

EVALUATION DES REPONSES IMMUNITAIRES SUITE A LA VACCINATION CONTRE *CAMPYLOBACTER* CHEZ DEUX SOUCHES AVIAIRES DIFFERENTES

Gloanec Noémie¹, Guyard Muriel², Quesne Ségolène², Véronique Béven¹, Typhaine Poezevara², Alassane Keita³, Marianne Chemaly², Daniel Dory¹

¹Anses-Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique Virale Biosécurité - ZI des croix - 22440 PLOUFRAGAN,

²Anses-Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Procins - ZI des croix - 22440 PLOUFRAGAN,

³Anses-Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Service élevage et expérimentation avicole - ZI des croix - 22440 PLOUFRAGAN
daniel.dory@anses.fr

RÉSUMÉ

La campylobactériose est la zoonose la plus fréquemment signalée en Europe et la volaille est le principal réservoir de *Campylobacter*. Aujourd'hui, aucun traitement permettant de réduire efficacement *Campylobacter* chez le poulet n'est disponible, et la vaccination est une stratégie à explorer. Dans une étude précédente, il a été démontré qu'un vaccin à base de flagelline contre *Campylobacter* entraînait des taux de protection différents chez deux souches de poulet provenant soit d'un élevage conventionnel (poulets de chair Ross), soit d'un élevage exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS-poulets de ponte Leghorn) sans que les mécanismes immunitaires menant à la protection n'aient été recherchés. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les réponses immunitaires mises en jeu suite à cette vaccination chez ces deux souches de poulets. Pour chaque souche, un lot de poussins a été vacciné aux âges de 5 jours (vaccin à ADN) et 12 jours (vaccin protéique) et un second lot a été inoculé par le placebo correspondant. L'ensemble de ces animaux a ensuite été infecté par *C. jejuni* à l'âge de 19 jours. Aux âges de 19, 22, 28, 35 (5 poulets/lot) et 40 (15 poulets/lot) jours, la charge caecale de *Campylobacter*, les taux d'anticorps sériques et mucosaux ainsi que l'expression des gènes de cytokines et peptides antimicrobiens ont été évalués. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de tests de Mann-Whitney pour comparer les lots vaccinés et placebos. Une réduction significative de la charge caecale en *Campylobacter* ($1,3 \log_{10}$, $P < 0.05$) a été observée chez les poulets EOPS vaccinés comparés aux placebos, mais pas chez les poulets de chair conventionnels. En complément à l'étude précédente, le taux d'anticorps intestinal reflété par les IgA biliaires, n'a augmenté de manière significative que chez les poulets EOPS vaccinés comparé aux placebos tout au long de l'infection par *Campylobacter*. Les taux d'anticorps sériques ont, quant à eux, augmenté de manière significative dans les deux lots de poulets vaccinés comparés aux placebos. L'ensemble des analyses d'expression des gènes de cytokines et peptides antimicrobiens n'a pas été entièrement réalisé à ce jour. Cependant, les premiers résultats suggèrent que les voies cellulaires ne semblent pas être stimulées par la vaccination mais par la colonisation de *Campylobacter*, notamment chez les poulets conventionnels. Ces résultats doivent néanmoins être consolidés et complétés par l'analyse des autres voies immunitaires. Ces nouvelles données pourraient permettre d'améliorer les futurs protocoles de vaccination anti-*Campylobacter* chez les poulets de chair.

ABSTRACT

Evaluation of immune responses to vaccination against *Campylobacter* in two different poultry breeds

Campylobacteriosis is the most frequently reported zoonosis in Europe and poultry is the main reservoir of *Campylobacter*. Today, no treatment is available to efficiently reduce *Campylobacter* in chickens, and vaccination is a strategy to be explored. In a previous study, it was shown that a flagellin-based vaccine against *Campylobacter* resulted in different rates of protection in two strains of chicken from either conventional (Ross broilers) or specific pathogen free (SPF-Leghorn laying chickens) breeding without investigating the immune mechanisms leading to protection. The objective of this work is to better understand the immune responses to this vaccination in these two strains of chickens. For each strain, a group of chicks was vaccinated at 5 days (DNA vaccine) and 12 days (protein vaccine) and a second group was inoculated with the corresponding placebo. All these animals were then infected with *C. jejuni* at 19 days of age. At 19, 22, 28, 35 (5 chickens/group) and 40 (15 chickens/group) days of age, the caecal *Campylobacter* load, serum and mucosal antibody levels and the expression of cytokine and antimicrobial peptide genes were assessed. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests to compare vaccine and placebo groups. A significant reduction in caecal *Campylobacter* load ($1.3 \log_{10}$, $P < 0.05$) was observed in vaccinated SPF chickens compared to placebos, but not in conventional broilers. In addition to the previous study, intestinal antibody levels, as reflected by bile IgA, were only significantly increased in vaccinated SPF chickens compared to placebos throughout the course of *Campylobacter* infection. Serum antibody levels were significantly increased in both groups of vaccinated chickens compared to placebos. The full range of cytokine and antimicrobial peptide gene expression analyses has not yet been completed. However, the first results suggest that the cellular pathways do not seem to be stimulated by vaccination but by *Campylobacter* colonisation, specifically in conventional chickens. However, these results need to be consolidated and completed by the analysis of other immune pathways. These new data could help to improve future anti-*Campylobacter* vaccination protocols in broilers.

INTRODUCTION

La campylobactériose est la zoonose la plus fréquemment signalée dans l'Union européenne avec 220 682 cas humains en 2019. Parmi les épidémies de *Campylobacter*, bactérie à Gram négatif, *Campylobacter jejuni* est l'espèce la plus fréquemment signalée. La majorité des infections est attribuée à la consommation et à la manipulation de produits à base de viande de volaille contaminés par *C. jejuni* (EFSA and ECDC, 2021). La campylobactériose étant un problème majeur pour la santé publique et l'économie, il est nécessaire de mettre en place de nouvelles mesures de surveillance et de contrôle dès la production primaire afin de réduire le risque pour le consommateur. Par exemple, une réduction de 2 log₁₀ et 3 log₁₀ CFU/g des concentrations de *Campylobacter* dans le cæcum des poulets de chair réduirait de 42 % et de 58 % le risque relatif de campylobactériose humaine dans l'Union européenne (EFSA, 2020). Par ailleurs, des études ont montré en réponse à la colonisation par *Campylobacter* (1) un rôle de l'immunité maternelle; (2) des réponses du système immunitaire inné avec l'implication de récepteurs de type Toll-like et des peptides antimicrobiens β -défensines; (3) des réponses immunitaires adaptatives avec la production d'anticorps ou encore de cytokines/chimiokines; enfin, (4) des modifications du microbiote intestinal (Sahin *et al.*, 2003; Shoaf-Sweeney *et al.*, 2008; de Zoete *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017; Lacharme-Lora *et al.*, 2017; Connerton *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2018). La vaccination des volailles est un moyen de lutte envisagé pour réduire le portage de *Campylobacter* chez le poulet (Nothaft *et al.*, 2016; Meunier *et al.*, 2017; Meunier *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2020; Vohra *et al.*, 2020). Cependant, aucun vaccin efficace n'est disponible à ce jour sur le marché malgré le nombre important de travaux effectués. Dans une étude précédente de notre équipe (Meunier *et al.*, 2018), une stratégie vaccinale permettant facilement de screener différents antigènes vaccinaux contre *Campylobacter* (primo vaccination à ADN et rappel protéique) a été mise au point dans un premier temps avec la flagelline, connue à ce moment-là comme étant immunogénique (Cawthraw *et al.*, 1994) et identifiée comme étant un antigène vaccinal putatif par vaccinologie inverse (Meunier *et al.*, 2016). Au cours de cette étude il a été démontré que ce vaccin entraînait des taux de protection différents chez deux souches de poulet provenant soit d'un élevage conventionnel, soit d'un élevage exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Il s'agissait d'une étude d'évaluation du pouvoir protecteur de ce vaccin n'incluant pas une analyse approfondie du mécanisme immunitaire aboutissant à ces différences de protection. L'objectif du présent travail est de mieux comprendre les réponses immunitaires mises en jeu suite à cette vaccination afin d'identifier des pistes d'amélioration de la vaccination anti-*Campylobacter* chez les poulets de chair. En plus de la protection vis-à-vis de la colonisation et du suivi de la production d'anticorps spécifiques sériques IgY, un suivi de la production des anticorps mucosaux évalués dans la bile (IgA) ainsi que l'expression des gènes de cytokines et peptides antimicrobiens dans le caecum ont été étudiés en cinétique sur 40 jours.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Culture bactérienne

La souche *C. jejuni* C97Anses640, isolée d'un produit de volaille et appartenant au complexe ST-45, a été utilisée pour le challenge oral *in vivo*. Les souches ont été cultivées dans des conditions microaérophiles (85 % N₂, 10 % CO₂ et 5 % O₂) à 41,5°C sur un milieu de gélose différentielle au charbon de *Campylobacter* (mCCDA) (Thermo Fisher Diagnostics, Dardilly, France) pendant 48 h ou dans un bouillon Brucella (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) pendant 24 h.

1.2. Préparation du vaccin aviaire

La production des vaccins à ADN et protéique de la flagelline a été réalisée selon les travaux précédents (Meunier *et al.*, 2018).

1.3. Animaux et design expérimental

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées conformément aux directives nationales françaises sur le soin et l'utilisation des animaux à des fins de recherche, approuvées par le ComEth Anses/ENVA/UPEC et autorisées par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (référéncé sous le numéro APAFIS#24442-2020022816285714 v2). Cette étude a été réalisée sur 70 poulets de ponte Leghorn EOPS et 70 poulets de chair Ross 308 conventionnels. Au jour de l'éclosion (jour 1), les animaux ont été répartis dans 2 groupes pour chaque souche de poulets (soit 35 animaux/groupe); un groupe vacciné et un groupe placebo (adjuvant seul). Ils ont été élevés sur litière à base de copeaux de bois et ont été nourris jusqu'à l'âge de 21 jours avec un aliment de démarrage puis jusqu'à l'âge de 40 jours avec un aliment de croissance/finition. Les poulets ont reçu une première injection par la voie intramusculaire au jour 5 (à un moment où le taux en anticorps anti-*Campylobacter* d'origine maternel est diminué chez les poulets de chair conventionnels) soit avec le vaccin à ADN anti-flagelline (150 µg de pcDNA3-flagelline et 25 µg de CpG ODN2007 non méthylé (TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT, avec un squelette phosphorothioate) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) utilisé comme adjuvant) ou le placebo correspondant. Afin de donner du temps au système immunitaire de développer sa réponse contre *Campylobacter* (Meunier *et al.*, 2018), un rappel a été réalisé au jour 12 soit avec le vaccin protéique anti-flagelline (100 µg de protéine de flagelline recombinante émulsifiée dans du MONTANIDE™ ISA71 (30/70, p/p) (Seppic, La Garenne-Colombes, France)) ou le placebo correspondant. Les poulets ont été challengés par voie orale au jour 19 par 10⁵ CFU de la souche C97Anses640 de *C. jejuni*. Les prélèvements de sang, de bile et de caeca ont été réalisés aux jours 19, 22, 28, 35 et 40.

1.4. Dénombrement de *Campylobacter*

Des échantillons de caeca ont été homogénéisés et dilués en série au 1:10^{ème} jusqu'à la dilution 10⁻⁶ dans un bouillon tryptone-sel (Biomérieux, Craponne, France). Les dilutions ont été placées sur mCCDA en utilisant un ensementeur automatique, l'easySpiral (Interscience,

Saint-Nom-la-Bretèche, France). Après 48 heures d'incubation dans des conditions microaérophiles (85% N₂, 10% CO₂ et 5% O₂) à 41,5°C, les colonies caractéristiques de *Campylobacter* ont été dénombrées.

1.5. Analyses de la production d'anticorps

Le niveau d'anticorps contre la protéine flagelline dans le sérum et la bile a été mesurée par méthode ELISA en adaptant la méthode de (Meunier *et al.*, 2018) selon les modifications suivantes. Les plaques contenant 2 µg/mL de protéine flagelline par puits ont été successivement incubées avec des dilutions de 1:4800 de sérums ou de 1:100 de bile testés, puis avec des anticorps de chèvre anti-IgY de poulet-HRP (peroxydase de raifort) dilués au 1:35000 (Abcam, Paris, France) ou de chèvre anti-IgA de poulet-HRP dilués au 1:5000. Pour chaque échantillon, les mesures ont été réalisées en duplicat et chaque plaque a été validée par un contrôle interne.

1.6. Analyses de l'expression des gènes

Extraction d'ARNs

L'ARNm total des échantillons de caeca conservés dans le RNAlater a été extrait en utilisant le kit Agencourt® RNAdvance™ Tissue (Beckman coulter, Brea, CA, USA) selon les recommandations du fabricant puis traité avec le kit Turbo DNA-free™ (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) et quantifié par fluorimétrie à l'aide du kit Qubit RNA high sensitivity (HS) Assay au fluorimètre Qubit 2.0 (Life Technologies, Saint-Aubin, France).

Rétrotranscription des ARNs

Les ADNc ont été obtenus à partir de 320 ng d'ARN total en utilisant le kit High capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) selon les recommandations du fabricant.

qPCR

L'expression relative des gènes de cytokines/chimiokines et peptides antimicrobiens suivants déjà testés en présence de *Campylobacter* (Reid *et al.*, 2016; Connerton *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2018) et reflétant l'activation de différentes voies immunitaires innées et spécifiques ont été déterminés par qPCR en utilisant le système PCR en temps réel 7500 (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) ; Interferon (IFN)- γ , Interleukine (IL)-1 β (Nang *et al.*, 2011), IL-4 (Cox *et al.*, 2010), chimiokine motif C-X-C ligand 1 (CXCL1), CXCL2 (Rasoli *et al.*, 2015), IL-17A (Reid *et al.*, 2016), bêta-défensine aviaire (AvBD)10 et AvBD12 (Su *et al.*, 2017) et IL-10 où les amorces ont été conçues sur Primer Express® (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) (F : CGCTGTCACCGCTTCTTCA, R : CGAACGTCTCCTTGATCTGCTT). La réaction qPCR a été réalisée à partir de 4 ng d'ADNc en duplicat en utilisant le Master mix SYBRGreen (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) suivant 35 cycles d'amplification (95 °C/15 s, 60 °C/1 min). La quantité relative d'expression des gènes cibles a été déterminée par la méthode 2^{- $\Delta\Delta C_t$} (Livak and Schmittgen, 2001) avec comme gène de référence la bêta-actine (Heidari *et al.*, 2016). L'efficacité de la PCR était comprise entre 90 et 105 %. Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant

des duplicats des données 2^{- ΔC_t} pour chaque gène dans les groupes vaccinés et placebos (Connerton *et al.*, 2018).

1.7. Analyses statistiques

Pour chaque souche de poulet, les groupes vaccinés et placebos ont été comparés. Les données respectant les conditions de validités associées aux tests paramétriques ont été analysées par le test-t de student ; sinon par le test non paramétrique de Wilcoxon avec le logiciel R.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Concernant la colonisation caecale par *Campylobacter*, chez les poulets EOPS, une réduction de la charge caecale en *Campylobacter* a été observée dans le groupe vacciné comparé au groupe placebo aux jours 28 et 40, en atteignant une réduction moyenne de 1,3 log₁₀ (7,2 log₁₀ contre 8,5 log₁₀) malgré une forte variabilité interindividuelle dans le groupe vacciné (tableau 1). Cependant, lors de l'essai précédent, alors qu'une souche différente de *Campylobacter* isolée à partir d'un prélèvement humain (*C. jejuni* 81-176) avait été utilisée, une absence de colonisation en *Campylobacter* chez les poulets Leghorn EOPS avait été observée au jour 42 (Meunier *et al.*, 2018). Cette différence de résultat entre les deux études pourrait être due à la souche bactérienne utilisée. En effet, la souche humaine pourrait avoir un pouvoir colonisateur moindre chez le poulet de chair comparé à la souche de volaille utilisée dans cette étude. Par ailleurs, l'action de la réponse immunitaire contre la flagelline aurait pu être suffisante pour empêcher totalement la colonisation de la souche de *C. jejuni* 81-176. En revanche, tout comme au cours de l'essai précédent, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes des poulets conventionnels vaccinés et placebos : chaque groupe était colonisé à environ 8 log₁₀ du jour 22 au jour 40 (tableau 2).

Concernant la production d'anticorps chez les poulets EOPS, le taux d'anticorps dans le sérum (IgY) et dans la bile (IgA) était plus important dans le groupe vacciné comparé au groupe placebo du jour 19 au jour 40 avec une augmentation dans le temps et une forte variabilité interindividuelle dans le groupe vacciné. La réponse mucosale traduite par la production d'IgA dans la bile (régulièrement utilisée pour caractériser ce type de réponse chez le poulet – par exemple Mortada *et al.*, (2021)) pourrait être impliquée dans la diminution de la charge caecale en *Campylobacter* (tableau 1). Chez les poulets conventionnels, dans le sérum, la production d'anticorps était plus importante dans le groupe vacciné que dans le groupe placebo du jour 22 au jour 40 alors que dans la bile, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux groupes (tableau 2). Cette absence d'augmentation de la réponse mucosale chez les poulets conventionnels pourrait être due à l'interférence des anticorps maternels qui a déjà été démontrée (Meunier *et al.*, 2018). En effet, les anticorps maternels spécifiques seraient susceptibles de reconnaître puis de neutraliser l'action du vaccin à base de flagelline (Shoaf-Sweeney *et al.*, 2008).

L'étude de l'expression de 9 marqueurs de l'immunité (cytokines, chimiokines ou peptides antimicrobiens) a été réalisée pour mieux comprendre le type de réponse mise

en place suite à la vaccination (tableaux 1 et 2). Concernant l'expression des gènes étudiés chez les poulets EOPS, seule l'IL-10 caractéristique de la voie Treg anti-inflammatoire était sur-exprimée au jour 28 alors que l'AvBD10, impliquée dans la réponse immunitaire innée, était sous-exprimée chez les poulets vaccinés au jour 40 (tableau 1). L'IL-10 permettrait de réguler une inflammation locale alors que la sous expression de l'AvBD10 pourrait être associée à une tolérance commensale chez le poulet (Hermans *et al.*, 2012). Concernant les poulets conventionnels, seule une sur-expression de l'AvBD12 au jour 19 avant challenge par *Campylobacter* chez les vaccinés reflétant une réponse immunitaire innée a été observée (tableau 2). Au contraire, d'autres antigènes de *C. jejuni* (lipooligosaccharides, protéines de la membrane externe et ADN génomique) avaient démontré une induction de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et régulatrices (Taha-Abdelaziz *et al.*, 2020). Chez les placebos, une sur-expression de cibles pro-inflammatoires telles que l'IL-17A, la CXCLi2, l'IL-1 β (voie Th17), l'IFN- γ (voie Th1) et anti-inflammatoire telle que l'IL-10 (voie Treg) a été observée aux jours 19 et/ou 40 (tableau 2). Ces résultats ont déjà été reportés après challenge par *Campylobacter* chez des poulets de chairs conventionnels (Reid *et al.*, 2016; Connerton *et al.*, 2018).

CONCLUSION

Au cours de cette étude, la vaccination avec la flagelline (primo vaccination à ADN et rappel protéique) a permis de stimuler la voie mucosale et de diminuer la charge caecale en *Campylobacter* chez les poulets EOPS. Ces résultats suggèrent une possible implication de la voie mucosale dans la diminution de *Campylobacter*. Par conséquent, la vaccination par voie orale pourrait être envisageable afin de cibler plus spécifiquement l'immunisation mucosale. Les voies cellulaires semblent être stimulées par la colonisation de *Campylobacter* et non par la vaccination, notamment chez les poulets conventionnels jusqu'à atteindre un certain niveau de tolérance vis-à-vis de la colonisation par *Campylobacter*. L'analyse de la composition et de la structure du microbiote caecal qui est en cours permettra d'évaluer son influence suite à la vaccination contre *Campylobacter*. Malgré un effet partiel de la vaccination contre *Campylobacter* chez les poulets de chair, ces nouvelles données pourraient permettre d'améliorer les futurs protocoles de vaccination anti-*Campylobacter* chez les poulets de chair.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel du SELEAC (Service d'Élevage et expérimentation avicole et cunicole) de l'Anses Ploufragan pour leur aide dans la mise en place et soins des animaux et le SEPPIC pour la fourniture gracieuse de l'adjuvant MONTANIDE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cawthraw, S., Ayling, R., Nuijten, P., Wassenaar, T., and Newell, D.G., 1994. Avian Dis 38 (2), 341–349.
- Connerton, P.L., Richards, P.J., Lafontaine, G.M., O'Kane, P.M., Ghaffar, N., Cummings, N.J., et al., 2018. Microbiome, 6 (1), 88.
- Cox, C.M., Sumners, L.H., Kim, S., McElroy, A.P., Bedford, M.R., and Dalloul, R.A., 2010. Poult. Sci., 89 (12), 2597–2607.
- Cui, Y., Guo, F., Guo, J., Cao, X., Wang, H., Yang, B., et al., 2020. Vaccines, 8 (4), 747.
- de Zoete, M.R. de, Kestra, A.M., Roszczenko, P., and Putten, J.P.M. van, 2010. Infect. Immun., 78 (3), 1229–1238.
- EFSA and ECDC, 2021. EFSA J., 19 (2), e06406.
- EFSA, 2020. EFSA J., 18 (4), e06090.
- Garcia, J.S., Byrd, J.A., and Wong, E.A., 2018. Poult. Sci. 97 (10), 3671–3680.
- Han, Z., Willer, T., Li, L., Pielsticker, C., Rychlik, I., Velge, P., et al., 2017. Infect. Immun., 85 (11), e00380-17.
- Heidari, M., Wang, D., Fitzgerald, S.D., and Sun, S., 2016. Avian. Pathol., 45 (5), 582–592.
- Hermans, D., Pasmans, F., Heyndrickx, M., Immerseel, F.V., Martel, A., Deun, K.V., et al., 2012. Crit Rev Microbiol, 38 (1), 17–29.
- Lacharme-Lora, L., Chaloner, G., Gilroy, R., Humphrey, S., Gibbs, K., Jopson, S., et al. (2017) Sci. Rep., 7, 1–10.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., 2001. Methods, 25 (4), 402–408.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Hirchaud, E., Parra, A., Chemaly, M., and Dory, D., 2016. J Immunol Res., 2016, 5715790.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Vigouroux, E., Poezevara, T., Beven, V., Quesne, S., et al., 2017. PLoS one, 12 (11), e018872.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Vigouroux, E., Poezevara, T., Béven, V., Quesne, S., et al., 2018. Vaccine, 36 (16), 2119–2125.
- Mortada, M., Cosby, D.E., Akerele, G., Ramadan, N., Oxford, J., Shanmugasundaram, R., et al., 2021. PLoS ONE., 16(3), e0247080.
- Nang, N.T., Lee, J.S., Song, B.M., Kang, Y.M., Kim, H.S., and Seo, S.H., 2011. Vet. Res., 42, 64.
- Nothaft, H., Davis, B., Lock, Y.Y., Perez-Munoz, M.E., Vinogradov, E., Walter, J., et al., 2016. Sci. Rep., 6, 26511.
- Rasoli, M., Yeap, S.K., Tan, S.W., Roohani, K., Kristeen-Teo, Y.W., Alitheen, N.B., et al., 2015. BMC Vet. Res., 11, 75.
- Reid, W.D.K., Close, A.J., Humphrey, S., Chaloner, G., Lacharme-Lora, L., Rothwell, L., et al., 2016. R. Soc. Open Sci., 3 (3), 150541.
- Sahin, O., Luo, N., Huang, S., and Zhang, Q., 2003. Appl. Environ. Microbiol., 69 (9), 5372–5379.
- Shoaf-Sweeney, K.D., Larson, C.L., Tang, X., and Konkel, M.E., 2008. Appl. Environ. Microbiol., 74 (22), 6867–6875.
- Su, S., Dwyer, D.M., Miska, K.B., Fetterer, R.H., Jenkins, M.C., and Wong, E.A., 2017. Poult. Sci., 96 (7), 2421–2427.
- Taha-Abdelaziz, K., Astill, J., Shojadoost, B., Borrelli, S., A Monteiro, M., and Sharif, S., 2020. Vet Microbiol., 246, 108732.
- Vohra, P., Chintoan-Uta, C., Terra, V.S., Bremner, A., Cuccui, J., Wren, B.W., et al., 2020. Vaccines, 8(3), 520.

Tableau 1. Résumé des résultats entre les poulets Leghorn EOPS vaccinés et placebos.

Age (jours)	19	22	28	35	40
Colonisation caecale de <i>Campylobacter</i> (log₁₀ UFC/mL)	NA	NS	P:8.86±0.26 ↘V:7.25±2.41	NS	P:8.46±0.81 ↘V:7.20±1.24
IgY sérique anti-flagelline (A_{490nm})	P:0.06±0.00 ↗V:0.14±0.11	P:0.06±0.00 ↗V:0.62±0.52	P:0.06±0.01 ↗V:0.80±0.56	P:0.09±0.05 ↗V:1.40±0.58	P:0.12±0.08 ↗V:1.63±0.54
IgA biliaires anti-flagelline (A_{490nm})	NS	P:0.45±0.13 ↗V:1.21±0.81	P:0.49±0.15 ↗V:1.40±0.72	P:0.56±0.06 ↗V:1.52±0.90	P:0.77±0.20 ↗V:1.30±0.35
Cytokines/ chimiokines et peptides antimicrobiens dans le caecum	NS	NS	↗ IL-10 V/P:2.09	NS	↘AvBD10 V/P:0.06

Les augmentations significatives (p-value <0,05) des productions d'anticorps (IgY et IgA) ainsi que les sur-expressions relatives des gènes de cytokines/chimiokines/peptides antimicrobiens dans le caecum des poulets vaccinés comparé aux placebos sont représentés par des flèches vers le haut (↗) ; les flèches vers le bas (↘) indiquent des diminutions significatives de la colonisation caecale de *Campylobacter* ou de sous expressions relatives des gènes. NS indique aucune différence significative entre les poulets vaccinés et placebos. NA indique qu'aucune analyse n'a été effectuée. Les données (moyenne±écart-type) sont indiquées pour les résultats significatifs de colonisation caecale de *Campylobacter* (log₁₀ UFC/mL) et d'IgY et d'IgA anti-flagelline (A_{490nm}) entre les groupes vaccinés (V) et placebo (P). Les différences significatives d'expression relatives des gènes (V/P) entre les groupes vacciné et placebo sont également indiqués.

Tableau 2. Résumé des résultats entre les poulets chair conventionnels vaccinés et placebos.

Age (jours)	19	22	28	35	40
Colonisation caecale de <i>Campylobacter</i> (log₁₀ UFC/mL)	NA	NS	NS	NS	NS
IgY sériques anti-flagelline (A_{490nm})	NS	P:0.05±0.00 ↗V:0.24±0.22	P:0.07±0.03 ↗V:0.53±0.32	P:0.15±0.13 ↗V:1.15±0.74	P:0.10±0.04 ↗V:1.37±0.74
IgA biliaires anti-flagelline (A_{490nm})	NS	NS	NS	NS	NS
Cytokines/ chimiokines et peptides antimicrobiens dans le caecum	↗AvBD12 V/P:6.19 ↘IL-17A V/P:0.03 ↘CXCLi2 V/P:0.15	NA	NA	NA	↘IFN-g V/P:0.30 ↘IL-17A V/P:0.38 ↘IL-1β V/P:0.27 ↘CXCLi2 V/P:0.26 ↘IL-10 V/P:0.47

Les augmentations significatives (p-value <0,05) des productions d'anticorps (IgY) ainsi que les sur-expressions relatives des gènes de cytokines/chimiokines/peptides antimicrobiens dans le caecum des poulets vaccinés comparé aux placebos sont représentés par des flèches vers le haut (↗) ; les flèches vers le bas (↘) indiquent des diminutions significatives de sous-expressions relatives des gènes. NS indique aucune différence significative entre les poulets vaccinés et placebos. NA indique qu'aucune analyse n'a été effectuée. Les données (moyenne±écart-type) sont indiquées pour les résultats significatifs de colonisation caecale de *Campylobacter* (log₁₀ UFC/mL) et d'IgY et d'IgA anti-flagelline (A_{490nm}) entre les groupes vaccinés (V) et placebo (P). Les différences significatives d'expression relatives des gènes (V/P) entre les groupes vacciné et placebo sont également indiqués.