins, en l'absence de ces bactéries dans le microbiote des individus, la sélection n'aurait pas d'effet. L'utilisation de probiotique dans l'alimentation pourrait donc apporter ces *Christensenellaceae* et donc activer les effets positifs de la sélection.

Références bibliographiques

1. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo OE, Adenubi OT (2011) Evolution of Salmonella nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol (Praha)* 56:497–503
2. Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC (2017) Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. *BioMed Res Int* 2017:3782182
3. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill F-X (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 165:526–530
4. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000) Salmonella Nomenclature. *J Clin Microbiol* 38:2465–2467
5. Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA (2019) Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Appl Environ Microbiol* 85:e00591-19
6. Kiebler CA, Bottichio L, Simmons L, et al (2020) Outbreak of human infections with uncommon Salmonella serotypes linked to pet bearded dragons, 2012-2014. *Zoonoses Public Health* 67:425–434
7. Cho S, Jackson CR, Frye JG (2020) The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of Salmonella, Escherichia coli and Enterococcus sp. in surface water. *Lett Appl Microbiol* 71:3–25
8. Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG (1998) Evolution of host adaptation in Salmonella enterica. *Infect Immun* 66:4579–4587
9. Kirk MD, Pires SM, Black RE, et al (2015) World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Med* 12:e1001921
10. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET (2014) Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol* 22:648–655
11. EFSA (2021) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J* 2021 19(2):6406
12. EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel), Koutsoumanis K, Allende A, et al (2019) Salmonella control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA J Eur Food Saf Auth* 17:e05596
13. Mughini-Gras L, Enserink R, Friesema I, Heck M, van Duynhoven Y, van Pelt W (2014) Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS One* 9:e87933

14. Poppe C (2000) Salmonella infections in the domestic fowl. In: Wray C, Wray A (eds) *Salmonella Domest. Anim.* CABI, Wallingford, pp 107–132
15. Menanteau P, Kempf F, Trotureau J, Virlogeux-Payant I, Gitton E, Dalifard J, Gabriel I, Rychlik I, Velge P (2018) Role of systemic infection, cross contaminations and super-shedders in Salmonella carrier state in chicken. *Environ Microbiol* 20:3246–3260
16. Berthelot-Hérault F, Mompert F, Zygmunt MS, Dubray G, Duchet-Suchaux M (2003) Antibody responses in the serum and gut of chicken lines differing in cecal carriage of Salmonella enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 96:43–52
17. Velge P, Cloeckert A, Barrow P (2005) Emergence of Salmonella epidemics: the problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* 36:267–288
18. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F (2009) Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 33:718–738
19. Ricke SC (2017) Insights and challenges of Salmonella infection of laying hens. *Curr Opin Food Sci* 18:43–49
20. J.Smith A (1992) *L'élevage de la volaille, Maisonneuve et Larose.*
21. Collineau L, Guillon F, Tribehou G, Bonifait L, Dupuy C, Tapie I, Le Bouquin S, Huneau-Salaün A (2020) Summary report of the French national control programme for Salmonella in Gallus gallus and Meleagris gallopavo flocks in 2015-2018.
22. Buck JD, Immerseel FV, Haesebrouck F, Ducatelle R (2004) Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella. *J Appl Microbiol* 97:233–245
23. Huberman YD, Velilla AV, Terzolo HR (2019) Evaluation of different live Salmonella enteritidis vaccine schedules administered during layer hen rearing to reduce excretion, organ colonization, and egg contamination. *Poult Sci* 98:2422–2431
24. Van Hoorebeke S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Dewulf J (2011) The influence of the housing system on Salmonella infections in laying hens: a review. *Zoonoses Public Health* 58:304–311
25. Holt PS, Davies RH, Dewulf J, Gast RK, Huwe JK, Jones DR, Waltman D, Willian KR (2011) The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poult Sci* 90:251–262
26. Jones DR, Cox NA, Guard J, et al (2015) Microbiological impact of three commercial laying hen housing systems. *Poult Sci* 94:544–551
27. De Vylder J, Dewulf J, Van Hoorebeke S, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2011) Horizontal transmission of Salmonella enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poult Sci* 90:1391–1396

28. Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS (2020) Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet World* 13:2070–2084
29. Roca I, Akova M, Baquero F, et al (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 6:22–29
30. Michael GB, Schwarz S (2016) Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 22:968–974
31. Bernal-Bayard J, Ramos-Morales F (2018) Molecular Mechanisms Used by *Salmonella* to Evade the Immune System. *Curr Issues Mol Biol* 25:133–168
32. Cuperus T, Coorens M, van Dijk A, Haagsman HP (2013) Avian host defense peptides. *Dev Comp Immunol* 41:352–369
33. Wigley P (2013) Immunity to bacterial infection in the chicken. *Dev Comp Immunol* 41:413–417
34. St. Paul M, Brisbin JT, Abdul-Careem MF, Sharif S (2013) Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 152:191–199
35. Keestra AM, de Zoete MR, Bouwman LI, Vaezirad MM, van Putten JPM (2013) Unique features of chicken Toll-like receptors. *Dev Comp Immunol* 41:316–323
36. Liu G, Zhang H, Zhao C, Zhang H (2020) Evolutionary History of the Toll-Like Receptor Gene Family across Vertebrates. *Genome Biol Evol* 12:3615–3634
37. Kogut MH, Chiang H-I, Swaggerty CL, Pevzner IY, Zhou H (2012) Gene Expression Analysis of Toll-Like Receptor Pathways in Heterophils from Genetic Chicken Lines that Differ in Their Susceptibility to *Salmonella enteritidis*. *Front Genet* 3:121
38. Abasht B, Kaiser MG, van der Poel J, Lamont SJ (2009) Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poult Sci* 88:744–749
39. MacKinnon KM, He H, Nerren JR, Swaggerty CL, Genovese KJ, Kogut MH (2009) Expression profile of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella enteritidis*-infected broiler chickens. *Vet Microbiol* 137:313–319
40. Michailidis G, Theodoridis A, Avdi M (2011) Effects of sexual maturation and *Salmonella* infection on the expression of Toll-like receptors in the chicken vagina. *Anim Reprod Sci* 123:234–241
41. Abasht B, Kaiser MG, Lamont SJ (2008) Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 123:314–323

42. Li P, Wang H, Zhao X, et al (2017) Allelic variation in TLR4 is linked to resistance to *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Poult Sci* 96:2040–2048
43. Michailidis G, Theodoridis A, Avdi M (2010) Transcriptional profiling of Toll-like receptors in chicken embryos and in the ovary during sexual maturation and in response to *Salmonella* enteritidis infection. *Anim Reprod Sci* 122:294–302
44. Genovese KJ, He H, Lowry VK, Nisbet DJ, Kogut MH (2007) Dynamics of the avian inflammatory response to *Salmonella* following administration of the Toll-like receptor 5 agonist flagellin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:112–117
45. Keestra AM, de Zoete MR, van Aubel RAMH, van Putten JPM (2008) Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. *Mol Immunol* 45:1298–1307
46. Swaggerty CL, He H, Genovese KJ, Duke SE, Kogut MH (2012) Loxoribine pretreatment reduces *Salmonella* Enteritidis organ invasion in 1-day-old chickens. *Poult Sci* 91:1038–1042
47. He H, Lowry VK, Swaggerty CL, Ferro PJ, Kogut MH (2005) In vitro activation of chicken leukocytes and in vivo protection against *Salmonella* enteritidis organ invasion and peritoneal *S. enteritidis* infection-induced mortality in neonatal chickens by immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43:81–89
48. Nerren JR, Swaggerty CL, MacKinnon KM, Genovese KJ, He H, Pevzner I, Kogut MH (2009) Differential mRNA expression of the avian-specific toll-like receptor 15 between heterophils from *Salmonella*-susceptible and -resistant chickens. *Immunogenetics* 61:71–77
49. Nerren JR, He H, Genovese K, Kogut MH (2010) Expression of the avian-specific toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by Gram-negative and Gram-positive bacteria, but not TLR agonists. *Vet Immunol Immunopathol* 136:151–156
50. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM (2010) Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J Exp Med* 207:1745–1755
51. Walsh JG, Muruve DA, Power C (2014) Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 15:84–97
52. Jorgensen I, Miao EA (2015) Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev* 265:130–142
53. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y (2019) The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* 20:E3328
54. Broz P, Ruby T, Belhocine K, Bouley DM, Kayagaki N, Dixit VM, Monack DM (2012) Caspase-11 increases susceptibility to *Salmonella* infection in the absence of caspase-1. *Nature* 490:288–291

55. Zaki MH, Man SM, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti T-D (2014) Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:385–390
56. Tuladhar S, Kanneganti T-D (2020) NLRP12 in innate immunity and inflammation. *Mol Aspects Med* 76:100887
57. Guo Y, Gu D, Huang T, et al (2020) Essential role of Salmonella Enteritidis DNA adenine methylase in modulating inflammasome activation. *BMC Microbiol* 20:226
58. Tao ZY, Zhu CH, Shi ZH, Song C, Xu WJ, Song WT, Zou JM, Qin AJ (2015) Molecular characterization, expression, and functional analysis of NOD1 in Qingyuan partridge chicken. *Genet Mol Res GMR* 14:2691–2701
59. Li P, Fan W, Li Q, et al (2017) Splenic microRNA Expression Profiles and Integration Analyses Involved in Host Responses to Salmonella enteritidis Infection in Chickens. *Front Cell Infect Microbiol* 7:377
60. Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A (2018) A comprehensive review of non-enterica subspecies of Salmonella enterica. *Microbiol Res* 206:60–73
61. Chang G, Liu X, Ma T, Xu L, Wang H, Li Z, Guo X, Xu Q, Chen G (2015) A mutation in the NLRC5 promoter limits NF- κ B signaling after Salmonella Enteritidis infection in the spleen of young chickens. *Gene* 568:117–123
62. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81:641–650
63. Malek M, Lamont SJ (2003) Association of INOS, TRAIL, TGF-beta2, TGF-beta3, and IgL genes with response to Salmonella enteritidis in poultry. *Genet Sel Evol GSE* 35 Suppl 1:S99-111
64. Tohidi R, Idris IB, Panandam JM, Bejo MH (2012) The effects of polymorphisms in IL-2, IFN- γ , TGF- β 2, IgL, TLR-4, MD-2, and iNOS genes on resistance to Salmonella enteritidis in indigenous chickens. *Avian Pathol J WVPA* 41:605–612
65. He H, Arsenault RJ, Genovese KJ, Johnson C, Kogut MH (2018) Chicken macrophages infected with Salmonella (S.) Enteritidis or S. Heidelberg produce differential responses in immune and metabolic signaling pathways. *Vet Immunol Immunopathol* 195:46–55
66. Gogoi M, Shreenivas MM, Chakravorty D (2019) Hoodwinking the Big-Eater to Prosper: The Salmonella-Macrophage Paradigm. *J Innate Immun* 11:289–299
67. Kogut MH, Tellez GI, McGruder ED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE, DeLoach JR (1994) Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to Salmonella enteritidis infections. *Microb Pathog* 16:141–151

68. Chuammitri P, Ostojić J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D (2009) Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol* 129:126–131
69. Winter SE, Thiennimitr P, Nuccio S-P, et al (2009) Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection. *Infect Immun* 77:1904–1916
70. Liu W, Miller MM, Lamont SJ (2002) Association of MHC class I and class II gene polymorphisms with vaccine or challenge response to *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Immunogenetics* 54:582–590
71. Asheg A, Levkut M, Revajová V, Sevcíková Z, Kolodzieyski L, Pistl J (2002) T lymphocyte subpopulations and B lymphocyte cells in caecum and spleen of chicks infected with *Salmonella enteritidis*. *Acta Histochem* 104:435–439
72. Kramer J, Visscher AH, Wagenaar JA, Jeurissen SHM (2003) Entry and survival of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines. *Vet Microbiol* 91:147–155
73. Sasai K, Aita M, Lillehoj HS, Miyamoto T, Fukata T, Baba E (2000) Dynamics of lymphocyte subpopulation changes in the cecal tonsils of chickens infected with *Salmonella enteritidis*. *Vet Microbiol* 74:345–351
74. Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA (2004) *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 101:251–257
75. Gal-Mor O (2019) Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonellae*. *Clin Microbiol Rev* 32:e00088-18
76. Chaussé A-M, Grépinet O, Bottreau E, Robert V, Hennequet-Antier C, Lalmanach A-C, Lecardonnell J, Beaumont C, Velge P (2014) Susceptibility to *Salmonella* carrier-state: a possible Th2 response in susceptible chicks. *Vet Immunol Immunopathol* 159:16–28
77. Sashinami H, Yamamoto T, Nakane A (2006) The cytokine balance in the maintenance of a persistent infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. *Cytokine* 33:212–218
78. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J (2013) *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 77:582–607
79. Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, Kummer V, Imre A, Szmolka A, Nagy B (2009) Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol* 9:268
80. Karasova D, Sebkova A, Havlickova H, Sisak F, Volf J, Faldyna M, Ondrackova P, Kummer V, Rychlik I (2010) Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell

- depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *BMC Microbiol* 10:75
81. Das S, Sreevidya VS, Udvardia AJ, Gyaneshwar P (2019) Dopamine-induced sulfatase and its regulator are required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *Microbiol Read Engl* 165:302–310
 82. Das S, Ray S, Arunima A, Sahu B, Suar M (2020) A ROD9 island encoded gene in *Salmonella* Enteritidis plays an important role in acid tolerance response and helps in systemic infection in mice. *Virulence* 11:247–259
 83. Pardo-Roa C, Salazar GA, Noguera LP, Salazar-Echegarai FJ, Vallejos OP, Suazo ID, Schultz BM, Coronado-Arrázola I, Kalergis AM, Bueno SM (2019) Pathogenicity island excision during an infection by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is required for crossing the intestinal epithelial barrier in mice to cause systemic infection. *PLoS Pathog* 15:e1008152
 84. Eade CR, Bogomolnaya L, Hung C-C, Betteken MI, Adams LG, Andrews-Polymenis H, Altier C (2018) *Salmonella* Pathogenicity Island One is Expressed in the Chicken Intestine and Promotes Bacterial Proliferation. *Infect Immun* 87:e00503-18
 85. Rossignol A, Roche SM, Virlogeux-Payant I, et al (2014) Deciphering why *Salmonella* Gallinarum is less invasive in vitro than *Salmonella* Enteritidis. *Vet Res* 45:81
 86. Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, et al (2012) Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen* 1:243–258
 87. Wiedemann A, Virlogeux-Payant I, Chaussé A-M, Schikora A, Velge P (2014) Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Front Microbiol* 5:791
 88. Rotger R, Casadesús J (1999) The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* 2:177–184
 89. van Asten AJAM, van Dijk JE (2005) Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:251–259
 90. Karasova D, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2009) Deletion of *sodCI* and *spvBC* in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection. *Vet Microbiol* 139:304–309
 91. Quan G, Xia P, Zhao J, Zhu C, Meng X, Yang Y, Wang Y, Tian Y, Ding X, Zhu G (2019) Fimbriae and related receptors for *Salmonella* Enteritidis. *Microb Pathog* 126:357–362
 92. Clouthier SC, Collinson SK, Kay WW (1994) Unique fimbriae-like structures encoded by *sefD* of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella enteritidis*. *Mol Microbiol* 12:893–901

93. Rajashekara G, Munir S, Alexeyev MF, Halvorson DA, Wells CL, Nagaraja KV (2000) Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection of chickens. *Appl Environ Microbiol* 66:1759–1763
94. Thorns CJ, Turcotte C, Gemmell CG, Woodward MJ (1996) Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella enteritidis*. *Microb Pathog* 20:235–246
95. Zhu C, Meng X, Duan X, Tao Z, Gong J, Hou H, Zhu G (2013) SEF14 fimbriae from *Salmonella enteritidis* play a role in pathogenicity to cell model in vitro and host in vivo. *Microb Pathog* 64:18–22
96. Sundquist M, Rydström A, Wick MJ (2004) Immunity to *Salmonella* from a dendritic point of view. *Cell Microbiol* 6:1–11
97. Caron J, Loredó-Osti JC, Laroche L, Skamene E, Morgan K, Malo D (2002) Identification of genetic loci controlling bacterial clearance in experimental *Salmonella enteritidis* infection: an unexpected role of Nramp1 (Slc11a1) in the persistence of infection in mice. *Genes Immun* 3:196–204
98. Caron J, Loredó-Osti JC, Morgan K, Malo D (2005) Mapping of interactions and mouse congenic strains identified novel epistatic QTLs controlling the persistence of *Salmonella Enteritidis* in mice. *Genes Immun* 6:500–508
99. Caron J, Larivière L, Nacache M, Tam M, Stevenson MM, McKerly C, Gros P, Malo D (2006) Influence of Slc11a1 on the outcome of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in mice is associated with Th polarization. *Infect Immun* 74:2787–2802
100. Roy M-F, Malo D (2002) Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice. *Genes Immun* 3:381–393
101. Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Bäumlér AJ (2001) Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 3:1335–1344
102. Valdez Y, Ferreira RBR, Finlay BB (2009) Molecular Mechanisms of *Salmonella* Virulence and Host Resistance. *Curr Top Microbiol Immunol* 337:93-127
103. Monack DM, Mueller A, Falkow S (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2:747–765
104. Robson HG, Vas SI (1972) Resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis* 126:378–386
105. Plant J, Glynn AA (1976) Genetics of Resistance to Infection with *Salmonella typhimurium* in Mice. *J Infect Dis* 133:72–78
106. Zhang J, Malo D, Mott R, Panthier J-J, Montagutelli X, Jaubert J (2018) Identification of new loci involved in the host susceptibility to *Salmonella Typhimurium* in collaborative cross mice. *BMC Genomics* 19:303

107. Churchill GA, Airey DC, Allayee H, et al (2004) The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet* 36:1133–1137
108. Shorter JR, Odet F, Aylor DL, et al (2017) Male Infertility Is Responsible for Nearly Half of the Extinction Observed in the Mouse Collaborative Cross. *Genetics* 206:557–572
109. Roberts A, Pardo-Manuel de Villena F, Wang W, McMillan L, Threadgill DW (2007) The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 18:473–481
110. Noll KE, Ferris MT, Heise MT (2019) The Collaborative Cross: A Systems Genetics Resource for Studying Host-Pathogen Interactions. *Cell Host Microbe* 25:484–498
111. Saul MC, Philip VM, Reinholdt LG, Center for Systems Neurogenetics of Addiction, Chesler EJ (2019) High-Diversity Mouse Populations for Complex Traits. *Trends Genet TIG* 35:501–514
112. Svenson KL, Gatti DM, Valdar W, Welsh CE, Cheng R, Chesler EJ, Palmer AA, McMillan L, Churchill GA (2012) High-resolution genetic mapping using the Mouse Diversity outbred population. *Genetics* 190:437–447
113. Logan RW, Robledo RF, Recla JM, et al (2013) High-precision genetic mapping of behavioral traits in the diversity outbred mouse population. *Genes Brain Behav* 12:424–437
114. Yuan JT, Gatti DM, Philip VM, et al (2018) Genome-wide association for testis weight in the diversity outbred mouse population. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 29:310–324
115. Duchet-Suchaux M, Léchopier P, Marly J, Bernardet P, Delaunay R, Pardon P (1995) Quantification of experimental *Salmonella enteritidis* carrier state in B13 leghorn chicks. *Avian Dis* 39:796–803
116. Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C (2010) Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol* 42:11
117. Beaumont C, Chapuis H, Protais J, Sellier N, Menanteau P, Fravallo P, Velge P (2009) Resistance to *Salmonella* carrier state: selection may be efficient but response depends on animal's age. *Genet Res* 91:161–169
118. Bordas A, Mérat P (1991) Sélection divergente pour la consommation alimentaire résiduelle de la poule en période de ponte : réponse au taux protéique de l'aliment. *Genet Sel Evol* 23:249–256
119. Cotter PF, Taylor RL, Abplanalp H (1998) B-complex associated immunity to *Salmonella enteritidis* challenge in congenic chickens. *Poult Sci* 77:1846–1851
120. Bacon LD, Hunt HD, Cheng HH (2000) A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases. *Poult Sci* 79:1082–1093

121. Mariani P, Barrow PA, Cheng HH, Groenen MM, Negrini R, Bumstead N (2001) Localization to chicken chromosome 5 of a novel locus determining salmonellosis resistance. *Immunogenetics* 53:786–791
122. Barrow PA, Bumstead N, Marston K, Lovell MA, Wigley P (2004) Faecal shedding and intestinal colonization of *Salmonella enterica* in in-bred chickens: the effect of host-genetic background. *Epidemiol Infect* 132:117–126
123. Tilquin P, Barrow PA, Marly J, Pitel F, Plisson-Petit F, Velge P, Vignal A, Baret PV, Bumstead N, Beaumont C (2005) A genome scan for quantitative trait loci affecting the *Salmonella* carrier-state in the chicken. *Genet Sel Evol GSE* 37:539–561
124. Chintoan-Uta C, Wisedchanwet T, Glendinning L, Bremner A, Psifidi A, Vervelde L, Watson K, Watson M, Stevens MP (2020) Role of caecal microbiota in the differential resistance of inbred chicken lines to colonization by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 86:e02607-19
125. Russell KM, Smith J, Bremner A, Chintoan-Uta C, Vervelde L, Psifidi A, Stevens MP (2021) Transcriptomic analysis of caecal tissue in inbred chicken lines that exhibit heritable differences in resistance to *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics* 22:411
126. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526:68–74
127. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231–238
128. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT (2010) Sickle-cell disease. *Lancet Lond Engl* 376:2018–2031
129. Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM (2013) Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *Am J Hum Genet* 93:779–797
130. Balaesque P (2007) Les microsatellites des génomes eucaryotes - De leur cycle de vie et de leur neutralité. *médecine/sciences* 23:729–734
131. Collaborative Cross Consortium (2012) The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics* 190:389–401
132. Morgan AP, Fu C-P, Kao C-Y, et al (2015) The Mouse Universal Genotyping Array: From Substrains to Subspecies. *G3 Bethesda Md* 6:263–279
133. Morgan AP, Welsh CE (2015) Informatics resources for the Collaborative Cross and related mouse populations. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 26:521–539
134. Broman KW, Gatti DM, Simecek P, Furlotte NA, Prins P, Sen Ś, Yandell BS, Churchill GA (2019) R/qtI2: Software for Mapping Quantitative Trait Loci with High-Dimensional Data and Multiparent Populations. *Genetics* 211:495–502

135. Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R (2005) Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 6:271–286
136. van Ooijen JW (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *TAG Theor Appl Genet Theor Angew Genet* 84:803–811
137. Darvasi A, Soller M (1997) A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet* 27:125–132
138. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, et al (2007) A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 448:1050–1053
139. Srivastava A, Morgan AP, Najarian ML, et al (2017) Genomes of the Mouse Collaborative Cross. *Genetics* 206:537–556
140. Valdar W, Flint J, Mott R (2006) Simulating the collaborative cross: power of quantitative trait loci detection and mapping resolution in large sets of recombinant inbred strains of mice. *Genetics* 172:1783–1797
141. Mao J-H, Langley SA, Huang Y, Hang M, Bouchard KE, Celniker SE, Brown JB, Jansson JK, Karpen GH, Snijders AM (2015) Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross mice. *Sci Rep* 5:16247
142. Abu Toamih Atamni H, Nashef A, Iraqi FA (2018) The Collaborative Cross mouse model for dissecting genetic susceptibility to infectious diseases. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 29:471–487
143. Keele GR, Crouse WL, Kelada SNP, Valdar W (2019) Determinants of QTL Mapping Power in the Realized Collaborative Cross. *G3 Bethesda Md* 9:1707–1727
144. Huda MN, VerHague M, Albright J, et al (2020) Dissecting the Genetic Architecture of Cystatin C in Diversity Outbred Mice. *G3 GenesGenomesGenetics* 10:2529–2541
145. Shastry BS (2009) SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 578:3–22
146. Albert FW, Kruglyak L (2015) The role of regulatory variation in complex traits and disease. *Nat Rev Genet* 16:197–212
147. Tyler AL, Ji B, Gatti DM, Munger SC, Churchill GA, Svenson KL, Carter GW (2017) Epistatic Networks Jointly Influence Phenotypes Related to Metabolic Disease and Gene Expression in Diversity Outbred Mice. *Genetics* 206:621–639
148. Kogut MH, Swaggerty CL, Byrd JA, Selvaraj R, Arsenault RJ (2016) Chicken-Specific Kinome Array Reveals that *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Modulates Host Immune Signaling Pathways in the Cecum to Establish a Persistence Infection. *Int J Mol Sci* 17:1207

149. Matulova M, Varmuzova K, Sisak F, Havlickova H, Babak V, Stejskal K, Zdrahal Z, Rychlik I (2013) Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet Res* 44:37
150. Luan DQ, Chang GB, Sheng ZW, Zhang Y, Zhou W, Li ZZ, Liu Y, Chen GH (2012) Analysis of Gene Expression Responses to a *Salmonella* Infection in Rugao Chicken Intestine Using GeneChips. *Asian-Australas J Anim Sci* 25:278–285
151. Chevenon M, Naccache M, Eva MM, Khan RT, Malo D (2013) Functional validation of the genetic architecture of *Salmonella* Enteritidis persistence in 129S6 mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 24:218–227
152. Calenge F, Lecerf F, Demars J, Feve K, Vignoles F, Pitel F, Vignal A, Velge P, Sellier N, Beaumont C (2009) QTL for resistance to *Salmonella* carrier state confirmed in both experimental and commercial chicken lines. *Anim Genet* 40:590–597
153. Fife MS, Howell JS, Salmon N, Hocking PM, van Diemen PM, Jones MA, Stevens MP, Kaiser P (2011) Genome-wide SNP analysis identifies major QTL for *Salmonella* colonization in the chicken. *Anim Genet* 42:134–140
154. Calenge F, Vignal A, Demars J, Fève K, Menanteau P, Velge P, Beaumont C (2011) New QTL for resistance to *Salmonella* carrier-state identified on fowl microchromosomes. *Mol Genet Genomics* 285:237–243
155. Thanh-Son T, Catherine B, Nigel S, Mark F, Pete K, Elisabeth LB-D, Alain V, Philippe V, Fanny C (2012) A maximum likelihood QTL analysis reveals common genome regions controlling resistance to *Salmonella* colonization and carrier-state. *BMC Genomics* 13:198
156. Plant J, Glynn AA (1979) Locating salmonella resistance gene on mouse chromosome 1. *Clin Exp Immunol* 37:1–6
157. Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K, Gros P (1994) Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23:51–61
158. Hu J, Bumstead N, Burke D, Ponce de León FA, Skamene E, Gros P, Malo D (1995) Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 6:809–815
159. Girard-Santosuosso O, Bumstead N, Lantier I, Protais J, Colin P, Guillot JF, Beaumont C, Malo D, Lantier F (1997) Partial conservation of the mammalian NRAMP1 syntenic group on chicken chromosome 7. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 8:614–616
160. Beaumont C, Protais J, Pitel F, et al (2003) Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. *Poult Sci* 82:721–726

161. Liu W, Kaiser MG, Lamont SJ (2003) Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Poult Sci* 82:259–266
162. Kramer J, Malek M, Lamont SJ (2003) Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with *Salmonella enteritidis* in poultry. *Anim Genet* 34:339–348
163. Tohidi R, Idris IB, Malar Panandam J, Hair Bejo M (2013) The effects of polymorphisms in 7 candidate genes on resistance to *Salmonella Enteritidis* in native chickens. *Poult Sci* 92:900–909
164. Forbes JR, Gros P (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host–pathogen interactions. *Trends Microbiol* 9:397–403
165. Cunrath O, Bumann D (2019) Host resistance factor SLC11A1 restricts *Salmonella* growth through magnesium deprivation. *Science* 366:995–999
166. Blanc-Potard A-B, Groisman EA (2021) How Pathogens Feel and Overcome Magnesium Limitation When in Host Tissues. *Trends Microbiol* 29:98–106
167. Hu Y, Shan YJ, Zhu CH, Song WT, Xu WJ, Zhu WQ, Zhang SJ, Li HF (2015) Upregulation of NRAMP1 mRNA confirms its role in enhanced host immunity in post-artificial infections of *Salmonella enteritidis* in chicks. *Br Poult Sci* 56:408–415
168. O’Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB (1980) Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol Baltim Md* 1950 124:20–24
169. Poltorak A, Smirnova I, He X, et al (1998) Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24:340–355
170. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085–2088
171. Li HF, Hu Y, Hu H, Song C, Shu JT, Zhu CH, Zhang SJ, Fan JH, Chen WW (2013) Genetic differ in TLR4 gene polymorphisms and expression involved in *Salmonella* natural and artificial infection respectively in Chinese native chicken breeds. *Mol Biol Rep* 40:5005–5012
172. Chaussé A-M, Grépinet O, Bottreau E, et al (2011) Expression of Toll-like receptor 4 and downstream effectors in selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to *Salmonella* carrier state. *Infect Immun* 79:3445–3454
173. Gou Z, Liu R, Zhao G, Zheng M, Li P, Wang H, Zhu Y, Chen J, Wen J (2012) Epigenetic modification of TLRs in leukocytes is associated with increased susceptibility to *Salmonella enteritidis* in chickens. *PloS One* 7:e33627

174. Lamont SJ, Kaiser MG, Liu W (2002) Candidate genes for resistance to *Salmonella enteritidis* colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. *Vet Immunol Immunopathol* 87:423–428
175. Zhou H, Lamont SJ (2003) Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. *Immunogenetics* 55:133–140
176. Hormaeche CE, Harrington KA, Joysey HS (1985) Natural resistance to salmonellae in mice: control by genes within the major histocompatibility complex. *J Infect Dis* 152:1050–1056
177. Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredó-Osti JC, Morgan K, Malo D (2003) Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infect Immun* 71:1116–1124
178. Lehmann J, Bellmann S, Werner C, Schröder R, Schütze N, Alber G (2001) IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. *J Immunol Baltim Md* 167:5304–5315
179. Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8:103
180. Coleman M, Elkins C, Gutting B, Mongodin E, Solano-Aguilar G, Walls I (2018) Microbiota and Dose Response: Evolving Paradigm of Health Triangle. *Risk Anal* 38:2013–2028
181. Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, et al (2016) Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* 1:e00028-16
182. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915–1920
183. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14:e1002533
184. Li J, Jia H, Cai X, et al (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32:834–841
185. Calenge F, Leloutre L, Quéré P, Velge P, Gabriel I, Dore J (2017) Le microbiote intestinal à l'ère de la métagénomique : Perspectives d'application dans la filière avicole. *Journées de la Recherche Avicole et des Palmipèdes à Foie Gras*. hal-01608192
186. Yadav S, Jha R (2019) Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *J Anim Sci Biotechnol* 10:2
187. Kohl KD (2012) Diversity and function of the avian gut microbiota. *J Comp Physiol B* 182:591–602
188. Józefiak D, Rutkowski A, Martin SA (2004) Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Anim Feed Sci Technol* 113:1–15

189. Martin-Gallausiaux C, Marinelli L, Blottière HM, Larraufie P, Lapaque N (2021) SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc Nutr Soc* 80:37–49
190. Gérard P, Bernalier-Donadille A (2007) Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cah Nutr Diététique* 42:28–36
191. Kogut MH, Lee A, Santin E (2020) Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult Sci* 99:1906–1913
192. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ, Cox NA (2014) The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* 360:100–112
193. Zheng D, Liwinski T, Elinav E (2020) Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30:492–506
194. Rogers AWL, Tsolis RM, Bäumlér AJ (2021) Salmonella versus the Microbiome. *Microbiol Mol Biol Rev* 85(1):e00027-19
195. Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2011) Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infect Immun* 79:2755–2763
196. Osadchiy V, Martin CR, Mayer EA (2019) The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Mechanisms and Clinical Implications. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 17:322–332
197. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7:E14
198. Kraimi N, Dawkins M, Gebhardt-Henrich SG, Velge P, Rychlik I, Volf J, Creach P, Smith A, Colles F, Leterrier C (2019) Influence of the microbiota-gut-brain axis on behavior and welfare in farm animals: A review. *Physiol Behav* 210:112658
199. Kim YS, Unno T, Kim BY, Park MS (2020) Sex Differences in Gut Microbiota. *World J Mens Health* 38:48–60
200. Kers JG, Velkers FC, Fischer EAJ, Hermes GDA, Stegeman JA, Smidt H (2018) Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Front Microbiol* 9:235
201. Choi JH, Kim GB, Cha CJ (2014) Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poult Sci* 93:1942–1950
202. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK (2016) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 14:20–32
203. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174–180

204. Ramayo-Caldas Y, Mach N, Lepage P, et al (2016) Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J* 10:2973–2977
205. Xu E, Yang H, Ren M, Wang Y, Xiao M, Tang Q, Zhu M, Xiao Y (2021) Identification of Enterotype and Its Effects on Intestinal Butyrate Production in Pigs. *Anim Open Access J MDPI* 11:730
206. Yuan Z, Yan W, Wen C, Zheng J, Yang N, Sun C (2020) Enterotype identification and its influence on regulating the duodenum metabolism in chickens. *Poult Sci* 99:1515–1527
207. Defois C (2017) Etude de l'impact de contaminants chimiques alimentaires sur le microbiote intestinal humain. phdthesis, Université Clermont Auvergne
208. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, et al (2016) Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol* 39:1–12
209. Le Roy CI, Woodward MJ, Ellis RJ, La Ragione RM, Claus SP (2019) Antibiotic treatment triggers gut dysbiosis and modulates metabolism in a chicken model of gastro-intestinal infection. *BMC Vet Res* 15:37
210. Reed S, Neuman H, Moscovich S, Glahn RP, Koren O, Tako E (2015) Chronic Zinc Deficiency Alters Chick Gut Microbiota Composition and Function. *Nutrients* 7:9768–9784
211. Estellé J (2019) Benefits from the joint analysis of host genomes and metagenomes: Select the holobiont. *J Anim Breed Genet Z Tierzucht Zuchtungsbiologie* 136:75–76
212. Borda-Molina D, Seifert J, Camarinha-Silva A (2018) Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. *Comput Struct Biotechnol J* 16:131–139
213. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12:635–645
214. Choi KY, Lee TK, Sul WJ (2015) Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens — A Review. *Asian-Australas J Anim Sci* 28:1217–1225
215. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541
216. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852–857
217. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294

218. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069–5072
219. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188–7196
220. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31:814–821
221. Qin N, Yang F, Li A, et al (2014) Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513:59–64
222. Xiao L, Feng Q, Liang S, et al (2015) A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotechnol* 33:1103–1108
223. Xiao L, Estellé J, Kiilerich P, et al (2016) A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat Microbiol* 1:16161
224. Huang P, Zhang Y, Xiao K, et al (2018) The chicken gut metagenome and the modulatory effects of plant-derived benzylisoquinoline alkaloids. *Microbiome* 6(1):211
225. Calenge F (2019) Improving gut health by modulating the digestive microbiota of chickens? How metagenomics can help. *feedchannel*. <https://youtu.be/UCCGKHg6Y0o>
226. Rychlik I (2020) Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. *Anim* 10:103
227. Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Denman SE, Moore RJ (2013) Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PloS One* 8:e84290
228. Videnska P, Faldynova M, Juricova H, Babak V, Sisak F, Havlickova H, Rychlik I (2013) Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. *BMC Vet Res* 9:30
229. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F (2006) Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 72:946–949
230. Roto SM, Kwon YM, Ricke SC (2016) Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. *Front Vet Sci* 3:63
231. Kubasova T, Kollarcikova M, Crhanova M, et al (2019) Contact with adult hen affects development of caecal microbiota in newly hatched chicks. *PloS One* 14:e0212446
232. Oakley BB, Buhr RJ, Ritz CW, Kiepper BH, Berrang ME, Seal BS, Cox NA (2014) Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. *BMC Vet Res* 10:282

233. Cui L, Zhang X, Cheng R, Ansari AR, Elokil AA, Hu Y, Chen Y, Nafady AA, Liu H (2021) Sex differences in growth performance are related to cecal microbiota in chicken. *Microb Pathog* 150:104710
234. Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LMTE, Rebel JMJ, Smits MA (2015) Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines. *BMC Genomics*. 16:418
235. Richards P, Fothergill J, Bernardeau M, Wigley P (2019) Development of the Caecal Microbiota in Three Broiler Breeds. *Front Vet Sci*. 6:201
236. Pandit RJ, Hinsu AT, Patel NV, et al (2018) Microbial diversity and community composition of caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA amplicon sequencing. *Microbiome* 6:115
237. Hou L, Sun B, Yang Y (2020) Effects of Added Dietary Fiber and Rearing System on the Gut Microbial Diversity and Gut Health of Chickens. *Anim* 10(1):107
238. Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F, Chiariotti L, Nizza A, Lembo F, Fioretti A (2017) Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Sci Rep* 7:16269
239. van der Hoeven-Hangoor E, van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Verstegen MWA, de Oliveira JE, Montijn RC, Hendriks WH (2013) Ileal microbiota composition of broilers fed various commercial diet compositions. *Poult Sci* 92:2713–2723
240. Nordentoft S, Mølbak L, Bjerrum L, De Vylder J, Van Immerseel F, Pedersen K (2011) The influence of the cage system and colonisation of *Salmonella* Enteritidis on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. *BMC Microbiol* 11:187
241. Shi S, Qi Z, Gu B, Cheng B, Tu J, Song X, Shao Y, Liu H, Qi K, Li S (2019) Analysis of high-throughput sequencing for cecal microbiota diversity and function in hens under different rearing systems. *3 Biotech* 9:438
242. Yan L, Lv ZZ, An S, Xing K, Wang ZG, Lv MB, Choct M, Guo YM, Zhou GL (2021) Effects of rearing system and narasin on growth performance, gastrointestinal development, and gut microbiota of broilers. *Poult Sci* 100:100840
243. Wang XJ, Feng JH, Zhang MH, Li XM, Ma DD, Chang SS (2018) Effects of high ambient temperature on the community structure and composition of ileal microbiome of broilers. *Poult Sci* 97:2153–2158
244. Shi D, Bai L, Qu Q, Zhou S, Yang M, Guo S, Li Q, Liu C (2019) Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poult Sci* 98:2405–2413
245. Videnska P, Sisak F, Havlickova H, Faldynova M, Rychlik I (2013) Influence of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis infection on the composition of chicken cecal microbiota. *BMC Vet Res* 9:140

246. Juricova H, Videnska P, Lukac M, Faldynova M, Babak V, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2013) Influence of *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. *Appl Environ Microbiol* 79:745–747
247. Zeng J, Lei C, Wang Y, Chen Y, Zhang X, Kang Z, Zhai X, Ye X, Wang H (2018) Distribution of *Salmonella* Enteritidis in internal organs and variation of cecum microbiota in chicken after oral challenge. *Microb Pathog* 122:174–179
248. Liu L, Lin L, Zheng L, Tang H, Fan X, Xue N, Li M, Liu M, Li X (2018) Cecal microbiome profile altered by *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis inoculation in chicken. *Gut Pathog* 10:34
249. Mon KKZ, Saelao P, Halstead MM, Chanthavixay G, Chang H-C, Garas L, Maga EA, Zhou H (2015) *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis Infection Alters the Indigenous Microbiota Diversity in Young Layer Chicks. *Front Vet Sci* 2:61
250. Varmuzova K, Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Sisak F, Havlickova H, Sebkova A, Faldynova M, Rychlik I (2016) Composition of Gut Microbiota Influences Resistance of Newly Hatched Chickens to *Salmonella* Enteritidis Infection. *Front Microbiol* 7:957
251. Kempf F, Menanteau P, Rychlik I, et al (2020) Gut microbiota composition before infection determines the *Salmonella* super- and low-shedder phenotypes in chicken. *Microb Biotechnol* 13:1611–1630
252. Nurmi E, Rantala M (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241:210–211
253. Mead GC, Barrow PA (1990) *Salmonella* control in poultry by ‘competitive exclusion’ or immunization. *Lett Appl Microbiol* 10:221–227
254. Que JU, Hentges DJ (1985) Effect of streptomycin administration on colonization resistance to *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 48:169–174
255. Crowell A, Amir E, Tegatz P, Barman M, Salzman NH (2009) Prolonged Impact of Antibiotics on Intestinal Microbial Ecology and Susceptibility to Enteric *Salmonella* Infection. *Infect Immun* 77:2741–2753
256. Zhang G, Ma L, Doyle MP (2007) Potential competitive exclusion bacteria from poultry inhibitory to *Campylobacter jejuni* and *Salmonella*. *J Food Prot* 70:867–873
257. La Razione RM, Woodward MJ (2003) Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet Microbiol* 94:245–256
258. Litvak Y, Mon KKZ, Nguyen H, et al (2019) Commensal Enterobacteriaceae Protect against *Salmonella* Colonization through Oxygen Competition. *Cell Host Microbe* 25:128–139.e5
259. van der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP, van Knapen F (2000) Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. *Appl Environ Microbiol* 66:2536–2540

260. Rivera-Chávez F, Zhang LF, Faber F, et al (2016) Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host Microbe* 19:443–454
261. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Velge P, Bottreau E, Fievez V, Haesebrouck F, Ducatelle R (2003) Invasion of Salmonella enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *Int J Food Microbiol* 85:237–248
262. Hughes R-A, Ali RA, Mendoza MA, Hassan HM, Koci MD (2017) Impact of Dietary Galacto-Oligosaccharide (GOS) on Chicken's Gut Microbiota, Mucosal Gene Expression, and Salmonella Colonization. *Front Vet Sci* 4:192
263. Kogut MH, Genovese KJ, He H, Swaggerty CL, Jiang Y (2013) Modulation of chicken intestinal immune gene expression by small cationic peptides as feed additives during the first week posthatch. *Clin Vaccine Immunol* 20:1440–1448
264. Adhikari P, Cosby DE, Cox NA, Kim WK (2017) Effect of dietary supplementation of nitrocompounds on Salmonella colonization and ileal immune gene expression in laying hens challenged with Salmonella Enteritidis. *Poult Sci* 96:4280–4286
265. Pourabedin M, Chen Q, Yang M, Zhao X (2017) Mannan- and xylooligosaccharides modulate caecal microbiota and expression of inflammatory-related cytokines and reduce caecal Salmonella Enteritidis colonisation in young chickens. *FEMS Microbiol Ecol* 93:fiw226
266. Wagner RD (2006) Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products. *Mol Nutr Food Res* 50:1061–1071
267. Mead GC (2000) Prospects for “competitive exclusion” treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Vet J Lond Engl* 1997 159:111–123
268. Borie C, Sánchez ML, Navarro C, Ramírez S, Morales MA, Retamales J, Robeson J (2009) Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces Salmonella enteritidis infection in chickens. *Avian Dis* 53:250–254
269. Nakamura A, Ota Y, Mizukami A, Ito T, Ngwai YB, Adachi Y (2002) Evaluation of aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response of chicks to Salmonella. *Poult Sci* 81:1653–1660
270. Ferreira AJP, Ferreira CSA, Knobl T, Moreno AM, Bacarro MR, Chen M, Robach M, Mead GC (2003) Comparison of three commercial competitive-exclusion products for controlling Salmonella colonization of broilers in Brazil. *J Food Prot* 66:490–492
271. Palmu L, Camelin I (1997) The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of Salmonella contamination on the farm and at the processing plant. *Poult Sci* 76:1501–1505
272. Methner U, Barrow PA, Martin G, Meyer H (1997) Comparative study of the protective effect against Salmonella colonisation in newly hatched SPF chickens using live,

- attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *Int J Food Microbiol* 35:223–230
273. Zhao X, Yang J, Wang L, Lin H, Sun S (2017) Protection Mechanism of *Clostridium butyricum* against *Salmonella* Enteritidis Infection in Broilers. *Front Microbiol* 8:1523
274. Lan D, Xun X, Hu Y, Li N, Yang C, Jiang X, Liu Y (2020) Research on the Effect of *Pediococcus pentosaceus* on *Salmonella* enteritidis-Infected Chicken. *BioMed Res Int* 2020:6416451
275. Baltzley T, Lago F, Neumann T, Rehberger T, Gebert S (2010) Microorganisms and methods for treating poultry. United States Patent Appl. Publ. within the TVPP US20100829013
276. Yang X, Brisbin J, Yu H, Wang Q, Yin F, Zhang Y, Sabour P, Sharif S, Gong J (2014) Selected lactic acid-producing bacterial isolates with the capacity to reduce *Salmonella* translocation and virulence gene expression in chickens. *PLoS One* 9:e93022
277. Adhikari P, Lee CH, Cosby DE, Cox NA, Kim WK (2019) Effect of probiotics on fecal excretion, colonization in internal organs and immune gene expression in the ileum of laying hens challenged with *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci* 98:1235–1242
278. Kubasova T, Kollarcikova M, Crhanova M, et al (2019) Gut Anaerobes Capable of Chicken Caecum Colonisation. *Microorganisms* 7:597
279. Knap I, Kehlet AB, Bennedsen M, Mathis GF, Hofacre CL, Lumpkins BS, Jensen MM, Raun M, Lay A (2011) *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poult Sci* 90:1690–1694
280. Fernandez F, Hinton M, Van Gils B (2002) Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathol J WVPA* 31:49–58
281. Laptev GY, Yildirim EA, Ilina LA, et al (2021) Effects of Essential Oils-Based Supplement and *Salmonella* Infection on Gene Expression, Blood Parameters, Cecal Microbiome, and Egg Production in Laying Hens. *Anim* 11(2):360
282. Teng P-Y, Kim WK (2018) Review: Roles of Prebiotics in Intestinal Ecosystem of Broilers. *Front Vet Sci* 5:245
283. Luoma A, Markazi A, Shanmugasundaram R, Murugesan GR, Mohnl M, Selvaraj R (2017) Effect of synbiotic supplementation on layer production and cecal *Salmonella* load during a *Salmonella* challenge. *Poult Sci* 96:4208–4216
284. Markazi A, Luoma A, Shanmugasundaram R, Mohnl M, Raj Murugesan G, Selvaraj R (2018) Effects of drinking water synbiotic supplementation in laying hens challenged with *Salmonella*. *Poult Sci* 97:3510–3518
285. Khan S, Moore RJ, Stanley D, Chousalkar KK (2020) The Gut Microbiota of Laying Hens and Its Manipulation with Prebiotics and Probiotics To Enhance Gut Health and Food Safety. *Appl Environ Microbiol* 86:e00600-20

286. Meng H, Zhang Y, Zhao L, Zhao W, He C, Honaker CF, Zhai Z, Sun Z, Siegel PB (2014) Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota. *PLoS One* 9:e89862
287. Zhao L, Wang G, Siegel P, et al (2013) Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. *Sci Rep* 3:1163
288. Lumpkins BS, Batal AB, Lee MD (2010) Evaluation of the bacterial community and intestinal development of different genetic lines of chickens. *Poult Sci* 89:1614–1621
289. Ji J, Luo CL, Zou X, Lv XH, Xu YB, Shu DM, Qu H (2019) Association of host genetics with intestinal microbial relevant to body weight in a chicken F2 resource population. *Poult Sci* 98:4084–4093
290. Mignon-Grasteau S, Narcy A, Rideau N, Chantry-Darmon C, Boscher M-Y, Sellier N, Chabault M, Konsak-Ilievski B, Bihan-Duval EL, Gabriel I (2015) Impact of Selection for Digestive Efficiency on Microbiota Composition in the Chicken. *PLOS ONE* 10:e0135488
291. Díaz-Sánchez S, Perrotta AR, Rockafellow I, Alm EJ, Okimoto R, Hawken R, Hanning I (2019) Using fecal microbiota as biomarkers for predictions of performance in the selective breeding process of pedigree broiler breeders. *PLoS One* 14:e0216080
292. Birkl P, Bharwani A, Kjaer JB, Kunze W, McBride P, Forsythe P, Harlander-Matauschek A (2018) Differences in cecal microbiome of selected high and low feather-pecking laying hens. *Poult Sci* 97:3009–3014
293. Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, Clark AG, Ley RE (2016) Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. *Science* 352:532–535
294. Davenport ER (2016) Elucidating the role of the host genome in shaping microbiome composition. *Gut Microbes* 7:178–184
295. Dąbrowska K, Witkiewicz W (2016) Correlations of Host Genetics and Gut Microbiome Composition. *Front Microbiol* 7:1357
296. Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al (2010) Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18933–18938
297. Bubier JA, Philip VM, Quince C, et al (2020) A Microbe Associated with Sleep Revealed by a Novel Systems Genetic Analysis of the Microbiome in Collaborative Cross Mice. *Genetics* 214:719–733
298. Zhong C, He L, Lee S-Y, et al (2021) Host genetics and gut microbiota cooperatively contribute to azoxymethane-induced acute toxicity in Collaborative Cross mice. *Arch Toxicol* 95:949–958
299. Jin X, Zhang Y, Celniker SE, Xia Y, Mao J-H, Snijders AM, Chang H (2021) Gut microbiome partially mediates and coordinates the effects of genetics on anxiety-like behavior in Collaborative Cross mice. *Sci Rep* 11:270

300. Copper GL, Venables LM, Nicholas RAJ, Cullen GA, Hormaeche CE (1992) Vaccination of chickens with chicken-derived *Salmonella enteritidis* phage type 4 aroA live oral salmonella vaccines. *Vaccine* 10:247–254
301. Stanley D, Geier MS, Chen H, Hughes RJ, Moore RJ (2015) Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiol* 15:51
302. Yan W, Zheng J, Wen C, Ji C, Zhang D, Chen Y, Sun C, Yang N (2018) Efficacy of fecal sampling as a gut proxy in the study of chicken gut microbiota. *bioRxiv* 313577
303. Trudeau S, Thibodeau A, Côté J-C, Gaucher M-L, Fravallo P (2020) Contribution of the Broiler Breeders' Fecal Microbiota to the Establishment of the Eggshell Microbiota. *Front Microbiol* 11:666
304. Clavijo V, Flórez MJV (2018) The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poult Sci* 97:1006–1021
305. Oakley BB, Kogut MH (2016) Spatial and Temporal Changes in the Broiler Chicken Cecal and Fecal Microbiomes and Correlations of Bacterial Taxa with Cytokine Gene Expression. *Front Vet Sci* 3:11
306. Rubio LA (2019) Possibilities of early life programming in broiler chickens via intestinal microbiota modulation. *Poult Sci* 98:695–706
307. Ranjitkar S, Lawley B, Tannock G, Engberg RM (2016) Bacterial Succession in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Appl Environ Microbiol* 82:2399–2410
308. Siegerstetter S-C, Petri RM, Magowan E, Lawlor PG, Zebeli Q, O'Connell NE, Metzler-Zebeli BU (2018) Fecal Microbiota Transplant from Highly Feed-Efficient Donors Shows Little Effect on Age-Related Changes in Feed-Efficiency-Associated Fecal Microbiota from Chickens. *Appl Environ Microbiol* 84:e02330-17
309. Jazi V, Foroozandeh AD, Toghyani M, Dastar B, Koochaksaraie RR (2018) Effects of *Pediococcus acidilactici*, mannan-oligosaccharide, butyric acid and their combination on growth performance and intestinal health in young broiler chickens challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Poult Sci* 97:2034–2043
310. Arreguin-Nava MA, Hernández-Patlán D, Solis-Cruz B, Latorre JD, Hernandez-Velasco X, Tellez G, El-Ashram S, Hargis BM, Tellez-Isaias G (2019) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Probiotic Culture Candidates for the Treatment of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* in Neonatal Turkey Poults. *Anim Open Access J MDPI* 9:696
311. Wigley P (2014) *Salmonella enterica* in the Chicken: How it has Helped Our Understanding of Immunology in a Non-Biomedical Model Species. *Front Immunol* 5:482
312. Calenge F, Beaumont C (2012) Toward integrative genomics study of genetic resistance to *Salmonella* and *Campylobacter* intestinal colonization in fowl. *Front Genet* 3:261

313. Kaiser MG, Lamont SJ (2001) Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure. *Poult Sci* 80:1105–1108
314. Schou TW, Labouriau R, Permin A, Christensen JP, Sørensen P, Cu HP, Nguyen VK, Juul-Madsen HR (2010) MHC haplotype and susceptibility to experimental infections (*Salmonella* Enteritidis, *Pasteurella multocida* or *Ascaridia galli*) in a commercial and an indigenous chicken breed. *Vet Immunol Immunopathol* 135:52–63
315. Gast RK, Regmi P, Guraya R, Jones DR, Anderson KE, Karcher DM (2019) Colonization of internal organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens of four commercial genetic lines in conventional cages and enriched colony housing. *Poult Sci* 98:1785–1790
316. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA (2019) Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 10:277
317. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, et al (2019) The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 50:432-445.e7
318. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 361:k2179
319. Zhou D, Pan Q, Xin F-Z, Zhang R-N, He C-X, Chen G-Y, Liu C, Chen Y-W, Fan J-G (2017) Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World J Gastroenterol* 23:60–75
320. Hiller CC, Lucca V, Carvalho D, Borsoi A, Borges KA, Furian TQ, do Nascimento VP (2019) Influence of catecholamines on biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis. *Microb Pathog* 130:54–58
321. Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F (2009) Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet Microbiol* 135:187–195
322. Dichtl S, Demetz E, Haschka D, et al (2019) Dopamine Is a Siderophore-Like Iron Chelator That Promotes *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence in Mice. *mBio* 10:e02624-18
323. Schonewille E, Nesse LL, Hauck R, Windhorst D, Hafez HM, Vestby LK (2012) Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:360–365
324. Swaggerty CL, He H, Genovese KJ, Pevzner IY, Kogut MH (2011) Protein tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase signalling pathways contribute to differences in heterophil-mediated innate immune responsiveness between two lines of broilers. *Avian Pathol J WVPA* 40:289–297

325. Waters JL, Ley RE (2019) The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol* 17:83
326. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al (2016) Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol* 26:1480–1485
327. Stenman LK, Burcelin R, Lahtinen S (2016) Establishing a causal link between gut microbes, body weight gain and glucose metabolism in humans - towards treatment with probiotics. *Benef Microbes* 7:11–22
328. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159:789–799
329. Galeev A, Suwandi A, Cepic A, Basu M, Baines JF, Grassl GA (2021) The role of the blood group-related glycosyltransferases FUT2 and B4GALNT2 in susceptibility to infectious disease. *Int J Med Microbiol IJMM* 311:151487
330. Goto Y, Obata T, Kunisawa J, et al (2014) Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 345:1254009
331. Suwandi A, Galeev A, Riedel R, et al (2019) Std fimbriae-fucose interaction increases Salmonella-induced intestinal inflammation and prolongs colonization. *PLoS Pathog* 15:e1007915
332. Wacklin P, Tuimala J, Nikkilä J, et al (2014) Faecal microbiota composition in adults is associated with the FUT2 gene determining the secretor status. *PLoS One* 9:e94863
333. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ (2017) Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet* 18:690–699
334. Daum LT, Barnes WJ, McAvin JC, et al (2002) Real-time PCR detection of salmonella in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr county, Texas. *J Clin Microbiol* 40:3050–3052
335. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP (2014) Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 15:121–132
336. Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee HS, Perkins DL (2016) Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 469:967–977
337. Lewis S, Nash A, Li Q, Ahn T-H (2021) Comparison of 16S and whole genome dog microbiomes using machine learning. *BioData Min* 14:41
338. Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I (2016) Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 82:1569–1576

339. Xi Y, Shuling N, Kunyuan T, Qiuyang Z, Hewen D, ChenCheng G, Tianhe Y, Liancheng L, Xin F (2019) Characteristics of the intestinal flora of specific pathogen free chickens with age. *Microb Pathog* 132:325–334
340. Manet C, Simon-Lorière E, Jouvion G, Hardy D, Prot M, Conquet L, Flamand M, Panthier J-J, Sakuntabhai A, Montagutelli X (2020) Genetic Diversity of Collaborative Cross Mice Controls Viral Replication, Clinical Severity, and Brain Pathology Induced by Zika Virus Infection, Independently of Oas1b. *J Virol* 94:e01034-19
341. Broman KW, Sen S (2009) *A Guide to QTL Mapping with R/qlt (Statistics for Biology and Health)*. Springer
342. Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, et al (2016) The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet* 48:1407–1412
343. Belle NM, Ji Y, Herbine K, et al (2019) TFF3 interacts with LINGO2 to regulate EGFR activation for protection against colitis and gastrointestinal helminths. *Nat Commun* 10:4408
344. Jandke A, Melandri D, Monin L, et al (2020) Butyrophilin-like proteins display combinatorial diversity in selecting and maintaining signature intraepithelial $\gamma\delta$ T cell compartments. *Nat Commun* 11:3769
345. Fabisik M, Tureckova J, Pavliuchenko N, et al (2021) Regulation of Inflammatory Response by Transmembrane Adaptor Protein LST1. *Front Immunol* 12:618332
346. Cazals A, Estellé J, Bruneau N, et al (2021) Impact of Host Genetics on Caecal Microbiota Composition and on Salmonella Carriage in Chicken. PREPRINT (Version 1) available at Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-76645/v1>
347. Azcarate-Peril MA, Butz N, Cadenas MB, Koci M, Ballou A, Mendoza M, Ali R, Hassan H (2018) An Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain and Galacto-Oligosaccharides Accelerate Clearance of *Salmonella* Infections in Poultry through Modifications to the Gut Microbiome. *Appl Environ Microbiol* 84(5):e02526-17
348. Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y (2012) Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:144–149
349. Abd El-Ghany WA (2020) Paraprobiotics and postbiotics: Contemporary and promising natural antibiotics alternatives and their applications in the poultry field. *Open Vet J* 10:323–330
350. Saettone V, Biasato I, Radice E, Schiavone A, Bergero D, Meineri G (2020) State-of-the-Art of the Nutritional Alternatives to the Use of Antibiotics in Humans and Monogastric Animals. *Anim* 10:2199

351. Schreuder J, Velkers FC, Bouwstra RJ, Beerens N, Stegeman JA, de Boer WF, van Hooft P, Elbers ARW, Bossers A, Jurburg SD (2020) An observational field study of the cloacal microbiota in adult laying hens with and without access to an outdoor range. *Anim Microbiome* 2:28
352. Oejo M, Oporto B, Hurtado A (2019) 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. *Sci Rep* 9:2506

Titre : Etude de l'impact de la génétique de l'hôte et de la composition du microbiote intestinal sur le portage de *Salmonella* Enteritidis chez la souris et la poule

Mots clés : *Gallus gallus*, *Mus musculus*, Microbiote intestinal, Génétique quantitative, Immunité, *Salmonella*

Résumé : *Salmonella enterica* Enteritidis (SE) est l'une des principales causes d'intoxication alimentaire humaine, par le biais de la consommation de produits aviaires (viande ou œufs) contaminés. Cette bactérie est portée de manière asymptomatique par la poule, mais peut infecter et rendre malade les consommateurs de ces produits. La sélection génétique et la modulation du microbiote intestinal sont deux moyens prometteurs de diminuer son portage chez la poule et sa propagation en élevage. Les objectifs de cette thèse sont d'identifier les principaux facteurs génétiques et microbiens contrôlant le portage individuel des salmonelles dans deux modèles expérimentaux. Le modèle "poulet" a été utilisé pour l'étude de l'impact du fonds génétique sur la résistance et le microbiote caecal de jeunes individus après une infection par SE. Des analyses de la composition du microbiote et de l'expression des gènes dans les tonsilles caecales ont été menées et ont permis d'identifier des bactéries intestinales (ex. *Christensenellaceae*), des gènes différenciellement exprimés (ex. *Fut2*) et des voies de signalisation

potentielles (ex. voie des acides gras à chaîne courte) associés avec la réponse à l'infection. Un impact significatif de la lignée sur la composition du microbiote a également été identifié. Le modèle "souris" a été utilisé pour l'identification de régions génomiques de l'hôte contrôlant le portage chronique de SE. Deux populations génétiques de référence, les lignées du Collaborative Cross (CC) et les souris du Diversity Outbred (DO), ont permis d'identifier de nouveaux QTIs (*Ses11* à *Ses17*) et des gènes candidats tels que *Lingo2* ou *Btnl4* associés à la réponse à l'infection par SE. Chez les CC, nous avons également montré une large diversité des charges bactériennes dans le foie et la rate permettant d'identifier des lignées présentant des phénotypes extrêmes à SE, sensibles (ex. CC009/Unc) ou résistantes (ex. CC024/GeniUnc), et pouvant servir de nouveaux modèles expérimentaux. Ce projet a donc permis d'identifier de nouveaux mécanismes associés à la réponse à une infection par SE, grâce à l'exploitation de deux modèles expérimentaux complémentaires.

Title : Study of the impact of host genetics and gut microbiota composition on *Salmonella* Enteritidis carriage in mice and chickens

Keywords : *Gallus gallus*, *Mus musculus*, Intestinal microbiota, Quantitative genetics, Immunity, *Salmonella*

Abstract : *Salmonella enterica* Enteritidis (SE) is one of the major human food poisoning causes through the consumption of contaminated poultry products (meat and eggs). This bacterium is carried asymptotically by chickens, but is able to infect humans and cause diseases. Genetic selection and intestinal microbiota modulation are two promising ways to reduce its carriage in chickens and its spread in poultry farms. The objectives of this thesis are to identify the main genetic and microbial factors controlling individual *Salmonella* carriage in two experimental models. The "chicken" model was used to study the impact of the genetic background on the resistance and the microbiota composition of young individuals post SE infection. Analyses of caecal microbiota composition and gene expression in caecal tonsils were conducted and led to the identification of intestinal bacteria (e.g. *Christensenellaceae*), differentially expressed genes

(e.g. *Fut2*) and signalling pathways (e.g. short-chain fatty acid pathway) associated with the response to the infection. A significant impact of the line on microbiota composition was also identified. The "mouse" model was used to identify host genomic regions controlling chronic SE carriage. Two genetic reference populations, the Collaborative Cross (CC) strains and the Diversity Outbred (DO) mice, allowed the identification of new QTIs (*Ses11* to *Ses17*) and candidate genes such as *Lingo2* or *Btnl4* associated with the response to SE infection. In CC strains, we showed a high diversity of bacterial loads in liver and spleen, allowing the identification of strains with extreme phenotypes to SE, either susceptible (e.g. CC009/Unc) or resistant (e.g. CC024/GeniUnc), that could be used as new experimental models. This project has therefore allowed the identification of new mechanisms associated with the response to SE infection thanks to the use of two complementary experimental models.