

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR BATNA
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES**



THESE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière

Sciences vétérinaires

Option

Histologie et cytologie vétérinaire

Présentée par :

BENNOUNE Omar

THEME

**L'influence de la bourse de Fabricius sur l'activité
antibactérienne des hétérophiles chez le poulet de chair**

"The effect of Bursa of Fabricius on the bacterial activity of heterophils in broiler chicken"

JURY

Président : ALLOUI Nadir

Examineur : BENSOUILAH Mourad

Examineur : DJEBAR Abdellah Borhane

Examineur : BACHIR Pacha Mohamed

Examineur : TEBBANI Abdelhamid Yacine

Rapporteur : MELIZI Mohamed

Grade et Université

Professeur - Université de BATNA

Professeur - Université de ANNABA

Professeur - Université de ANNABA

Maître de conférences - Université de BLIDA

Maître de conférences - Université de BATNA

Professeur - Université de BATNA

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier toute personne qui m'a aidé de près ou de loin dans l'accomplissement de ce travail et à leurs tête mon directeur de thèse Pr MELIZI Mohamed qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse et aussi pour son soutien et ses conseils pertinents et incontournables dans la correction et la réalisation de cette thèse. Je tiens aussi à exprimer mes plus chaleureux remerciements et mon profond respect à l'égard du Dr Kamel KHAZAL qui m'a aidé énormément dans la réalisation de cette thèse.

Un remerciement particulier aux membres de jury, Pr ALLOUI Nadir pour accepter la présidence de notre jury de thèse ainsi que Pr BENSOUILAH Mourad, Pr DJEBAR Abdellah Borhane, Dr BACHIR Pacha Mohamed et Dr TEBBANI Abdelhamid Yacine qui m'ont honoré par leur présence et accepter d'être membres de jury et participer dans l'évaluation de cette thèse.

A toute ma famille, mes parents, ma femme pour son soutien si précieux sans oublier mes frères et sœurs pour le support et le soutien moral tout au long de mes études.

Je suis aussi dans l'obligation de remercier tous mes collègues et confrères au sein de notre laboratoire d'histologie et d'histopathologie et au sein du département qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

BENNOUNE Omar

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	VI
LISTE DES ABREVIATIONS	X
INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
1. Particularités du système immunitaire des volailles	3
2. La bourse de Fabricius	3
2.1. Structure	4
2.2. Histophysiologie	5
3. Les hétérophiles	6
3.1. Définition	6
3.2. Morphologie	7
3.3. Activité des hétérophiles	7
3.4. Granules cytoplasmiques	9
3.4.1. Biogenèse des granules	11
3.4.2. Dégranulation	12
3.5. Rôle dans l'immunité	13
3.5.1. Mécanismes dépendants de l'oxygène	14
3.5.2. Mécanismes indépendants de l'oxygène	16
3.5.2.1. La lactoferrine	18
3.5.2.2. La BPI (Bactericidal / permeability-increasing protein)	18
3.5.2.3. Les serprocidines	18
3.5.2.4. Les cathélicidines	18
3.5.2.5. Le lysozyme	19
3.5.2.6. Les phospholipases A2: (PLA2)	20
3.5.2.7. La calprotectine	20
3.5.2.8. Les défensines	20
3.5.3. Autres mécanismes	22
3.6. Les peptides cationiques antimicrobiens	22
3.6.1. Classification	22
3.6.1.1. Première classe	22
3.6.1.2. Deuxième classe	23

3.6.2. Distribution	24
3.6.2.1. Chez l'homme et les primates	24
3.6.2.2. Chez les autres mammifères	26
3.6.2.3. Les peptides cationiques chez les non-mammifères	28
3.6.2.4. Les peptides antimicrobiens cationiques et les hétérophiles aviaires	29
3.6.3. Biosynthèse des peptides cationiques antimicrobiens	30
3.6.4. Régulation et indicibilité des défensines	31
3.6.5. Activité antimicrobienne	33
3.6.6. Mode d'action	37
3.6.7. Action sur les cellules des mammifères	40
3.6.8. Activité anti-endotoxinique des peptides antimicrobiens cationiques	41
3.6.9. Autres rôles des peptides antimicrobiens cationiques	42
3.6.10. Les peptides antimicrobiens cationiques comme marqueurs	42

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

1. Animaux	44
2. Réception des poussins	44
3. Alimentation et abreuvement	45
4. Vaccination	45
5. Ablation de la bourse de Fabricius	46
6. Frottis sanguins	47
6.1. Prélèvements sanguins	47
6.2. Réalisations des frottis	48
6.3. Coloration des frottis	49
7. Numération différentielle des leucocytes	49
8. Etude morphométrique des hétérophiles	50
9. L'extraction des granules cytoplasmiques	52
9.1. Injection d'amidon en intrapéritonéale et récupération des hétérophiles	52
9.2. Purification des hétérophiles	52
9.3. Désintégration ultrasonique des hétérophiles	53
9.4. Extraction des granules cytoplasmiques	54
9.5. Dialyse de l'extrait des granules	54

9.6. Lyophilisation	54
9.7. Quantification des protéines dans les échantillons	55
10. Electrophorèse de l'extrait des granulations	57
11. Etude de l'activité antibactérienne	60
11.1. Etablissement des courbes étalons pour la quantification des UFC/ml	60
11.2. Tests de l'activité antibactérienne	61
12. L'activité antibactérienne contre <i>Salmonella enteritidis</i> et test ELISA	63
13. Clairance de l'encre de Chine	64
14. Electrophorèse des protéines sériques	65
15. Analyse des résultats	65

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'ablation de la bourse de Fabricius	66
1.1. Effet sur la mortalité	66
1.2. Effet sur l'évolution pondérale	69
1.3. Effet sur le statut immunitaire	73
2. Résultats de la coloration	75
2.1. Les érythrocytes	76
2.2. Les thrombocytes	76
2.3. Les lymphocytes	77
2.4. Les monocytes	78
2.5. Les éosinophiles	79
2.6. Les basophiles	79
2.7. Les hétérophiles	80
3. Etude morphométrique des hétérophiles	80
4. Numération différentielle des leucocytes	83
5. Etude de l'activité antibactérienne	85
6. L'activité antibactérienne contre <i>Salmonella enteritidis</i>	86
6.1. L'influence du challenge bactérien sur l'état clinique	86
6.2. La production des anticorps	87
7. Electrophorèse de l'extrait des granulations	89
8. Clairance de l'encre de Chine	89
9. Profil électrophorétique des sérums	95

CONCLUSION	98
RECOMMANDATIONS	100
REFERENCES	101
RESUME	117

TABLE DES ILLUSTRATIONS

1. Liste des figures

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Figure 1 : Vue crâniale de La BF d'un poulet (McLelland, 1990)	3
Figure 2 : Structure histologique de la BF. x 12,5 (Bacha et Bacha, 2000)	4
Figure 3: Structure histologique de la BF (H & E x 100) (Bennoune, 2011)	5
Figure 4 : Eléments figurés du sang d'un poulet. Wright-Giemsa ; x100 (Wakenell, 2010).	7
Figure 5: Hétérophile normal séparé du sang périphérique de la dinde (Topp et Carlson, 1972c)	9
Figure 6: Hétérophile du poulet au microscope électronique (Brune et Spitznagel, 1973).	10
Figure 7 : Itinéraire intracellulaire des protéines néosynthétisées (Borregaard et Cowland, 1997)	12
Figure 8: Aspect des hétérophiles témoins et toxiques au microscope électronique (Latimer et al., 1988).	13
Figure 9 : L'activité antimicrobienne des neutrophiles est un processus multi-étapes (Weiss et al., 2010).	14
Figure 10: Représentation schématique des réactions d'oxydation (Hampton et al., 1998).	16
Figure 11: Séquences des peptides antibiotiques représentatives des trois superfamilles (Barra et al., 1998)	24
Figure 12: Synthèse de la HNP α -défensine et libération sur des microorganismes (Ganz, 2003).	31
Figure 13 : Mécanisme proposé de l'action des PAC vis-à-vis de l'enveloppe cellulaire des bactéries (Hancock et Chapple, 1999).	40
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
Figure 1 : Réception des poussins	45
Figure 2 : Installation et élevage des poussins	45
Figure 3: Les étapes principales de la réalisation de l'ablation de la bourse de Fabricius	46
Figure 4 : Prélèvement sanguin à partir de la veine brachiale	47
Figure 5 : Prélèvement sanguin à partir de la veine jugulaire	48

Figure 6 : Réalisation des frottis sanguins	48
Figure 7 : Appareil pour la numération différentielle	50
Figure 8 : Frottis sanguin et zone de lecture (en méandre)	50
Figure 9 : Interface du logiciel pour les mesures	51
Figure 10 : Désintégration ultrasonique des hétérophiles	53
Figure 11: Les granulations cytoplasmiques après centrifugation à 27000 x g	54
Figure 12: Spectrophotomètre (Shimadzu UV 120-01)	56
Figure 13: Courbe étalon de la concentration des protéines	56
Figure 14: Appareil d'électrophorèse verticale	59
Figure 15: Courbe standard pour <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 tampon phosphate de sodium 10 mmol pH=7,4	61
Figure 16: Courbe standard pour <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 tampon phosphate de sodium 10 mmol pH=7,4	61
Figure 17 : Kit ELISA pour <i>S. enteritidis</i> (IDEXX)	63
Figure 18 : Lecteur ELISA Metertech Σ960	64
Figure 19 : Appareil d'électrophorèse horizontale (Hoefer super sub)	65

RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 1: Taux de mortalité (%)	66
Figure 2: Taux de mortalité suivant les tranches d'âge	67
Figure 3: La croissance des poulets avec l'écart-type	72
Figure 4: La courbe de croissance des sujets	72
Figure 5: Poids vif de certains organes à 35j	74
Figure 6: Poids relatif de certains organes	75
Figure 7: Erythrocytes ovalaires nucléés avec un monocyte (coloration de Wright, x 1000)	76
Figure 8: Erythrocytes avec trois thrombocytes (coloration de Wright, x 1000)	77

Figure 9: Deux lymphocytes et un hétérophile (coloration de Wright, x 1000)	78
Figure 10: Un monocyte entouré d'érythrocytes (coloration de Wright, x 1000)	78
Figure 11: Hétérophile, lymphocyte et un éosinophile (coloration de Wright, x 1000)	79
Figure 12 : Basophile avec des érythrocytes (coloration de Wright, x 1000)	79
Figure 13: Aspect des granulations cytoplasmiques d'un hétérophile	80
Figure 14: Forme et aspect géométrique des hétérophiles (Wright, X 1000)	81
Figure 15: Moyenne et écart-type de la surface des hétérophiles (μm^2)	82
Figure 16: La population leucocytaire	83
Figure 17: Le rapport hétérophiles / lymphocytes	84
Figure 18: Activité antibactérienne contre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	85
Figure 19: Microplaque ELISA avec la clé de lecture	87
Figure 20: Rapport échantillon sur la moyenne des contrôles négatifs	88
Figure 21: Electrophorèse (AU-PAGE) de l'extrait des granules cytoplasmiques	89
Figure 22: La clairance de l'encre de chine chez les sujets sans BF	91
Figure 23: La clairance de l'encre de chine chez les sujets témoins	92
Figure 24: La clairance de l'encre de chine chez les sujets vaccinés	92
Figure 25: La clairance de l'encre de chine chez les différents lots	94
Figure 26: L'évolution de la clairance chez les lots différents	93
Figure 27: Aspect du foie et de la rate chez un animal après l'injection de l'encre de Chine	94
Figure 28: Electrophorèse des protéines sériques	96
Figure 29: Profil électrophorétique (lot témoin)	97
Figure 30: Profil électrophorétique (lot sans BF)	97

2. Liste des tableaux

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Tableau 1 : Comparaison entre le contenu des granules des hétérophiles aviaires et des neutrophiles humains (Harmon, 1998)	8
Tableau 2 : Les propriétés des espèces réactives de l'oxygène (Hampton et al., 1998).	15
Tableau 3 : Les protéines et les peptides antimicrobiens des neutrophiles (Levy, 2000b).	17
MATERIEL ET METHODES	
Tableau 1 : les vaccins utilisés	45
RESULTATS ET DISCUSSION	
Tableau 1 : Les taux de mortalité	66
Tableau 2 : La mortalité suivant les tranches d'âge	67
Tableau 3 : Poids des sujets au 3 ^{ème} jour	69
Tableau 4 : Poids des sujets au 7 ^{ème} jour	69
Tableau 5 : Poids des sujets au 15 ^{ème} jour	70
Tableau 6 : Poids des sujets au 21 ^{ème} jour	70
Tableau 7 : Poids des sujets au 29 ^{ème} jour	71
Tableau 8 : Poids des sujets au 34 ^{ème} jour	71
Tableau 9 : Poids vif des poulets et des organes à 35j	73
Tableau 10 : Surface des hétérophiles à 35j (μm^2)	82
Tableau 11: Résultats de la diffusion radiale contre <i>Escherichia coli</i> 25922	86
Tableau 12 : La cinétique de l'encre de chine dans le sang chez les différents lots	91
Tableau 13 : Le poids des sujets de la clairance à 35j (g)	95

LISTE DES ABREVIATIONS

µm : micromètre
ADNc: ADN complémentaire
ANOVA : analysis of variance
AU-PAGE : acide urea-polyacrylamide gel electrophoresis
Bac : bactenecin
BASP : bursal antisteroidogenic peptide
BF: bourse de Fabricius
BNBD: bovine neutrophil β-defensins
BPI : bactericidal/permeability-increasing protein
BSA : bovine serum albumin
CGD : la maladie granulomateuse chronique
chCATH : chicken cathelicidin
CHP : chicken heterophil peptide
cm: centimètre
CMI : concentration minimale inhibitrice
Da: Dalton
eCATH: equine cathelicidin
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
ERV : entérocoques résistants à la vancomycine
g: gramme
Gal: gallinacine
GALT : gut associated lymphoid tissue
GPNP : guinea pig neutrophil peptide
H & E : coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
h : heure
H/L: rapport hétérophiles sur lymphocytes
HaNP : hamster neutrophil peptide
hBD-2 : human β-defensin 2
hCAP18 : human cathelicidin antimicrobial peptide 18 kilo Dalton
HD : human defensin
HETs : heterophil extracellular traps
HNP: human neutrophil peptide

Ig : immunoglobulines
IP: intrapéritonéale
IV: intraveineuse
j : jour
KDa : kiloDalton
LAMP: lysosome-associated membrane proteins
Lp (a) : lipoprotéine (a)
LPS : lipopolysaccharides
mA : milliampère
mBD-1 : mouse beta defensin-1
MGG : May-Grünwald giemsa
mm: millimètre
MPO : myeloperoxidase
MPR-14 : calgranulin B
MPR-8 : calgranulin A
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT : nitro blue tetrazolium
NETs : neutrophil extracellular traps
nm : nanomètre
NO : nitric oxide
NP: neutrophil peptide
PAC: peptide antimicrobien cationique
PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PCR : polymerase chain reaction
PG :protegrine
PLA2 : phospholipase A2
PMN: polymorphonucléaire
PR : proline
SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SMAP-29: sheep myeloid antimicrobial peptide-29
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
THP : turkey heterophil peptide
TSB : bouillon trypticase soja
UFC : unité formant colonie

INTRODUCTION

L'aviculture est le seul secteur stratégique qui peut subvenir aux besoins nutritionnels en protéines d'origine animale sans cesse croissants de notre population en réduisant le coût de la facture d'importation des viandes.

L'hématologie demeure un volet de diagnostic fortement utilisé tant en pathologie humaine qu'en pathologie vétérinaire. En pathologie aviaire, la majorité des oiseaux ne montre pas de signes cliniques durant la phase initiale de la maladie. Par conséquent, les méthodes de diagnostic, comme l'hématologie, peuvent fournir un aperçu de valeur sur le statut sanitaire d'un individu avant l'apparition des signes cliniques et permettent une intervention précoce pour juguler la pathologie (Clark et al., 2009). L'hématologie constitue un composant majeur de la pratique vétérinaire car l'interprétation des cellules sanguines aviaires fournit beaucoup d'informations susceptibles d'orienter le diagnostic, aspect fortement négligé par nos praticiens et dont l'application facile et rapide revêt un intérêt de diagnostic capital. Les praticiens doivent être capables de reconnaître la morphologie normale et la fonction des cellules pour interpréter tous types de changements (Mitchell et Johns, 2008). L'évaluation de l'hémogramme aviaire est devenue actuellement un moyen nécessaire et utile dans le diagnostic des pathologies aviaires (Campbell, 1995).

La découverte et la purification des défensines (peptides antimicrobiens cationiques : PAC), isolées à partir des granules cytoplasmiques des neutrophiles, ouvre de nouveaux horizons sur la recherche et le traitement de certaines maladies génétiques comme la mucoviscidose et aussi de nouvelles molécules à usage thérapeutique ou préventif et même comme additifs alimentaires. En effet, en 1994 un groupe scientifique de travail de l'organisation mondiale de la santé a propos de la surveillance de la résistance aux antibiotiques, tire la sonnette d'alarme en déclarant que la résistance aux agents antibactériens était déjà un problème sérieux de santé publique aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Les niveaux de la résistance avaient augmenté à des taux effrayants et une augmentation similaire ou à des taux encore plus élevés est prévue quand les agents antibactériens perdent leur efficacité. Actuellement il y a une orientation vers les antibiotiques peptidiques et surtout les peptides cationiques, ces derniers possèdent une activité

antibactérienne par la perturbation physique de la membrane et ne peuvent pas être la cible d'une résistance émergente rapide (Hancock, 1997).

Les hétérophiles, équivalents des neutrophiles chez les mammifères, sont caractérisés par l'absence de la myéloperoxidase, une enzyme principale de l'explosion respiratoire (Styrt, 1989; Harmon, 1998). Leur activité antimicrobienne dépendrait donc principalement d'un mécanisme non oxydatif (Harmon, 1998) où les peptides cationiques sont les principaux constituants (Harwig et al., 1994, Evans et al., 1994).

En médecine aviaire, la bourse de Fabricius (BF) est le site de maturation des lymphocytes B chez les oiseaux et les lésions de celle-ci, comme dans la bursite infectieuse aviaire, augmentent considérablement la susceptibilité des animaux à des infections secondaires avec réponse sous-optimale à la vaccination. L'objectif de cette étude est de connaître s'il y a une influence de la BF sur l'activité de certains éléments constitutifs du système immunitaire et principalement sur les hétérophiles.

Notre étude consiste aussi à :

- Identifier les éléments figurés du sang chez le poulet de chair.
- Isoler les peptides cationiques antimicrobiens localisés dans les granules cytoplasmiques et qui sont responsables de l'activité antibactérienne des hétérophiles.
- Rechercher l'existence d'une relation possible entre la BF et la quantité des hétérophiles.
- Etudier l'influence de la BF sur la capacité phagocytaire totale.
- Rechercher l'influence de la BF sur la production des anticorps.

Chapitre I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Particularités du système immunitaire des volailles :

Le système immunitaire des poulets est caractérisé par l'absence des nœuds lymphatiques qui sont compensés par les tissus lymphoïdes diffus et par les follicules lymphoïdes qui sont très répandus. La rate est recouverte par une capsule musculaire avec l'absence des trabécules et la démarcation entre la pulpe blanche et rouge est plus difficile que celle des mammifères (Bacha et Bacha, 2000). Le thymus, contrairement à celui des mammifères, est localisé au niveau de la région cervicale et formé de quatre à sept lobes pâles; chaque lobe se divise en lobules avec une structure histologique similaire à celle des mammifères (McLelland, 1990). En plus des particularités sus-citées, le système lymphoïde des volailles est formé de la moelle osseuse, la rate, le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT), les plaques de Peyer, amygdales caecales, le diverticule de Meckel et la glande de Harder... (Oláh et Vervelde, 2008).

2. La bourse de Fabricius (BF) :

La BF est un organe spécifique des oiseaux et elle est décrite pour la première fois par Hieronymus Fabricius professeur anatomiste et chirurgien à l'université Padua (Italie) 1565-1610 (Toivanen, 2004). C'est un organe lymphoïde impliqué dans les phénomènes de défense et elle est appelée parfois glande mousseuse (foam gland) et secrète un fluide blanchâtre écumeux (Denbow, 2000).



Figure 1 : Vue crâniale de La BF d'un poulet (McLelland, 1990)

a: BF b : rectum

La BF atteint sa taille maximale vers l'âge de 8–10 semaines (Ciriaco et al., 2003). On distingue généralement trois stades de développements distincts :

1. augmentation rapide : embryogenèse tardive jusqu'à 6–8 semaines
2. phase de plateau entre 10 et 15 semaines
3. phase d'involution, après 18-20 semaines (Rodríguez-Méndez et al., 2010)
4. La régression complète de la BF apparaît clairement à la 27^{ème} semaine (Khenenou, 2008).

2.1. Structure :

La BF est une petite cavité en forme de sac dorsal qui représente un diverticule dorsal du proctodeum connu uniquement chez les oiseaux (figure 1). Elle est caractérisée par la présence de plis muqueux élevés et épais remplis par de nombreux follicules ou lobules bursiques polyédriques ; chaque repli est maintenu par un axe conjonctif. Chaque lobule est composé d'un tissu lymphoïde, divisé en zone corticale sombre riche en lymphocytes de petite taille et une médullaire pâle contenant un nombre moindre de cellules de taille variable (figure 2) (Bacha et Bacha, 2000). A l'éclosion la BF contient approximativement 10 000 follicules dont chacun contient environ 100000–150000 lymphocytes B (Fellah et al., 2008).

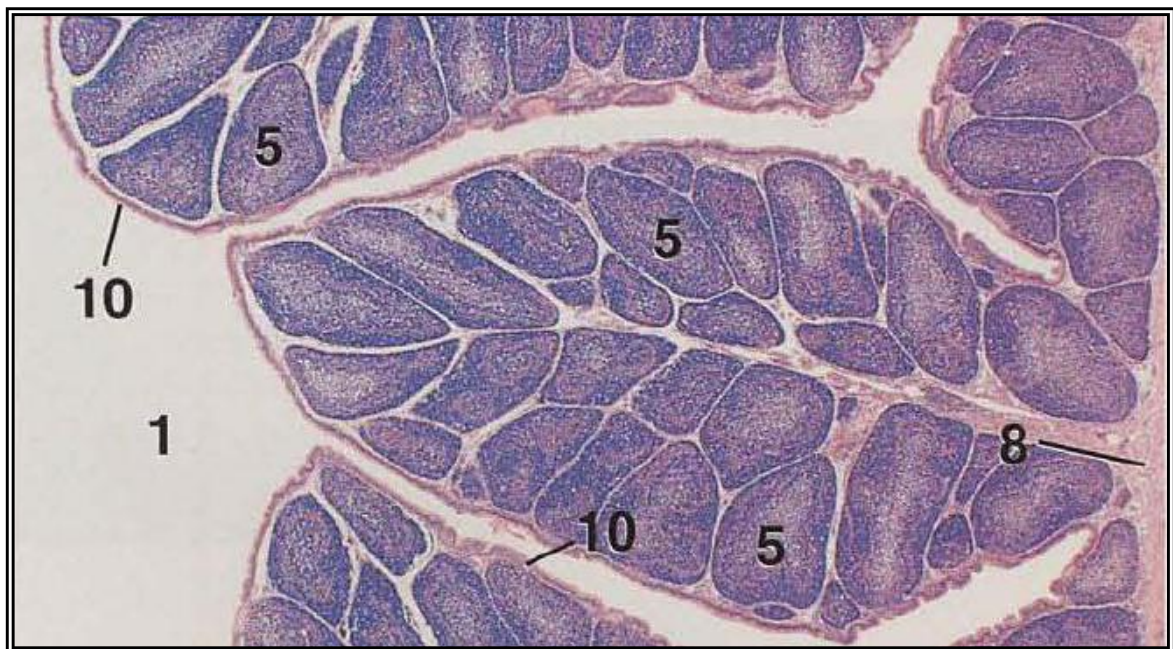


Figure 2 : Structure histologique de la BF. x 12,5 (Bacha et Bacha, 2000)

1 : lumière de la BF. 5 : lobule bursique 8 :la musculuse 10 :épithélium pseudostratifié

Une couche de cellules épithéliales indifférenciées occupe la périphérie de la zone médullaire qui est séparée du cortex par un réseau capillaire. La bourse est recouverte par un épithélium

pseudostratifié à l'exception des sommets de chaque lobule qui est tapissé par une touffe de cellules épithéliales cylindriques simples (figure 3) (Bacha et Bacha, 2000).

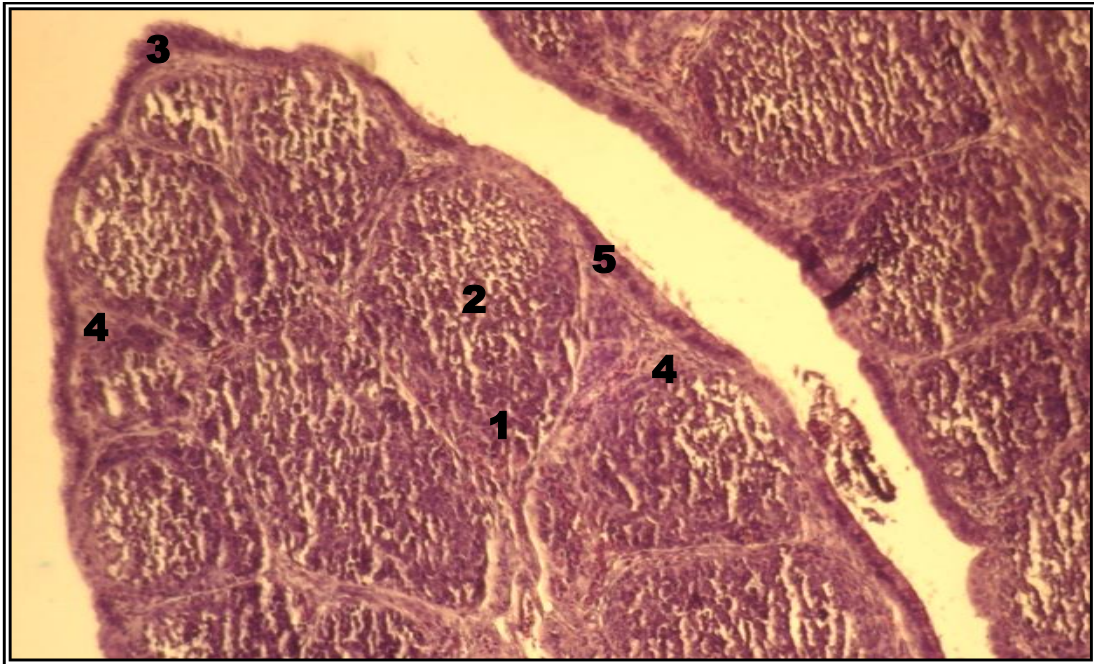


Figure 3: Structure histologique de la BF (H & E x 100) (Bennoune, 2011).

1: cortex 2: médulla 3: touffe épithéliale 4: lamina propria 5: épithélium pseudostratifié

2.2. Histophysiologie :

La BF est colonisée pendant le développement embryonnaire par les cellules lymphoïdes précurseurs qui arrivent à maturité dans la bourse avant la migration à la périphérie où elles ont la capacité de participer aux réponses immunitaires (Ratcliffe, 2008). Après l'éclosion, des antigènes dérivés de l'intestin sont pris par la BF tandis que le développement bursal avant l'éclosion se produit en absence d'antigènes exogènes. Le développement des lymphocytes B après l'éclosion est donc influencé par les antigènes environnementaux (Ratcliffe, 2005).

La ligature du canal bursal prévient l'entrée des antigènes environnementaux à l'intérieur de la lumière de la BF et inhibe remarquablement la formation des agglutinines sériques. La BF est donc le siège de la stimulation du système immunitaire et de l'induction de la formation des agglutinines sériques par les antigènes environnementaux (Ekino et al., 1985).

Plusieurs peptides avec des activités immunomodulatrices sont isolés de la BF; la bursine, qui est le premier à être isolé, est extensivement étudié et pourrait induire sélectivement les lymphocytes B à produire les anticorps (Tapan, 1986). Une étude immunohistochimique montre que la bursine est localisée seulement au niveau des cellules folliculaires et des

cellules dendritiques réticulaires de la bourse de Fabricius qui représentent probablement le site de production et de sécrétion de la bursine (Viamontes, 1989). Cette hormone (la bursine) provoque la différenciation des cellules souches chez les volailles et les muridés (Lassila, 1998).

Un autre peptide appelé BASP (bursal antisteroidogenic peptide) est isolé de la BF et possède une activité sécrétagogue pour l'hormone de croissance et la prolactine (Caldwell et al., 1999). Un autre peptide appelé BSP-II formé de sept résidus d'acides aminés (TPSGLVY) a été récemment isolé et constitue un nouveau facteur biologique actif avec des activités immunomodulatrices (Feng et al., 2010).

3. Les hétérophiles

3.1. Définition:

C'est en 1893 que Metchnikoff a divisé les deux classes de leucocytes en microphages et macrophages. Il a décrit des leucocytes polymorphonucléaires qui engouffrent et digèrent des particules solides. Clark et ses collaborateurs en 1936 ont démontré des propriétés phagocytaires sélectives des polymorphonucléaires d'amphibiens et des mammifères (Topp et Carlson, 1972c).

Le terme "hétérophile" du grec heteros qui signifie différent, a été suggéré par Kyes 1929 et est appliqué aux granulocytes chez lesquels les inclusions de cellules homologues parmi plusieurs classes des vertébrés montrent une grande diversité de réaction aux colorants (Macrae et Spitznagel, 1975).

Les hétérophiles des volailles sont identifiés par la présence de granulations de grande taille, émoussés rouges, souvent aciculaires. La présence de ces granulations éosinophiliques est à l'origine du terme hétérophile, par opposition aux neutrophiles des mammifères dont les granules sont généralement neutres dans les frottis sanguins colorés par les colorations de Romanowsky. Bien qu'il y ait beaucoup de ressemblances entre ces deux granulocytes, il existe aussi des différences importantes (Latimer et Bienzel, 2000; Harmon, 1998).

Les hétérophiles sont les granulocytes prédominants dans la réponse inflammatoire aiguë chez les gallinacés. Les hétérophiles ont un pouvoir phagocytaire très important et possèdent une activité antimicrobienne à large spectre. Ils s'accumulent dans les tissus enflammés, en causant des dégâts au niveau du tissu et en formant des granulomas d'hétérophiles qui sont morphologiquement semblables aux lésions inflammatoires des reptiles. Les hétérophiles

forment la première ligne de défense contre l'invasion microbienne au niveau des poumons et des sacs aériens où il y a absence de macrophages résidents (Harmon, 1998).

3.2. Morphologie:

L'hétérophile est le granulocyte prédominant chez la poule et la dinde. L'hétérophile mûr est une cellule ronde avec un diamètre approximatif de 13 μm . Le cytoplasme est incolore avec des granules cytoplasmiques oranges rougeâtres en forme de bâtonnets ou baguettes, qui souvent et partiellement masquent le noyau avec un corps central réfringent distinct. Le noyau possède deux à trois lobes et un aspect grossier de la chromatine (figure 4) (Wakenell, 2010).

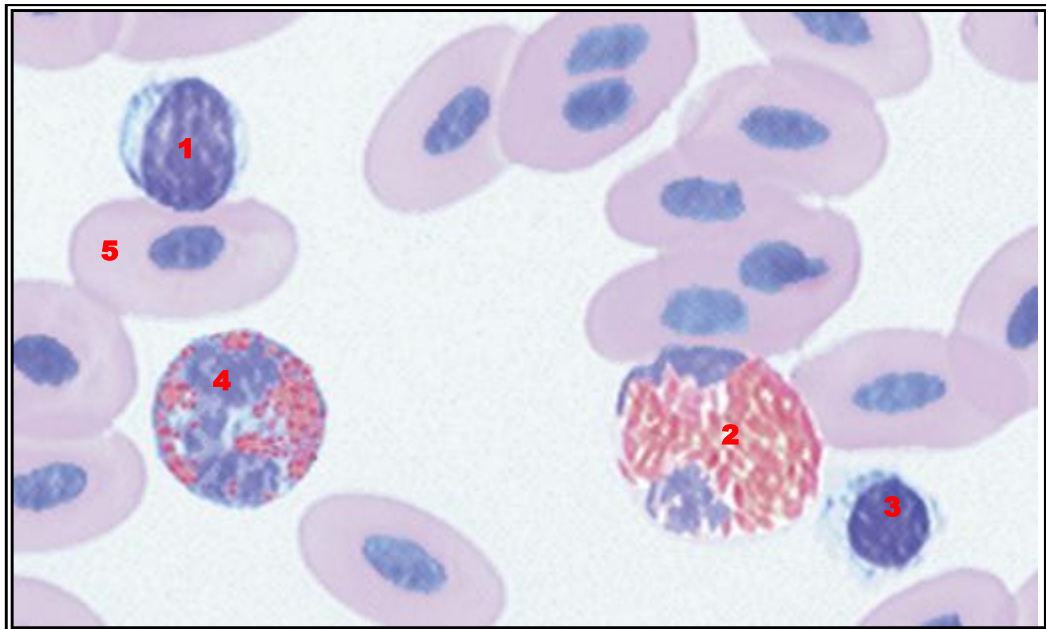


Figure 4 : Eléments figurés du sang d'un poulet. Wright-Giemsa ; x100 (Wakenell, 2010).

Lymphocyte (1), hétérophile (2), thrombocyte (3), éosinophile (4) et des érythrocytes (5)

3.3. Activité des hétérophiles :

Les hétérophiles aviaires qui sont l'équivalent des neutrophiles des mammifères, montrent une activité antibactérienne *in vitro* contre *Staphylococcus albus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* avec une activité phagocytaire contre *Staphylococcus albus*. Contrairement aux neutrophiles des mammifères, les hétérophiles manquent de la

myéloperoxidase, une substance connue pour son activité antibactérienne *in vitro* (Penniall et Spitznagel, 1975). L'absence de la myéloperoxidase est confirmée par l'utilisation de méthodes cytochimiques (Brune et al., 1972). Les granules cytoplasmiques de petite taille sont isolés après homogénéisation des hétérophiles issus de l'exsudat péritonéal et centrifugation en gradient de densité de sucrose. L'extrait brut acide des granules de grande taille contient le lysozyme et des protéines cationiques avec un effet antibactérien à des concentrations de 20-35 µg/ml contre *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, et *Staphylococcus albus* (Brune et Spitznagel, 1973).

En 1972, Topp et Carlson montrent pour la première fois par des réactions histochimiques que les granules des hétérophiles contiennent la β-glucuronidase et la phosphatase acide (Topp et Carlson, 1972b) mais manquent de phosphatase alcaline (Caxton-Martins et Daimon, 1976).

Par conséquent, l'activité antimicrobienne des hétérophiles aviaires découle principalement des mécanismes indépendants de l'oxygène (Evans et al., 1995; Brune et Spitznagel, 1973 ; Harmon, 1998) et contrairement aux neutrophiles des mammifères, la réponse oxydative des hétérophiles est très faible proportionnellement à l'explosion respiratoire des neutrophiles (Conlon, 1991) (tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison entre le contenu des granules des hétérophiles aviaires et des neutrophiles humains (Harmon, 1998)*

produit des granules	neutrophile humain	hétérophile aviaire
myéloperoxidase	+	-
défensines	+	-
β -défensines	-	+
cathepsine	+	+
lysozyme	+	+
catalase	+	-
phosphatase acide	+	+
phosphatase alcaline	+	-
β-glucuronidase	+	+
α-glucosidase	+	+

(*) +: Présent; -: absent

3.4. Granules cytoplasmiques:

Trois classes de granules ont été décrites par Brune et Spitznagel en 1973 après homogénéisation et centrifugation sur gradient de densité des polymorphonucléaires du poulet isolés à partir d'exsudats péritonéaux (figure 5, 6):

- Les plus grands (1 - 3 μm) : en forme de bâtonnets, dense aux électrons, contiennent le lysozyme et au moins trois autres protéines cationiques.
- La deuxième classe (0,3 - 0,9 μm) : granules plus sphériques et de taille moyenne.
- Les plus petits granules (0,1 - 0,2 μm) (Latimer et Bienzel, 2000; Brune et Spitznagel, 1973).

Le pourcentage des granules cytoplasmiques des hétérophiles est le suivant :

- les granules de grande taille représentent 48,3%
- les granules de taille moyenne représentent uniquement 24,7%
- les granules de petite taille 27% (Daimon et Caxton-Martins, 1977)

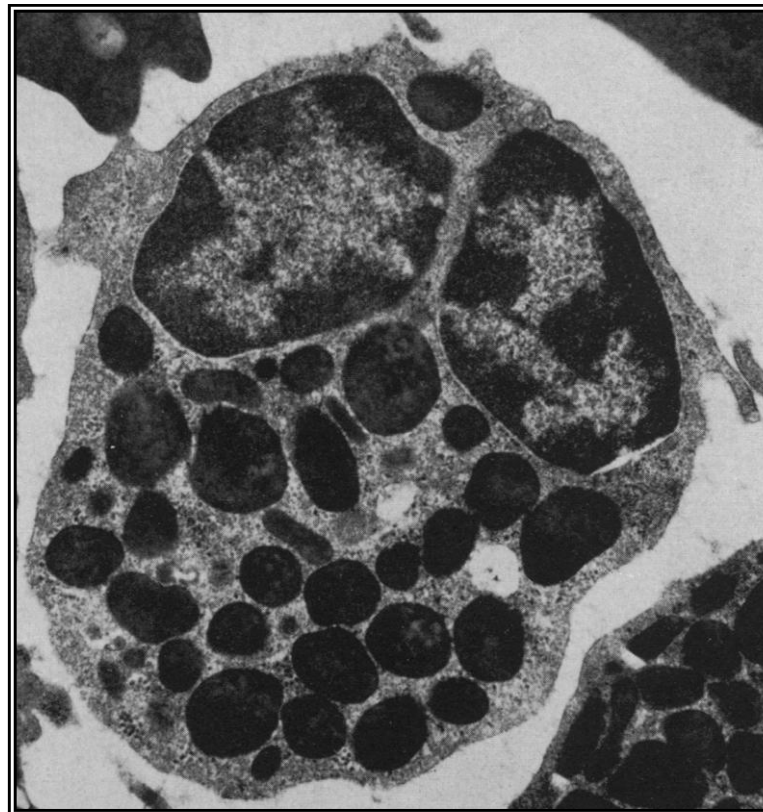


Figure 5: Hétérophile normal séparé du sang périphérique de la dinde. Le noyau est bilobé et les granules cytoplasmiques sont polymorphiques. X 19,800 (Topp et Carlson, 1972c)

La présence des protéines cationiques riches en arginine dans les granules de grande taille des leucocytes polymorphonucléaires du poulet (hétérophiles) a été approuvée par Macrae et Spitznagel en 1975 en utilisant la réaction de l'argent ammoniacal qui donne un marqueur cytochimique détectable sous le microscope électronique. Les autres plus petits granules sont dépourvus de produit de la réaction, comme la membrane et les mitochondries. Aussi les protéines cationiques riches en arginine ont été identifiées dans les grands granules azurophiliques sphériques des neutrophiles chez le lapin (Macrae et Spitznagel, 1975).

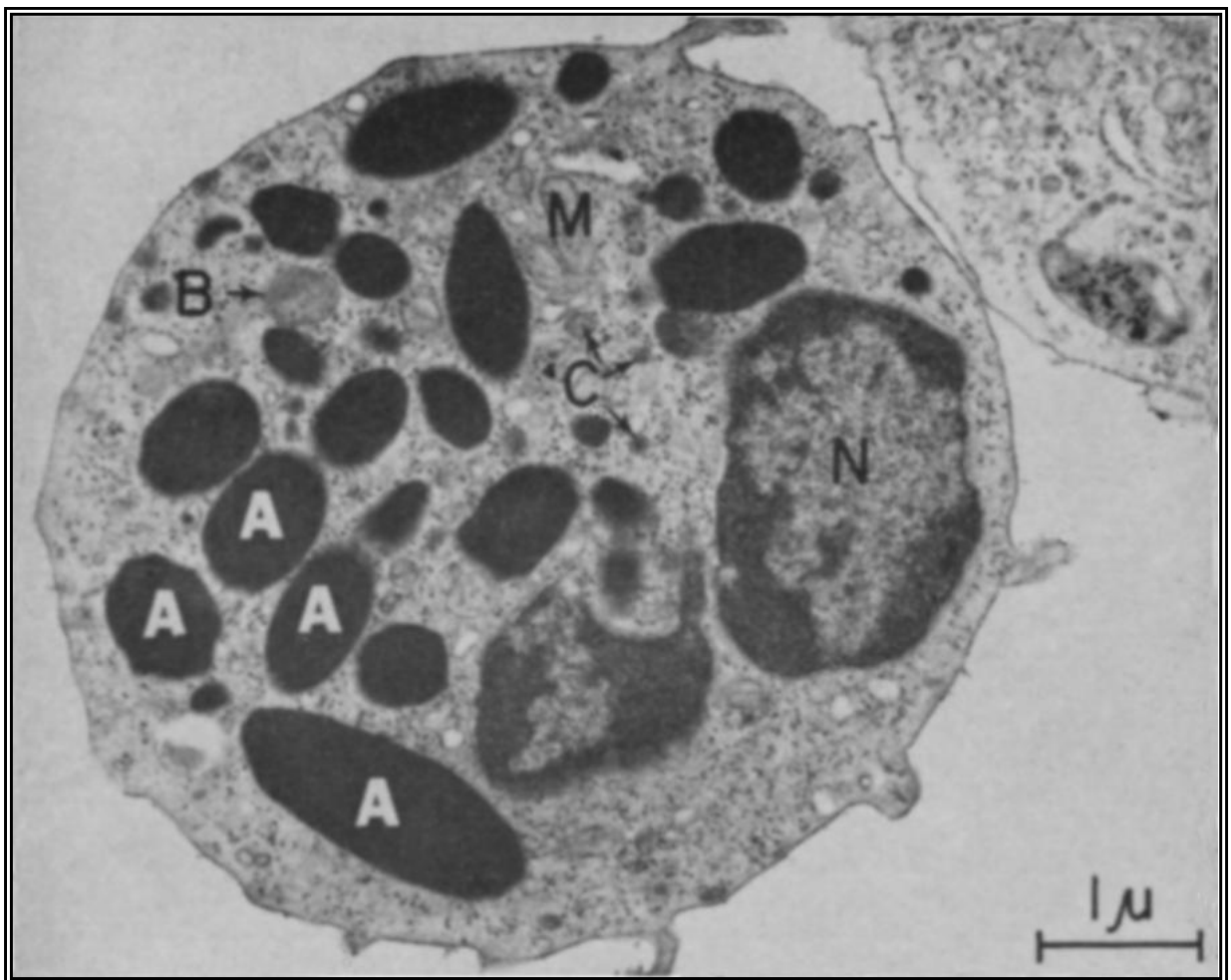


Figure 6: Hétérophile du poulet au microscope électronique. N = noyau; M = mitochondrie; A = granules de grande taille; B = granules intermédiaires; C = granules de petite taille (Brune et Spitznagel, 1973).

3.4.1. Biogenèse des granules

En général, les granules sont formés par agrégation des vésicules immatures du transport issues par bourgeonnement à partir du réseau de la face trans de l'appareil de Golgi (trans-Golgi network TGN) (figure 7) dans lequel le tri a lieu entre des protéines sécrétées et les protéines qui sont acheminées aux granules (Borregaard et Cowland, 1997).

Les granules azurophiliques des neutrophiles humains apparaissent en premier à l'étape de promyélocytes et contiennent de la myéloperoxidase, des sérines protéases, et des protéines avec une activité antibactérienne. Les granules azurophiliques sont donc considérées comme le compartiment microbicide vrai et qui est mobilisé lors de la phagocytose.

Les granules spécifiques qui contiennent la lactoferrine et la collagénase émergent à l'étape du métamyélocyte suivi par la population des granules tertiaires qui contiennent la gélatinase. Un quatrième type de granules, appelé les vésicules sécrétoires, apparaissent à l'étape de neutrophile mûr, leur origine peut être par endocytose, parce qu'ils contiennent des protéines plasmatiques comme l'albumine (Witko-sarsat et al., 2000).

Cependant des études ont montré que la compartimentalisation n'est pas un dogme, ainsi Witko-sarsat et son équipe en 1999 ont montré l'existence de la protéinase 3 dans les vésicules sécrétoires; cette substance est précédemment décrite dans les granules azurophiliques (Witko-sarsat et al., 1999).

Un aspect nouveau de la physiologie des granules est introduit par la découverte que ces organelles de stockage réglé ne sont pas de simples sacs de protéines protéolytiques ou bactéricides, mais aussi des réservoirs importants de protéines membranaires qui sont incorporées à la surface de la membrane des neutrophiles quand ces organelles se fusionnent avec la membrane plasmatique et excrètent leur contenu par exocytose. Donc les granules et les vésicules sécrétoires peuvent changer radicalement la capacité d'interaction du neutrophile avec son environnement (Borregaard et Cowland, 1997).

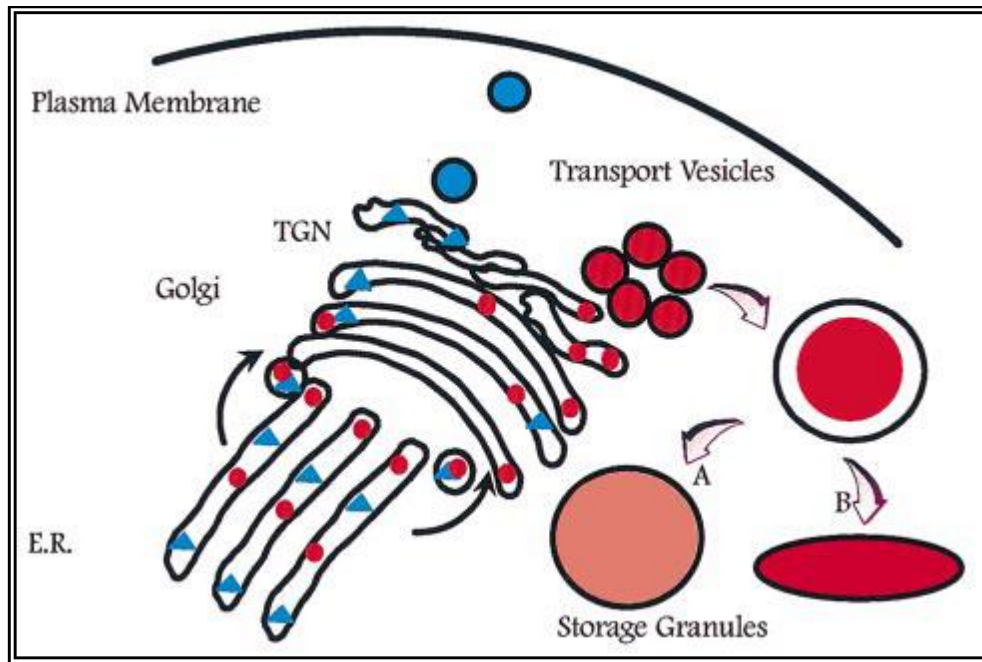


Figure 7 : Itinéraire intracellulaire des protéines néosynthétisées (Borregaard et Cowland, 1997) E.R.: endoplasmic reticulum TGN: trans-Golgi network

3.4.2. Dégranulation:

La stimulation des polymorphonucléaires humains par l'acétate de myristate de phorbol et le zymosan opsonisé provoque la libération des défensines antimicrobiennes (Ganz, 1987). Le mécanisme de la libération de ces substances est du à l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire. La concentration du Ca^{2+} est connue pour déclencher l'exocytose des granules de stockage dans une variété de cellules. Les différences de la sensibilité vis à vis du Ca^{2+} intracellulaire comme un signal pour provoquer la mobilisation sont observées parmi les sous-ensembles des granules différents et vésicules sécrétoires (Borregaard et Cowland, 1997).

Il est actuellement évident que les bactéries probiotiques peuvent significativement améliorer la dégranulation des hétérophiles chez les poulets de chair (Farnell et al., 2006).

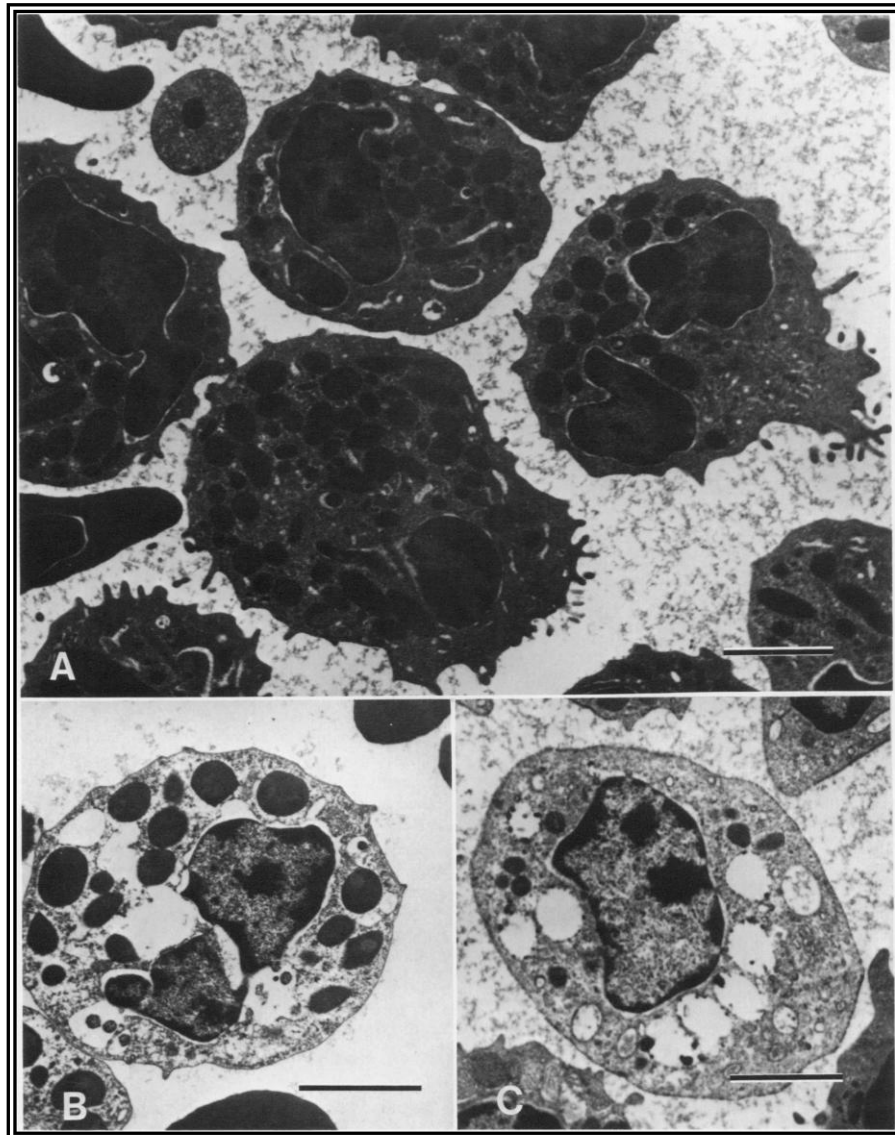


Figure 8: Aspect des hétérophiles témoins et toxiques au microscope électronique (Latimer et al., 1988). A) hétérophiles témoins avec une hétérochromatine en agrégats et des granules homogènes, attachés à la membrane. Barre = 2 μm . B) hétérophile toxique avec bourgeonnements de la membrane nucléaire, œdème intracytoplasmique, et dissolution précoce des granules. Barre = 3 μm . C) hétérophile toxique en stade avancé, œdème intracytoplasmique marqué et dégranulation sévère. Barre = 1,5 μm .

3.5. Rôle dans l'immunité:

La réponse du corps à l'invasion microbienne et les événements qui s'ensuivent durant les premières heures sont cruciaux pour déterminer le sort de l'infection (Namavar et al., 1984). En effet, c'est le système immunitaire inné qui est mis en jeu et qui correspond à la première ligne de défense de l'hôte qui sert à limiter l'infection durant les premières heures après l'exposition aux microorganismes (Hoffmann et al., 1999).

Le neutrophile est un effecteur cellulaire central du système immunitaire inné dont l'importance à la défense de l'hôte se manifeste par la fréquence élevée et la sévérité des infections chez les sujets ayant des problèmes avec la quantité ou la qualité des neutrophiles (Levy, 2000a). Les mécanismes bactéricides des neutrophiles chez les mammifères sont formés de plusieurs composants avec des propriétés chimiques différentes, impliquant des protéines, des peptides et des radicaux dépendants de l'oxygène (figure 9) (Hoffmann et al., 1999).

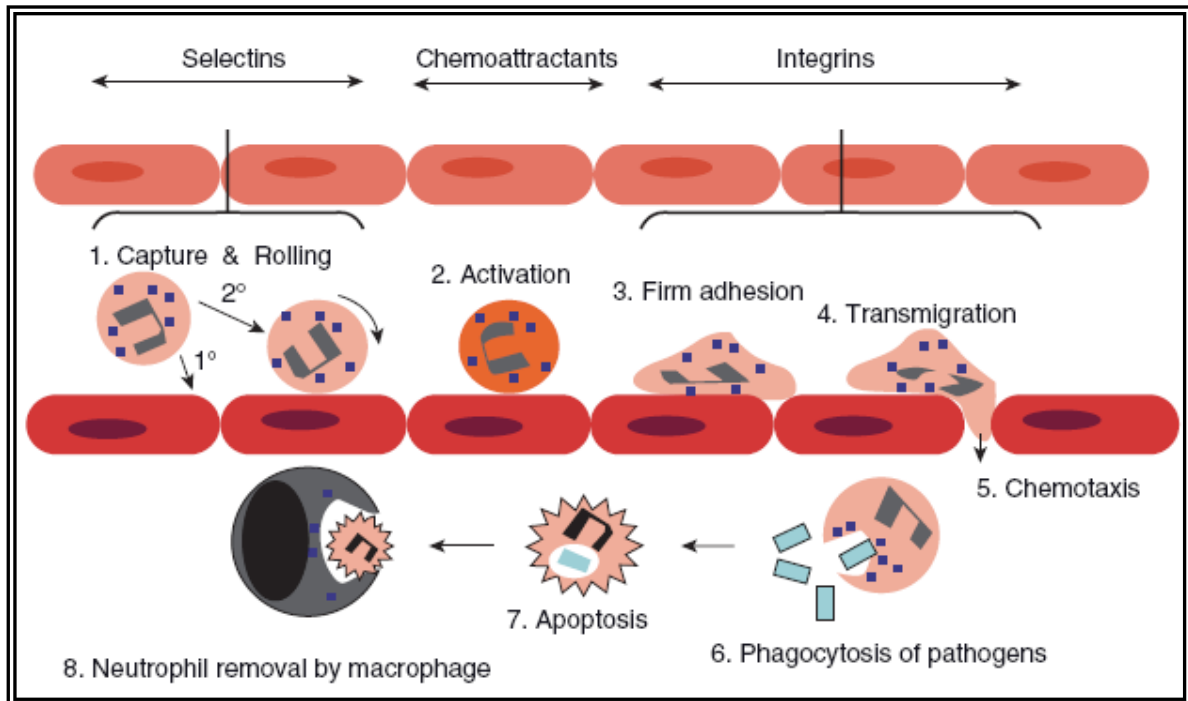


Figure 9 : L'activité antimicrobienne des neutrophiles est un processus multi-étapes (Weiss et al., 2010).

3.5.1. Mécanismes dépendants de l'oxygène:

Les dérivés actifs de l'oxygène (superoxydes, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, oxygène singulet) générés durant l'explosion respiratoire des leucocytes polymorphonucléaires sont essentiels pour tuer certaines bactéries ingérées (tableau 2) (Nagahata et al., 1986 ; Hirabayashi et al., 1985). Les neutrophiles sanguins du rat libèrent une quantité élevée du peroxyde d'hydrogène suite à l'exposition aux particules de zymosan opsonisées (Biggar et Sturgess, 1978).

Tableau 2: Les propriétés des espèces réactives de l'oxygène (Hampton et al., 1998).

Superoxyde	Oxydant modéré et réducteur avec activité biologique limitée; permet la production du radical hydroxyle en réduisant des complexes de fer, perméabilité membranaire limitée
Peroxyde d'hydrogène	Oxyder l'agent; réagit lentement avec les agents réducteurs comme les thiols, permet au radical hydroxyle de réagir avec les protéines de l'hème et la peroxydase pour commencer des réactions radicales et la peroxydation des lipides; membrane perméable.
Radical Hydroxyle	Extrêmement réactif et peut attaquer la plupart des molécules biologiques; provoque des modifications d'ADN, inactivation d'enzymes, peroxydation des lipides.
Oxygène singulet	A l'état excité, l'oxygène réagit avec plusieurs molécules biologiques, y compris les lipides de la membrane pour commencer la peroxydation
Acide hypochloreux (HOCl)	oxydant non-radical puissant d'une grande gamme de composés biologiques, l'oxydant le plus bactéricide connu pour être produit par le neutrophile
Chloramines	oxydants plus modérées et plus de longévité que HOCl
Oxyde nitrique	Réagit très rapidement avec le superoxyde pour donner le peroxydinitrite, forme des complexes avec les protéines de l'hème.
Peroxydinitrite	Oxydant instable, durée de vie courte avec des propriétés semblables au radical hydroxyle

Les oxydants issus de l'explosion respiratoire constituent un composant important de la réponse immunitaire innée et leur absence provoque des infections récurrentes comme celles observées chez des individus souffrant de la maladie granulomateuse chronique (M.G.C), un désordre génétique dans lequel il y a un dysfonctionnement de la NADPH oxydase (figure 10) (Hampton et al., 1998 ; Dinauer et al., 2000).

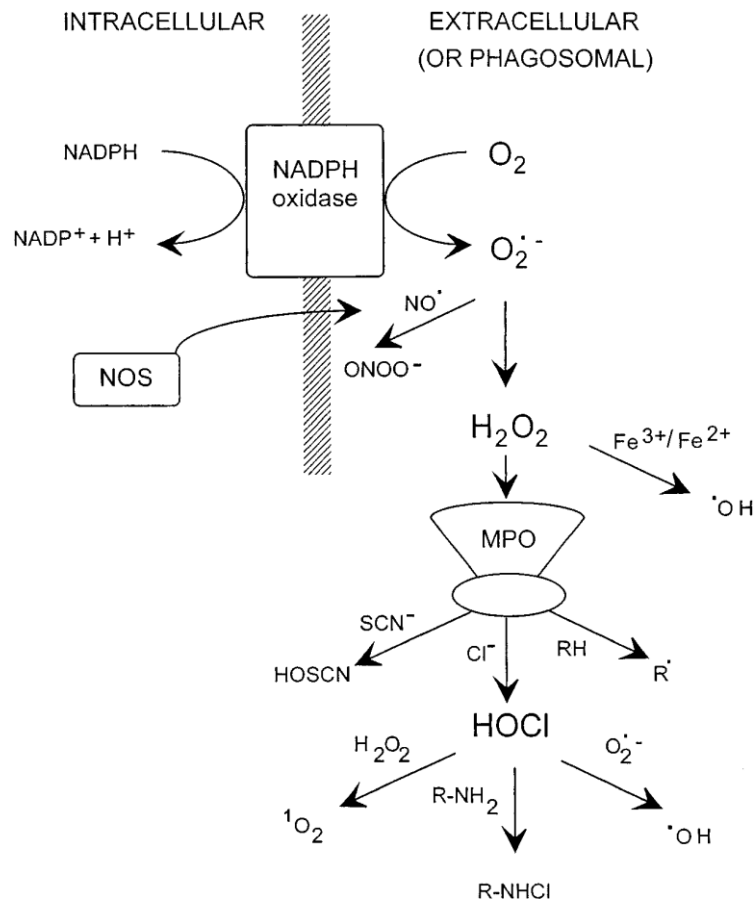


Figure 10: Représentation schématique des réactions d'oxydation (Hampton et al., 1998).

3.5.2. Mécanismes indépendants de l'oxygène :

L'activité antimicrobienne des leucocytes polymorphonucléaires contre certaines bactéries et champignons dans des conditions d'anaérobiose et dans certaines maladies, où leur capacité de produire les espèces réactives de l'oxygène est complètement anéantie, (Vel et al., 1984; Ingham et al., 1981; Mandell, 1974; Mambula et al., 2000). Cette activité antimicrobienne non-oxydative a été observée chez les macrophages alvéolaires et péritonéaux de l'être humain contre un parasite intracellulaire (*Toxoplasma gondii*) (Catterall et al., 1987).

De même, l'extrait brut des leucocytes polymorphonucléaires montre une activité antibactérienne (Walton, 1978). Des fractions de granules issus d'homogénats cellulaires des leucocytes polymorphonucléaires montrent une activité antibactérienne apparente (Zeya et Spitznagel, 1966a; Zeya et Spitznagel, 1966b; Odeberg et Olssen, 1975; Weiss et al., 1978 ; Hodinka et Modrzakowski, 1983).

Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes autres que ceux dépendants de l'oxygène, ces mécanismes peuvent être d'un intérêt capital dans l'activité antimicrobienne contre certaines bactéries et champignons. Plusieurs études et investigations ont été menées

pour purifier et étudier les molécules responsables de cette activité antimicrobienne indépendante de l'oxygène.

Les molécules des neutrophiles, avec une activité antimicrobienne indépendante de l'oxygène, sont libérées par dégranulation dans le liquide extracellulaire où elles exercent leur activité, ou sont largement dégranulées dans le phagosome exposant ainsi les microorganismes ingérés à des concentrations élevées du contenu granulaire (tableau 3). Finalement, les composants du cytosol du neutrophile, avec une activité antimicrobienne, peuvent être libérées par "sécrétion holocrine" dans les liquides inflammatoires suite à la mort des neutrophiles (Levy, 2000a ; Levy, 2000b).

Tableau 3 : Les protéines et les peptides antimicrobiens des neutrophiles (Levy, 2000b)

Protéines et peptides	P.M. (kDa)	Granules des Neutrophiles	Expression Epithéliale / muqueuse	Activité	Mécanisme
Lactoferrine	80	2 ⁰	Br, Tr, SL, BAL	B [±] , F, EV	Fixation du fer
BPI	55	1 ⁰	?	B ⁻	Fixe le lipide A du LPS
Serprocidines	~30	1 ⁰	?	B [±] , F, m, M	Protéolyse
Cathélicidines	10-20	2 ⁰	Kr, Ts	B [±] , F	Libération de peptides
Lysozyme	14,5	1 ⁰ & 2 ⁰	Br, Tr, Gs	B ⁺ , F	Lyse de peptidoglycane /
Phospholipase	14	granule !	Foie (APR), Int	B ⁺	Lyse des phospholipides bactériens
Défensines	4	1 ⁰	Pul, R, Int, Ug	B [±] , F, EV, m, M	Formation de pores voltage dépendants/ pores multimériques

P.M. : poids moléculaire ; 1⁰ : indique primaire; 2⁰ : secondaire ; APR: réactif durant la phase aigüe; BAL: liquide du lavage bronchoalvéolaire; Br: lait maternel; Gs: sécrétions gastriques, Int: intestinal (cellules de Paneth); Kr: kératinocytes; SL: salive; Tr: larmes; Ts: testicules; Ug: tissus urogénitaux; B: bactéries (+ et - réfèrent à la coloration Gram); F: champignons; m: parasites métazoaires; M: cellules mammifères; Ev: virus enveloppés. LPS : lipopolysaccharide ; Pul : pulmonaire.

3.5.2.1. La lactoferrine :

C'est une protéine de 80 kDa avec deux sites de fixation pour le fer. Elle se trouve aussi bien dans les granules des neutrophiles que dans les sécrétions du corps comme le lait, les larmes, la salive...etc. (Levy, 1996; Levy, 2000b). La concentration de la lactoferrine augmente d'une façon remarquable durant l'inflammation de la glande mammaire des bovins provoquée par des endotoxines (Harmon et Newbould, 1980). Actuellement utilisé comme supplément dans la nutrition, elle peut libérer des peptides actifs capables d'atteindre le tractus gastro-intestinal inférieur (Hancock et Chapple, 1999).

3.5.2.2. La BPI (Bactericidal / permeability-increasing protein):

Protéine bactéricide/accroissant la perméabilité, de nature cationique avec un poids moléculaire de 55 kDa, elle existe dans les granules des neutrophiles humains et a été détectée aussi à la surface cellulaire (Levy, 2000b). Les nouveau-nés ont une concentration très faible (3 à 4 fois) de la BPI intracellulaire que les neutrophiles des adultes (Levy, 2002a ; Levy, 2002b). La fixation de la BPI à des bactéries à Gram négatif provoque l'inhibition de la croissance et joue le rôle d'une opsonine qui augmente la phagocytose des bactéries, cette molécule est douée d'un pouvoir anti-endotoxinique contre une gamme assez large de bactéries à Gram négatif pathogènes (Levy, 2002b).

3.5.2.3. Les serprocidines:

Ce sont des sérine-protéases; cette famille inclut l'élastase des neutrophiles, la cathepsine G, la protéinase 3 et l'azurocidine / CAP 37 qui expriment une activité bactéricide (Gougerot-Pocidalò, 2002).

3.5.2.4. Les cathélicidines:

Les cathélicidines sont des peptides antimicrobiens de 10 à 20 kDa et qui sont isolées à partir des neutrophiles des mammifères (homme, porc et cobaye) (Nagaoka et al., 2000). Ces cathélicidines sont stockées sous forme inactive (propeptides) dans les granules sécrétoires des neutrophiles (Skerlavaj et al., 2001).

Le peptide LL-37 est isolé des neutrophiles humains, mais a été trouvé par la suite dans les cellules épithéliales de la peau, le poumon et au niveau de l'intestin (Agerberth et al., 2000; Agerberth et al., 1999). Les propriétés antimicrobiennes et le large spectre d'activité de LL-37 ainsi que sa présence dans les neutrophiles, le poumon et son indicibilité dans l'épithélium

cutané (kératinocytes) durant l'inflammation suggèrent que ce peptide et son précurseur (hCAP18) (19kDa) peuvent avoir un rôle protecteur dans la peau et autres tissus contre les microorganismes envahissants (Turner et al., 1998; Agerberth et al., 1999).

La protégrine - 1 (PG 1), peptide avec 18 résidus riche en cystéine a été isolé des leucocytes porcins, avec un large spectre d'activité antimicrobienne, sa concentration minimale inhibitrice (CMI) contre des bactéries à Gram négatif et à Gram positif varie de 0,12 à 2 µg/ml et il a été signalé que la protégrine-1 a des potentialités pour usage comme un agent antimicrobien dans le traitement d'infections locales ou systémiques (Steinberg et al., 1997).

Chez les chevaux, Scocchi et al., 1999 ont décrit trois nouvelles cathélicidines par déduction à partir de l'ADNc myéloïde, deux polypeptides correspondants sont détectés et nommés e-CATH-2 et e-CATH-3 dans les neutrophiles du cheval (Skerlavaj et al., 2001). Un autre peptide cathélicidine antibactérien et fongicide fort appelé SMAP-29 a été identifié dans les leucocytes du mouton et il est très actif contre des souches bactériennes cliniques très résistantes aux antibiotiques incluant les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et des entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) (Skerlavaj et al., 1999).

Chez le poulet, quatre cathélicidines sont identifiées et nommées chCATH-1 (fowlicidin1), chCATH-2 (fowlicidin2), chCATH-3 (fowlicidin3) et chCATH-B1 (fowlicidin B1) (Goitsuka et al, 2007)

3.5.2.5. Le lysozyme:

C'est une enzyme cationique avec 14 kDa de poids moléculaire, entreposé dans les granules primaires et secondaires des neutrophiles, il existe aussi dans les larmes et les sécrétions gastriques. Cette enzyme a une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif avec un peptidoglycane ayant des liaisons croisées moindres qui sont généralement non-pathogènes. Les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes à l'action du lysozyme en raison de leur membrane externe hydrophobe (Levy, 2000b ; Levy, 1996). Le lysozyme a une action synergétique antibactérienne avec la lactoferrine (Singh et al., 2000) et la β -défensine humaine-2 (hBD-2) (Bals et al., 1998b).

3.5.2.6. Les phospholipases A2: (PLA2)

Ce sont des enzymes riches en ponts disulfures dont le poids moléculaire est de 14 kDa et qui existent dans les granules des neutrophiles, macrophages, dans les cellules de Paneth des muridés, le liquide inflammatoire de l'ascite chez le lapin, les larmes...etc. Elles sont aussi libérées par le foie dans le plasma comme réactifs durant la phase aiguë de la réaction inflammatoire. Il a été montré que les PLA2 fonctionnent comme des microbicides primaires actifs contre les bactéries à Gram positif (Levy, 1996; Levy, 2000b).

Les phospholipases sécrétoires A2 représentent le constituant bactéricide principal des larmes humaines et la défense de la cornée, qui manque de vaisseaux sanguins, dépend principalement de ces substances qui existent dans le film des larmes (Qu et Lehrer, 1998).

3.5.2.7. La calprotectine:

Elle est formée de deux protéines anioniques membres de la famille S-100 des protéines liant le calcium de 8 et 14 kDa (P8 ou MPR-8 , et P14 ou MPR-14) (Levy, 1996). Le complexe calprotectine représente approximativement 30% des protéines cytosoliques totales et manifeste une activité antimicrobienne de l'ordre de $\mu\text{mol/L}$ contre les bactéries et les champignons par chélation du zinc (Levy, 2000b).

3.5.2.8. Défensines:

Elles sont abondantes dans les phagocytes et la muqueuse de l'intestin grêle de l'être humain et des autres mammifères et aussi dans l'hémolymphe des insectes (Ganz et Lehrer, 1995). C'est le groupe le plus étudié des PAC et revêt un intérêt capital à cause de leur activité antimicrobienne remarquable ; ces défensines sont actives contre les bactéries, les cellules fongiques et les virus enveloppés (Risso, 2000).

Les défensines sont considérées comme des antibiotiques endogènes avec un rôle clé dans les défenses de l'hôte au niveau des muqueuses comme celles des voies respiratoires. L'inhibition de l'activité des β -défensines, suite à l'augmentation de la concentration saline du mucus, est observée lors de la mucoviscidose (maladie génétique) et qui se traduit par l'incapacité à s'en débarrasser efficacement de l'infection (Bals et al, 1999).

- **Historique :**

Durant des siècles, la peau de la grenouille a été utilisée pour des fins médicales et elle est encore utilisée dans les pays d'Amérique du Sud. En 1962, Kiss et Michl notent la présence de peptides antimicrobiens hémolytiques dans les sécrétions cutanées de *Bombina variegata* et un peptide antimicrobien de 24 acides aminés a été isolé et appelé "bombinine". Un autre peptide "la militine" avec des activités antimicrobiennes et hémolytiques, a été isolé en 1972 à partir du venin d'abeille est devenue la base de recherches étendues sur la structure et le mécanisme d'action de ce type de PAC, mais l'activité hémolytique de la militine a empêché son exploitation comme un nouveau composé antimicrobien (Hancock et Chapple, 1999)

Chez les mammifères beaucoup d'études ont décrit l'activité bactéricide des fractions purifiées à partir des leucocytes polymorphonucléaires. En 1966, Zeya et Spitznagel, sont les pionniers à ouvrir un nouveau champ de recherche par leurs études sur les leucocytes polymorphonucléaires du cobaye (Zeya et Spitznagel, 1966a; Zeya et Spitznagel, 1966b).

C'est en 1983 que la purification des premiers peptides antibactériens des mammifères a eu lieu par Selsted et son équipe à partir des macrophages pulmonaires du lapin et leur séquence en acides aminés a été révélée, ces peptides sont riches en arginine et en cystéine et manquent de groupements sulfhydryles libres et de carbohydrates détectables.

- **Structure:**

Les PAC possèdent généralement deux à neuf acides aminés positivement chargés en excès (arginine ou lysine) (Hancock et Chapple, 1999). Ces peptides sont chargés positivement à un pH neutre et ils ont une charge positive nette d'au moins +2 et habituellement 4, 5 ou 6. Ces peptides avec une structure en trois dimensions comprenant une face hydrophobe avec les chaînes latérales d'acides aminés non polaires et une face hydrophile de résidus polaires et résidus chargés positivement (molécules amphipathiques). (Hancock, 1997)

La famille des défensines représente une classe de petits PAC (29-35 acides aminés) riches en arginine et en cystéine (Hancock et al., 1995). Les α -défensines sont caractérisés par la présence de 6 résidus constants de cystéine avec la présence de trois ponts disulfures (Hancock et al., 1995 ; Levy, 2000a). Les β - défensines possèdent 36-42 acides aminés avec un arrangement spécial des ponts disulfures différent de celui des α -défensines 1-5, 2-4 et 3-6 (Bals, 2000).

3.5.3. Autres mécanismes :

Les neutrophiles utilisent plusieurs stratégies de défense pour protéger l'organisme contre l'invasion des microorganismes, un nouveau mécanisme de défense est récemment mis en évidence et qui consiste à attraper les agents pathogènes dans leurs filets extracellulaires (Gougerot-Pocidalò et al., 2007 ; Brinkmann et al., 2004 ; Gupta et al., 2006 ; Kumar et Sharma, 2010). Ces filets tueurs (Neutrophil Extracellular Traps (NETs) sont formés par un réseau de filaments extracellulaires composés d'ADN, d'histones et de protéines comme l'élastase, la cathepsine G, la lactoferrine et la gélatinase, issues des granulations cytoplasmiques primaires et secondaires (Brinkmann et al., 2004). Ce système de défense a été récemment observé chez les hétérophiles et appelé heterophil extracellular traps (HETs) (Chuammitri et al., 2009)

Des études immunohistochimiques récentes montrent la présence de cathélicidine-2 dans les granulations cytoplasmiques en forme de bâtonnets et les hétérophiles libèrent cette substance suite à leurs stimulations (Van Dijk, 2009)

3.6. Les peptides cationiques antimicrobiens :

3.6.1. Classification:

La classification des PAC des leucocytes est basée sur la structure et principalement sur la présence ou l'absence de ponts disulfures intramoléculaires (figure 11):

3.6.1.1. Première classe:

Cette classe regroupe les peptides antimicrobiens sans ponts disulfures, deux groupes ont été identifiés (Risso, 2000) :

- **Le premier groupe:** comporte les peptides linéaires, principalement les peptides α -hélicoïdaux sans ponts disulfures, comme la LL-37 humaine / hCAP-18 (Gudmundsson et al. 1996) et il comporte aussi les peptides cathélicidines équins appelés eCATH-1, eCATH-2 et -3 (Skerlavaj et al., 2001) et SMAP-29, peptide antibactérien isolé des leucocytes du mouton avec 29 résidus d'acides aminés (Skerlavaj et al., 1999).

- **Le deuxième groupe:** comprend les peptides sans ponts disulfures et avec une proportion exceptionnellement élevée d'un ou de deux acides aminés comme la PR 39 des leucocytes du porc (Bals, 2000). Les deux bacténécines, Bac5 et Bac7 caractérisés par une proportion élevée des résidus de proline et d'arginine (Frank et al., 1990). Les histatines

salivaires forment une famille de peptides riches en histidine avec une activité fongicide *in vitro* puissante (Edgerton et al., 2000).

3.6.1.2. Deuxième classe:

Dans cette classe on trouve les PAC avec au moins un pont disulfure. Il existe relativement peu de peptides avec un ou deux ponts disulfures (Risso, 2000). Trois groupes sont identifiés suivant le nombre des ponts disulfures intramoléculaires :

- **Le premier groupe:** avec un seul pont disulfure, comme la bactenecine ; peptide maintenu dans une structure cyclique par un pont disulfure entre les deux résidus du cystéine (Romeo et al., 1988).

- **Le deuxième groupe :** les protégrines (PG-1, -2, et -3) isolées des neutrophiles porcins font partie de ce groupe (Panyutich et al., 1997) avec la présence de deux ponts cystine (Hancock et Diamond, 2000).

- **Le troisième groupe :** regroupe les peptides avec trois ponts disulfures, la famille des défensines avec leurs deux sous-familles désignées α - et β -défensines appartiennent à ce groupe (Risso, 2000). Les α - défensines sont absentes au niveau des hétérophiles aviaires alors que les β -défensines sont présentes contrairement aux neutrophiles humains qui manquent de β -défensines (Harmon, 1998).

Linear peptides without cysteine	
Cecropin A (<i>Hyalophora cecropia</i>)	KW--KLFKKI EKVGQNIRDG IIKAGPAVAV VGQATQIAK*
Cecropin P1 (pig)	SWLSKTAKKL ENSAK-KR-- -ISEGIAIAI QGGPR
Bombinin BLP-3 (<i>Bombina orientalis</i>)	GIGAAIISAG KSALKGLAKG LAEHF*
Temporin B (<i>Rana temporaria</i>)	LLPIVGNLLK SLL*
Peptides with an even number of intralinked cysteines	
Brevinin 2E (<i>Rana esculenta</i>)	GIMDTLKNLA KTAGKGALQS LLNKASCKLS GQC
Brevinin 2T (<i>Rana temporaria</i>)	GLLSGLKKVG KHVAKNVAVS LMDSLKCKIS GDC
α -Defensin HNP-1 (human)	ACYCRIPAC IAGERRYGTC IYQGRWAF C
α -Defensin NP-1 (rabbit)	VVCACRRALC LPRERRAGFC RIRGRIHPLC CRR
β -Defensin TAP (cow)	NPVSCVRNKG ICVPIRCPGS MKQIGTCVGR RAVKCCRKK
β -Defensin 1 (human)	DHYNCVSSGG QCLYSACPIF TKIQGTCYRG KA-KCKK
Peptides with a high proportion of one or two amino acids	
PR-39 (pig)	RRRPRPPYLP RPRPPFFFP RLPPRIPPGF PPRFPPRF*
Bac5 (cow)	RFRPPIRRPP IRPPFYPPFR PPIRPPIFPP IRPPFRPPLG PFP*
Indolicidin (cow)	ILPWKWPWWP WRR*

Figure 11: Séquences des peptides antibiotiques représentatives des trois superfamilles (Barra et al., 1998).

Un nouveau peptide de la famille des défensines a été identifié et isolé à partir des leucocytes de macaque (rhésus macaque), nommé rhésus thêta (θ) défensine-1 (RTD-1) avec 18 acides aminés et la présence de trois ponts disulfures. Ce peptide a une forme cyclique et constitue une nouvelle sous-famille des défensines (Tang et al., 1999).

3.6.2. Distribution:

3.6.2.1. Chez l'homme et les primates:

Les peptides antimicrobiens cationiques existent pratiquement chez tous les êtres vivants, un animal seul peut avoir plus de 24 peptides antimicrobiens différents (Hancock et Diamond, 2000). Les peptides antimicrobiens ont tendance à être trouvés dans les parties du corps les plus exposées aux infections. Ils se trouvent sur la peau, l'oreille, l'œil et à la surface des

épithéliums tels que la langue, la trachée, les poumons et les intestins (Hancock et Scott, 2000).

Les défensines ont été isolées chez les êtres humains et chez beaucoup d'espèces. Les premières défensines isolées et caractérisées sont celles des macrophages pulmonaires du lapin et nommés MCP-1 et MCP-2 (Selsted et al., 1983).

Six autres peptides antimicrobiens cationiques ont été purifiés à partir des granulocytes du lapin. Chaque peptide a un poids moléculaire approximatif de 4000 Da, ces peptides ont été nommés d'après leur mobilité cationique sur gel de polyacrylamide traité à l'acide et à l'urée comme suit : NP-1 et NP-2 sont les peptides les plus cationiques suivis par NP-3A, NP-3B, NP-4, NP-5 (Selsted et al., 1984). Ces peptides sont riches en cystéine et arginine avec la présence de trois ponts disulfures intramoléculaires et ils ont 32-34 acides aminés (Selsted et al., 1985).

Chez l'être humain, les premières défensines ont été purifiées en 1985 par Ganz et ses collaborateurs et trois peptides antimicrobiens cationiques ont été isolés d'un extrait acide de granulocytes neutrophiles avec un faible poids moléculaire (<3500 Da). Ces peptides ont été considérés comme des antibiotiques naturels et nommés "human neutrophil peptide" HNP-1, HNP-2, et HNP-3, plus tard connus sous le nom de défensines "Defensins" (Ganz et al., 1985). Ils possèdent une longueur de 29-30 résidus d'acides aminés avec une séquence identique à l'exception des résidus N-terminal. Les défensines humaines ont une séquence homologue à celle des peptides antimicrobiens des neutrophiles du lapin et 11 résidus d'acides aminés des défensines humaines (les six résidus de cystéine sont inclus) sont conservés dans les six peptides du lapin (Selsted et al., 1985).

Un autre peptide antimicrobien a été purifié et caractérisé à partir des neutrophiles humains ; ce peptide appartenant à la famille des défensines avec une structure qui ressemble à celle des défensines, a été nommé "human neutrophil peptide 4" (HNP-4), avec un poids moléculaire de 3715 Da (Wilde et al., 1989).

Les PAC existent aussi dans l'appareil digestif et jouent un rôle fondamental dans les défenses non spécifiques. Les cellules de Paneth chez l'être humain, comme celles de la souris, expriment une collection de protéines antimicrobiennes y compris les défensines, deux isoformes de la famille des défensines humaines ont été détectés dans l'intestin grêle humain : HD-5 et HD-6 (Mallow et al., 1996).

Des défensines, soit α ou β existent à la surface oculaire humaine (conjonctive, cornée et glande lacrymale) et participent dans les défenses non spécifiques de l'œil (Haynes et al., 1999 ; Lehmann et al., 2000).

La β -défensine -1 (HBD-1) mRNA, code pour le peptide antimicrobien HBD-1 qui possède un large spectre d'activité, a été isolée dans la membrane du tympan et l'épithélium du canal auditif adjacent en utilisant la RT-PCR (Bøe et al., 1999). Ce même peptide (HBD-1) existe dans le lait maternel avec des concentrations allant d'environ 1 à 10 $\mu\text{g/ml}$ et son expression a été observée pendant l'allaitement dans l'épithélium de la glande mammaire et dans les sécrétions intraluminales (Jia et al., 2001b).

Un troisième peptide antimicrobien cationique appartenant à la sous-famille des β -défensines appelé HBD-3 avec un poids moléculaire de 5 kDa et non hémolytique a été isolé des lésions de psoriasis avec une expression notable au niveau de la peau et les amygdales (Harder et al., 2001) ainsi que le gène qui code pour ce peptide a été identifié (Jia et al., 2001a).

En plus des localisations suscitées, des défensines ont été détectées, par l'utilisation de techniques compliquées, dans le noyau des lymphocytes du sang périphérique humain; un mélange de peptides HNP1, HNP2 et HNP3 a été trouvé (Blomqvist et al., 1999). Les leucocytes humains (T et NK) possèdent les α -défensines (HNP 1-3), et un peptide avec une structure en hélice α - amphipathique LL-37 (amphipathic α -helical LL-37) donc l'activité antibactérienne précédemment montrée pour être dérivée des cellules T et NK peut être due, en partie, aux peptides antibactériens LL-37 et HNP 1-3 (Agerberth et al., 2000).

Dans les leucocytes du macaque rhésus, quatre des huit α -défensines myéloïdes (RAMDs) isolés sont très semblables aux α -défensines HNP-1 à HNP-3 humaines, les quatre restants sont assez semblables à l' α - défensine entérique humaine HD-5 (Tang et al., 1999).

3.6.2.2. Chez les autres mammifères :

Chez les bovins, plusieurs PAC ont été isolés et caractérisés à partir des neutrophiles. Deux bacténécines, qui sont des polypeptides cationiques avec un poids moléculaire approximatif de 5000 et 7000 et riche en proline, sont isolés à partir des grands granules de neutrophiles chez les bovins (Gennaro et al., 1989; Frank et al., 1990). En plus des bacténécines, les neutrophiles de bovins possèdent les PAC nommés les β -défensines, et treize β -défensines

(bovine neutrophil β -defensins = BNBD1-13) structurellement homologues ont été purifiés à partir des neutrophiles de bovins et les séquences complètes de ces peptides ont été déterminées, ils ont 38 à 42 résidus d'acides aminés (Selsted et al., 1993). Quatre β -défensines ont été exprimés dans les macrophages alvéolaires chez les bovins, BNBD-4 et BNBD-5 sont les prédominants et le lipopolysaccharide (LPS) n'a aucun effet sur l'expression des β -défensines dans les macrophages alvéolaires bovins (Ryan et al., 1998). Chez le cheval, deux parmi les trois cathélicidines qui existent dans les neutrophiles ont été trouvées sous une forme non clivée. Les peptides mûrs correspondants ont été détectés dans des sites inflammatoires, en suggérant que la transformation des polypeptides a lieu lors de l'activation des neutrophiles (Skerlavaj et al., 2001).

Chez le mouton et la chèvre, trois peptides antimicrobiens cationiques riches en proline sont isolés à partir d'extraits de leucocytes : OaBac5 α et OaBac5 β chez les ovins et ChBac5 a été isolé à partir des leucocytes de la chèvre (Shamova et al., 1999). Un cathélicidine nommé SMAP-29 a été isolé à partir des leucocytes de mouton avec une forte activité antimicrobienne (Skerlavaj et al., 1999).

Chez le porc, la protégrine-1 a été isolée des leucocytes et a montré un large spectre d'activité avec une activité bactéricide rapide *in vitro* (Steinberg et al., 1997). Les protégrines existent à des concentrations bactéricides dans le liquide des abcès chez des porcs naturellement infectés (Shi et Ganz, 1998). Un autre membre de la famille des défensines, la β -défensine porcine - 1 est détecté dans les fragments issus de raclage de la surface dorsale de la langue ou de la muqueuse buccale (Shi et al., 1999).

En plus des animaux déjà cités, des peptides antimicrobiens cationiques ont été observés et purifiés chez les animaux de laboratoire. Une défensine a été isolée des neutrophiles du cobaye (GPNP) avec 31 acides aminés et 8 résidus communs avec les six défensines du lapin et les trois défensines humaines (Selsted et Harwig., 1987). Les neutrophiles du rat possèdent trois défensines à savoir Rat NP-1, Rat NP-3, et Rat NP-4 ; ces défensines ont été purifiées d'un extrait acide de neutrophiles, les peptides sont de 29 à 32 acides aminés avec un poids moléculaire de 3252 à 3825 Da, et chaque peptide contient les huit résidus qui sont invariablement conservés et qui sont caractéristiques des défensines. Rat NP-1 était le plus cationique et le plus puissant des défensines isolées (Eisenhauer et al., 1989). Une autre β -défensine a été trouvée chez la souris, appelé mBD-1 et présente une structure homologue à

celle de la β -défensine 1 (HBD-1) humaine et elle existe au niveau du système respiratoire et autres surfaces des muqueuses tel que l'appareil urogénital et le foie (Bals et al., 1998a). Les α -défensines ont été isolées des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle de la souris et nommées cryptdines (Ouellette et al., 2000).

D'autres peptides antimicrobiens, appartenant à la famille des défensines, ont été purifiés de l'extrait des granules des neutrophiles chez l'hamster. Quatre défensines ont été identifiées et elles sont dénommées HaNP-1 à -4 (hamster neutrophil peptide). HaNP-1 et HaNP-3 sont les plus bactéricides. Ces défensines montrent une activité moindre contre les bactéries à Gram négatif et possèdent une structure homologue aux défensines entériques de la souris avec environ 60% de résidus identiques dans le cas de HaNP-3 et cryptdine 3 (Mak et al., 1996).

3.6.2.3. Les peptides cationiques chez les non-mammifères :

En plus des peptides antimicrobiens sus-cités des mammifères, d'autres peptides cationiques sont isolés chez les autres espèces y compris les insectes et même les plantes. Deux isoformes de PAC riches en cystéine ont été trouvés dans le sang d'un mollusque (*Mytilus edulis*), un d'eux a été nommé 'Mytiline' avec 34 résidus d'acides aminés (Charlet et al., 1996). Deux autres peptides antimicrobiens ont été purifiés d'hémolymphe larvaire immunisé d'*Agrius convolvuli* et ont montré une séquence primaire et une taille très homologue à la cecropine D et ont été nommés cecropine D1 et cecropine D2 (Lee et al., 1999).

Chez le poisson, le gène qui code pour la pleurocidine a été identifié ; la pleurocidine est un peptide antimicrobien de 25 résidus d'acides aminés isolée des sécrétions de la peau de la plie rouge (*Pleuronectes americanus*) et a été localisé dans les granules de mucine de la peau et des cellules caliciformes de l'intestin (Cole et al., 2000).

Un peptide antimicrobien avec 51 résidus d'acides aminés et trois ponts disulfures intramoléculaires, appelé royalisine a été trouvé dans la gelée royale de l'abeille *Apis mellifera* (Fujiwara et al., 1990).

Les peptides antibactériens cationiques existent dans toutes les formes de vie, et ils ont été isolés à partir du virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH 1), virus de l'immunodéficience simienne (VIS) et à partir du virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE) (Tencza et al., 1997). Ils ont été isolés à partir des plantes qui luttent contre les infections par

la production de peptides cationiques spécifiques, les thionines (Hancock et al., 1995). Les thionines sont formées de 45 à 47 acides aminés (Schröder, 1999).

3.6.2.4. Les peptides antimicrobiens cationiques et les hétérophiles aviaires :

Beaucoup de chercheurs dans le domaine des défenses non spécifiques et spécialement les peptides antimicrobiens cationiques naturels ont été attirés par les hétérophiles aviaires à cause de leur activité antimicrobienne qui dépend principalement de mécanismes oxygène-indépendants et leur réponse oxydative est assez faible comparativement à celle des neutrophiles chez les mammifères (Harmon, 1998).

Des PAC ont été isolés et purifiés à partir des leucocytes des poulets pour la première fois en 1994 par Harwig et son équipe, où trois PAC riches en cystéine et nommés "gallinacines" ont été identifiés dans les extraits des hétérophiles Gal-1 α , Gal-1, Gal-2, ces peptides contiennent 36 à 39 résidus d'acides aminés. Ils sont relativement cationiques à cause des résidus de lysine et d'arginine avec la présence d'une homologie séquentielle entre les gallinacines et la sous-famille des β -défensines. Les gallinacines montrent 9 résidus invariables (6 cystéines, 2 glycines et 1 proline) (Harwig et al., 1994).

Durant la même année, Evans et ses collaborateurs ont réussi à isoler deux peptides antimicrobiens à partir de l'extrait des granules des hétérophiles du poulet et ont été nommés peptides des hétérophiles du poulet 'chicken heterophil peptides' (CHP1 et CHP2). Trois autres peptides antimicrobiens ont été isolés à partir des hétérophiles de la dinde et appelés peptides des hétérophiles de la dinde 'turkey heterophil peptides' (THP1, THP2 et THP3). Tous ces peptides sont de nature cationique et sont riches en cystéine, arginine et lysine; ces mêmes peptides à l'exception de THP2 et THP3 montrent une homologie séquentielle de 22 résidus et une charpente de cystéine semblable aux β -défensines des bovins. Le peptide antimicrobien cationique CHP1 a été purifié et il est formé de 39 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 4481 Da (Evans et al., 1994).

L'expression de la gallinacine-3 (Gal-3) chez le poulet est fortement proéminente au niveau de la langue, la bourse de Fabricius et la trachée tandis que l'expression est modérée au niveau de la peau, l'œsophage et les sacs aériens et elle est plus faible dans le gros intestin, le rein et l'ovaire. Contrairement au Gal-3, l'expression du Gal-1 (et -1 α) et Gal-2 est limitée aux cellules de la moelle osseuse (Zhao et al., 2001). D'autres gallinacines (Gal 4, Gal 7, et Gal 9)

sont caractérisées chez le poulet et participent dans les défenses innées par leur activité antimicrobienne (Milona et al., 2007).

Actuellement, une nouvelle nomenclature pour les peptides antimicrobiens cationiques aviaires a été proposée et qui consiste à la substitution des dénominations de gallinacines et de beta-défensine par beta-défensine aviaire (Avian beta-defensin : AvBD) suivie d'un chiffre; plus de 13 Beta-défensine aviaires (AvBD1 – AvBD13) sont identifiées (Lynn et al., 2007)

3.6.3. Biosynthèse des peptides cationiques antimicrobiens:

Ils sont produits par toutes les espèces vivantes y compris les bactéries (bactériocines) et leur synthèse est assurée par les ribosomes (Hancock et Chapple, 1999). Les défensines sont synthétisées comme pré-propeptides de 93-96 acides aminés, les ADNc pour beaucoup de défensines ont été caractérisés, en révélant que les produits de la traduction initiale contiennent un peptide signal et un pro-segment anionique, avec le peptide mûr au pré-propeptide C-Terminal (Selsted et Ouellette, 1995). Le pré-prodéfensine a une séquence signal de 19 acides aminés et sert pour viser le réticulum endoplasmique (Hancock et al., 1995).

Les précurseurs des α -défensines humaines subissent un clivage séquentiel sur une période de 4 à 24 heures pour donner des intermédiaires de 75 à 56 acides aminés et des agents qui neutralisent le compartiment subcellulaire acide. La charge anionique du pro-segment de l' α -défensine peut avoir un rôle dans la neutralisation de la charge basique du peptide fonctionnel et un effet cytoprotectif (Ouellette, 1999). Dans les neutrophiles, les β - défensines sont entreposés comme peptides mûrs dans les granules azurophiles (Risso, 2000). Ces granules azurophiles forment une population de granules destinée à la fusion avec les vacuoles phagocytaires (Faurischou, 2002). Durant la phagocytose, les granules primaires riches en défensines adhèrent aux vacuoles phagocytaires et libèrent les défensines (figure 12) (Joiner et al., 1989).

Les α -défensines des leucocytes du singe rhésus (RAMD-1 à 8) dérivent de pré-propeptides avec 94 à 98 acides aminés (Tang et al., 1999) et le même sort pour le peptide antimicrobien trachéal (TAP, avec 38 acides aminés) isolé de la muqueuse trachéale des bovins, ce peptide est issu d'un précurseur qui est relativement de petite taille avec 64 acides aminés (Diamond et al., 1991). Deux précurseurs des β -défensines ont été trouvés chez la chèvre et appelés preproGBD-1 et preproGBD-2, le premier a une expression prédominante dans la langue et le

tractus respiratoire, alors que le second a été exprimé d'une manière prédominante dans l'intestin (Zhao et al., 1999).

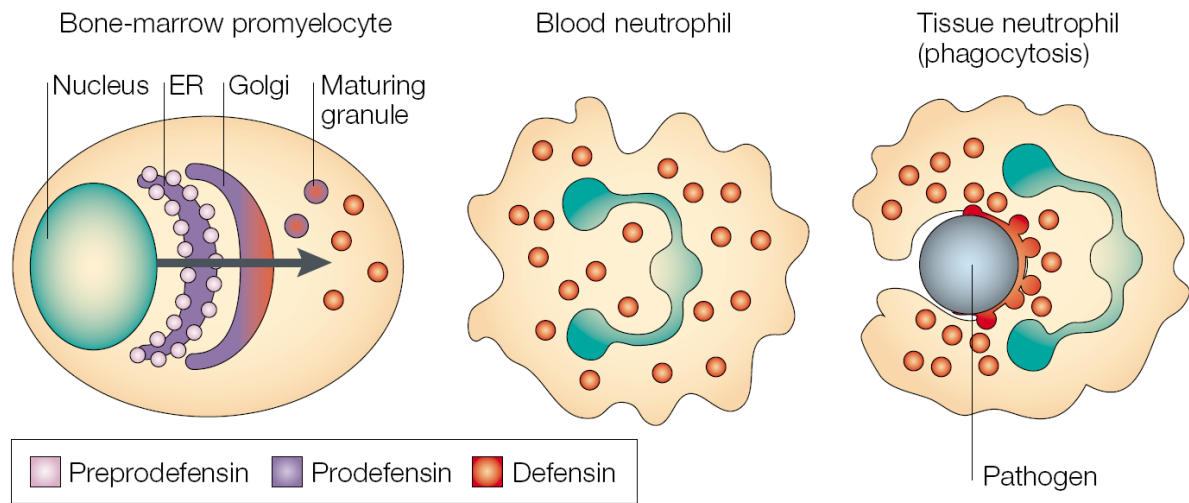


Figure 12: Synthèse de la HNP α -défensine et libération sur des microorganismes (Ganz, 2003).

Chez le poulet, il a été montré que les précurseurs des quatre β -défensines aviaires (Gal-1/CHP-1, Gal-2, THP-1 et THP-2) sont composés d'une séquence signal hydrophobe avec approximativement 19 résidus d'acides aminés et d'un pro-segment très acide avec plus de 40 résidus d'acides aminés et du peptide cationique mûr (Brockus et al., 1998). Le pro-segment a un rôle dans l'inactivation du peptide mûr et a été démontré *in vitro* (Valore et al., 1996).

3.6.4. Régulation et indicibilité des défensines :

Les α -défensines sont entreposées dans les granules cytoplasmiques des leucocytes polymorphonucléaires des mammifères (Levy, 1996), de même pour les β -défensines qui sont stockées dans les granules des neutrophiles chez les bovins (Selsted et al., 1993) et les granules des hétérophiles chez le poulet et la dinde (Evans et al., 1994).

L'activité des α -défensines chez la souris existant dans les granules des cellules de Paneth (cryptdines) est réglée par une métalloprotéinase nommée matrilysine, cette dernière est colocalisée avec les cryptdines et assure le clivage, *in vitro*, du pro-segment des précurseurs du cryptdine (Wilson et al., 1999).

Contrairement à la réponse immunitaire qui est caractérisée par sa haute spécificité et la lenteur relative qui est due à l'expansion clonale et la discrimination entre le soi et non-soi, la réponse par les PAC est capable d'agir plutôt contre un large spectre de microorganismes envahissants et aussi dans quelques minutes et non pas quelques jours (Hancock et Scott, 2000).

Il est actuellement évident que les antigènes bactériens tels que le LPS, le lipide A et l'acide lipotechoïque (LTA) induisent des sécrétions microbicides par dégranulation des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle de la souris, ces sécrétions sont formées principalement par des α -défensines ou des cryptdines. La dégranulation des cellules de Paneth est une réponse sélective et rapide vis-à-vis des composants de l'enveloppe des cellules procaryotes. (Ayabe et al., 2000).

L'expression de la β - défensine-2 humaine (HBD-2) est réglée localement par l'inflammation et l'expression augmente d'une façon remarquable dans l'épiderme qui entoure les régions enflammées, ce type de réponse suggère que la HBD-2 contribue à la défense de l'hôte localement lorsque la barrière cutanée est interrompue (Liu et al., 1998). Cette défensine est aussi libérée par les cellules épithéliales des voies aériennes humaines en réponse à *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde ou aux cytokines primaires endogènes ce qui suggère que la HBD-2 est importante dans les infections pulmonaires causées par *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde et aussi dans les infections des patients souffrants de la mucoviscidose (Harder et al., 2000).

Contrairement à l'augmentation de la concentration des PAC en réponse aux infections bactériennes, la diminution de leur concentration a été observée lors d'infections entériques (infections à *Shigella*) où l'expression de la LL-37 et la β - défensine-1 humaine est réduite ou éteinte pendant le début de l'infection à *Shigella spp.* Des investigations plus approfondies montrent que le plasmide des Shigelles est un médiateur potentiel pour la diminution de l'activité antibactérienne. La diminution des gènes codant pour les peptides antibactériens a été suggérée pour être un paramètre important de la virulence des Shigelles (Islam et al., 2001).

Une augmentation de l'expression des défensines des leucocytes polymorphonucléaires chez le lapin (NP-2 et NP-5) a été observée pendant le début de l'endotoxémie provoquée par le LPS. Cette augmentation précoce est associée avec une neutrophilie et une augmentation de l'activité fonctionnelle des PMN (expression de CD18 et production H_2O_2) (Klut et al., 2001).

Chez le poulet, l'expression trachéale la β - défensine épithéliale (Gal-3) augmente en réponse à l'infection expérimentale par *Haemophilus paragallinarum* infection expérimentale alors que son expression dans les autres organes reste non affectée (Zhao et al., 2001).

3.6.5. Activité antimicrobienne:

Les PAC sont considérés comme des antibiotiques naturels avec un large spectre d'activité, leur activité antibactérienne a été largement étudiée.

Les défensines et les autres PAC manquent de l'activité antimicrobienne exceptionnelle des antibiotiques récemment introduits contre des bactéries sélectionnées (Gough et al., 1996). Les défensines possèdent une CMI de l'ordre de 1-8 $\mu\text{g/ml}$ contre des microorganismes résistants comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et contre des souches plus résistantes aux antibiotiques comme le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et des bactéries multirésistantes aux antibiotiques, ce qui rend ces peptides compétitifs même avec les antibiotiques les plus forts. En plus la CMI des PAC montre de simples variations entre les souches résistantes et les souches sensibles d'une espèce bactérienne donnée (Hancock, 1997).

Les PAC ont un large spectre d'activité et exigent la possession d'une membrane par les microorganismes cibles incluant donc les virus enveloppés tels que le VIH, les herpès virus, virus de la stomatite vésiculaire et les bactéries à Gram négatif et / ou à Gram positif, les champignons, les parasites tels que les trypanosomes et les plasmodiums et même les cellules cancéreuses (Hancock et Diamond, 2000). La mort bactérienne exige la présence d'une croissance bactérienne dans la plupart des cas et elle se produit en quelques minutes (Huttner et Bevins, 1999). Cette activité bactéricide est d'autant plus élevée quand le milieu l'incubation contient certains éléments nutritifs comme le bouillon trypticase soja et le glucose (Ganz et al., 1985).

Les activités antibactériennes individuelles de HNP-1 et HNP-2 contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient les mêmes que le mélange HNP1-3, mais HNP-3 présente une activité antibactérienne moindre (Ganz et al., 1985 ; Takemura et al., 1996). La même concentration du mélange HNP1-3 a des effets antiviraux contre le virus herpès simplex type 1 (Ganz et al., 1985). Les défensines humaines (HNP1-3) ont une activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans* (Ganz et al., 1985 ; Mambula et al., 2000) et elles sont aussi actives contre *Histoplasma capsulatum* avec inhibition

maximale à 8 µg/ml (Newman et al., 2000). Contrairement aux effets suscités des PAC, HNP-2 et 12 autres PAC n'ont aucun effet sur *Brucella spp.* et cette résistance est due aux membranes externes (Martinez de Tejada et al., 1995).

La β-défensine-1 humaine a été trouvée dans les tissus urogénitaux avec un effet antibactérien contre des souches de laboratoire et aussi des isolats cliniques d'*Escherichia coli* et avec des concentrations micromolaires. C'est un peptide sensible au sel et son activité est inhibée à des concentrations élevées mais les variations de pH ont de faibles conséquences sur l'activité antimicrobienne (Valore et al., 1998). Ce même peptide existe aussi dans le lait maternel et les épithéliums de la glande mammaire et est actif contre *Escherichia coli* avec une concentration létale de 5µg/ml, mais aucun effet n'a été observé contre les isolats cliniques de *Listeria monocytogenes* ou streptocoque du groupe B avec une concentration de 0,1 à 10 µg/ml (Jia et al., 2001b). La β-défensine-3 humaine (HBD-3) possède un large spectre d'activité antibactérienne à des concentrations micromolaires basses (Harder et al., 2001). L'activité antibactérienne de la HBD-3 est plus forte que celle de la HBD-1 et HBD-2 et ceci peut être dû à sa richesse en charges positives (+11) et sa grande affinité à former des dimères dans les solutions (Schibli et al., 2002).

L'autre famille des PAC des neutrophiles humains et qui est représentée par un peptide α-hélicoïdal LL-37 a montré une activité antibactérienne élevée avec une CMI basse (<10 µg/ml) même dans des milieux contenant 100 mmol de NaCl (Turner et al., 1998), mais n'a aucun effet sur les bactéries orales et les levures comme *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis*, *Candida tropicalis* et *Candida albicans* (Guthmiller et al., 2001).

Le peptide antimicrobien trachéal des bovins possède un large spectre d'activité et il est actif sur les bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. De plus, ce peptide a une activité significative contre *Candida albicans* (Diamond et al., 1991). Aussi toutes les treize β-défensines isolées des neutrophiles des bovins ont montré une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* à l'exception de BNBD-1 et BNBD-5, qui sont inactives contre *Staphylococcus aureus*, avec des concentrations qui varient de 10 à 300 µg/ml, la plupart d'eux sont plus actives sur *Escherichia coli* que sur *Staphylococcus aureus* (Selsted et al., 1993).

D'autres peptides antimicrobiens ont été trouvés dans les neutrophiles bovins, à savoir un dodécapeptide avec activité bactéricide contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Romeo et al., 1988), Bac-5 et Bac-7 ont montré une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella* (Gennaro et al., 1989). Le SMAP-29 du mouton possède un large spectre et une activité antimicrobienne forte contre des isolats cliniques résistants aux antibiotiques y compris le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, l'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine, le *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde isolé de patients atteints de mucoviscidose et le *Cryptococcus neoformans* à partir de patients atteints de SIDA. Toutes ces souches bactériennes sont très sensibles à SMAP-29 avec des CMI de 0,12 - 2 μ M (Skerlavaj et al., 1999). Ce peptide a une activité antimicrobienne, *in vitro*, contre neuf agents pathogènes ovins avec une CMI inférieure à 0,6 μ g/ml, aussi ce peptide montre une activité antibactérienne, *in vivo*, une dose unique de 0,5 mg réduit la concentration des bactéries dans le lavage broncho-alvéolaire et les tissus pulmonaires consolidés (Brogden et al., 2001).

Chez le lapin, MCP-1 et MCP-2 ont une activité antibactérienne forte et leur activité a été exprimée dans le mieux à un pH proche du neutre (7 à 8) et une force ionique relativement basse. Dans de telles conditions une souche de *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde isolée de patients atteints de mucoviscidose est tuée rapidement et une demi-vie d'environ 38 secondes a été observée après exposition à 50 μ g de MCP-1 par ml (Lehrer et al., 1983). Ces mêmes peptides sont aussi actifs contre des virus comme VHS-1, VHS-2, virus de la stomatite vésiculaire (Lehrer et al., 1985).

Les peptides les plus cationiques isolés à partir des granulocytes chez le lapin (NP-1 et NP-2) sont les plus actifs contre un large spectre de bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, alors que, les quatre peptides restants avaient une activité antibactérienne plus sélective (Selsted et al., 1984). Un agent pathogène commun du lapin domestique, le *Bordetella bronchiseptica*, était résistant à MCP-1 et MCP-2 (Lehrer et al., 1983) et il est de même pour les six autres PAC isolés à partir des granulocytes (Selsted et al., 1984).

La défensine humaine HNP-1, la défensine synthétique lapine s NP-1 et la protégrine porcine PG-1 ont montré une activité antimycobactérienne considérable contre *Mycobacterium tuberculosis*, dans un essai, après incubation individuelle de ces peptides à une concentration de 50 μ g/ml avec *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, ils induisent une réduction des UFC de 85,9 à 97,5% après 24 heures d'incubation et atteignent 91,6 à 99,4% après 48 heures

d'incubation. Ils sont aussi actifs contre trois isolats cliniques *Mycobacterium tuberculosis* (Miyakawa et al., 1996).

La cathélicidine CAP18 du lapin a une activité antibactérienne, *in vitro*, contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et aussi *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Travis et al., 2000).

La défensine des neutrophiles du cobaye (GPND) possède une activité antibactérienne contre le streptocoque du groupe B et *Pseudomonas aeruginosa*, des activités fongicide et antivirale ont été observées contre *Candida albicans* et VHS-1 respectivement (Selsted et Harwig, 1987).

Les trois défensines des neutrophiles du rat (Rat NP-1, Rat NP-3 et Rat NP-4) ont une activité antimicrobienne, *in vitro*, et chaque peptide a la capacité de tuer des souches de laboratoire d'*Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*; avec le Rat NP-1, qui est le plus cationique, était aussi le plus fort. Tandis que le Rat NP-4, qui est moins cationique, était le plus faible (Eisenhauer et al., 1989). Il est très apparent que la charge du peptide joue un rôle déterminant sur son activité vis-à-vis des microorganismes.

Quatre défensines isolées à partir des neutrophiles du hamster (HaNP-1 et HaNP-3) ont une activité antibactérienne forte contre *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* contrairement à la faible activité antibactérienne du HaNP-2 et HaNP-4. Les défensines du hamster sont généralement faibles à l'égard des bactéries à Gram négatif (Mak et al., 1996).

La β -défensine-1 de la souris 1 (mBD-1) a une activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, son activité diminue substantiellement en présence d'une haute concentration de NaCl (Bals et al., 1998a).

Les peptides cationiques aviaires isolés à partir des hétérophiles, comme ceux des mammifères, expriment une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'utilisation des essais quantitatifs montrent que le CHP-1 élimine 80% d'*Escherichia coli* à une concentration de 2,7 $\mu\text{g/ml}$, alors que 80% de *Staphylococcus aureus* ont été tués à une très faible concentration (0,7 $\mu\text{g/ml}$). CHP-2 montre une activité bactéricide contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par l'utilisation de la méthode de diffusion radiale. Le THP-1 est moins fort que les peptides des hétérophiles du poulet et tue 80% de *Staphylococcus aureus* à une concentration de 2,6 $\mu\text{g/ml}$ tandis que l'élimination d'*Escherichia coli* requiert des concentrations plus élevées, 80% d'*Escherichia coli* est

éliminé mais à une concentration de 5,3 µg/ml. Les deux autres peptides des hétérophiles de la dinde (THP-2 et THP-3) manquent d'activité, *in vitro*, vis-à-vis d'*Escherichia coli* à une concentration de 21 µg/ml mais tuent 80% de *Staphylococcus aureus* à 10,5 µg/ml (Evans et al., 1994).

Dans une autre étude où les activités antimicrobiennes des quatre peptides des hétérophiles aviaires (CHP-1, CHP-2, THP-1, THP-3) ont été testées contre une variété de microorganismes y compris des agents pathogènes aviaires et aussi des agents pathogènes humains hébergés par les oiseaux. Tous les trois premiers peptides (CHP-1, CHP-2, THP-1) étaient efficaces contre toutes les bactéries testées à une concentration de 16 µg/ml, à l'exception de *Pasteurella multocida* sérotype A:3, souche 1059 où aucun des peptides précités, y compris un peptide connu: sulfate de protamine, n'a montré une activité contre ce sérotype à la concentration maximale de 16 µg/ml, aussi THP-3 n'a aucun effet sur *Bordetella avium*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* à la concentration de 16 µg/ml. Cette étude a montré que THP-1 est le plus fort des peptides des hétérophiles aviaires testés et les quatre peptides sont incapables de neutraliser le virus de la bronchite infectieuse (VBI) dans les conditions expérimentales (Evans et al., 1995). Testés contre des souches d'*Escherichia coli* ML-35P, *Listeria monocytogenes* EGD et *Candida albicans* par une méthode ultrasensible de diffusion radiale, GAL-1(CHP-1) et GAL-1α ont une activité remarquable vis-à-vis d'*Escherichia coli* et ils étaient dix fois plus forts que HNP-1. Gal-2 (CHP-2) montre une efficacité moindre contre *Escherichia coli* mais dépasse de loin celle de HNP-1. Les trois gallinacines montrent une activité antibactérienne presque égale contre *Listeria monocytogenes*. Gal-1 et GAL-1α montrent en plus une activité contre *Candida albicans* alors que la Gal-2 est inefficace même avec une concentration de 400 µg/ml (Harwig et al., 1994). Aussi il a été trouvé que les composants du lysat des hétérophiles sont suffisants pour tuer *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Harmon et al., 1992).

3.6.6. Mode d'action :

Nombreuses sont les études qui montrent le mécanisme d'action des PAC. En effet, ces peptides chargés positivement réagissent directement avec les surfaces bactériennes chargées négativement, qui sont représentées par la bicouche des phospholipides de la membrane bactérienne, en provoquant la perte de l'intégrité de la membrane ce qui conduit à la perte du gradient d'énergie à travers la membrane bactérienne et à la lyse des bactéries (Gudmundsson et Agerberth, 1999).

Il a été signalé que l'activité bactéricide de HNP contre *Escherichia coli* ML-35 est due à la perméabilisation de la membrane externe puis de la membrane interne ; cette dernière (perméabilisation de la membrane interne) paraît être l'événement léthal pour ces bactéries (Lehrer et al., 1989), pour les bactéries à Gram positif une seule membrane est impliquée (Hancock, 1997). Les PAC provoquent un déplacement compétitif des ions de la membrane bactérienne et aboutit à la perturbation de la propriété de la barrière normale de la membrane externe avec apparition de fissures transitoires permettant le passage de molécules y compris le peptide lui-même “self promoted uptake” (Hancock, 1997; Hancock et Chapple, 1999).

L'activité des peptides cationiques implique des interactions électrostatiques initiales entre les peptides positivement chargés et les membranes bactériennes négativement chargées avec formation de canaux ou pores transmembranaires dans la membrane cytoplasmique (Hancock et al., 1995; White et al., 1995). Les canaux transmembranaires provoqués par la plupart des peptides variés largement dans la magnitude et la durée (Wu et al., 1999). De même, Wimley et son équipe montre en 1994 que HNP-2 (charge nette = +3) s'attache à des vésicules formées par des quantités variables de lipides anioniques mais pas à des vésicules formées exclusivement par des lipides neutres, concluant ainsi que la liaison de ces peptides commence par des interactions électrostatiques. Les premiers effets des défensines sur *Staphylococcus aureus* sont les dégâts de la membrane qui sont observés même à des concentrations non-bactéricides, mais l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu anéantit ces changements membranaires des bactéries exposées aux défensines (Shimoda et al., 1995).

La composition lipidique de la membrane bactérienne est un facteur déterminant à la susceptibilité aux défensines (Hristova et al., 1997). Un nouveau facteur de virulence, codé par un gène, MprF, est responsable de la résistance du *Staphylococcus aureus* à plusieurs peptides comme les défensines et les protegrines et l'analyse des lipides de la membrane a montré que le mutant MprF ne modifie plus le phospholipide membranaire phosphatidylglycérol par l'introduction de la L-lysine, ce qui réduit la charge négative de la surface de la membrane et le rend insensible aux défensines (Peschel et al., 2001).

D'autres études ont montré après examen avec le microscopique électronique des bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermis*) traitées avec différents peptides cationiques des effets variables sur les structures bactériennes avec la présence de structures anormales. Cette observation indique que le mécanisme d'action probable n'implique pas

uniquement la perméabilisation de la membrane plasmique. Plusieurs cibles anioniques peuvent être visées par l'action du peptide comme l'ADN, l'ARN, la paroi et plusieurs enzymes mais l'accessibilité de ces cibles varie selon le peptide et la bactérie en question (Friedrich et al., 2000).

L'utilisation de technique d'électrophysiologie et de la biologie moléculaire révèlent que les peptides cytotoxiques y compris les défensines des mammifères et les cryptdines modifient les membranes cellulaires par interaction avec les protéines intrinsèques de transport des ions et / ou la formation de canaux transportant des ions. Ces deux mécanismes d'action provoquent des changements des systèmes du second messager qui augmentent l'activité électrique anormale et la distorsion de la transduction du signal qui causent la mort cellulaire (Kourie et Shorthouse, 2000).

Hancock et Chapple ont proposé en 1999 un aperçu de l'interaction des peptides avec les enveloppes membranaires des bactéries à Gram négatif (figure13). D'après cette hypothèse et d'autres études susmentionnées, les peptides traversent la membrane externe après neutralisation de la charge sur une pièce de la membrane externe, en créant des fissures à travers lesquels le peptide peut accéder à la membrane plasmique (A), le deuxième chemin pour traverser la membrane externe est la liaison à des cations divalents au niveau des sites de fixation sur le LPS en provoquant l'interruption de la membrane (B).

Après la traversée de la membrane externe, le PAC se fixe à la surface chargée négativement de la membrane cytoplasmique et il va être inséré dans l'interface de la membrane (C). Plusieurs peptides s'insèrent dans l'interface de la membrane et vont subir soit une agrégation en micelles complexes qui traversent la membrane (D) ou des mouvements de bascule (flip-flop) à travers la membrane sous l'influence du gradient électrique transmembranaire (E).

Les agrégats ressemblant aux micelles (D) fournissent des canaux assurant le mouvement d'ions à travers la membrane et peut-être une fuite des molécules solubles avec un poids moléculaire plus élevé. L'effet net des étapes D et E, c'est que quelques monomères vont subir une translocation de la membrane vers le cytoplasme et se fixent sur les polyanions cellulaires comme l'ADN et l'ARN (figure 13).

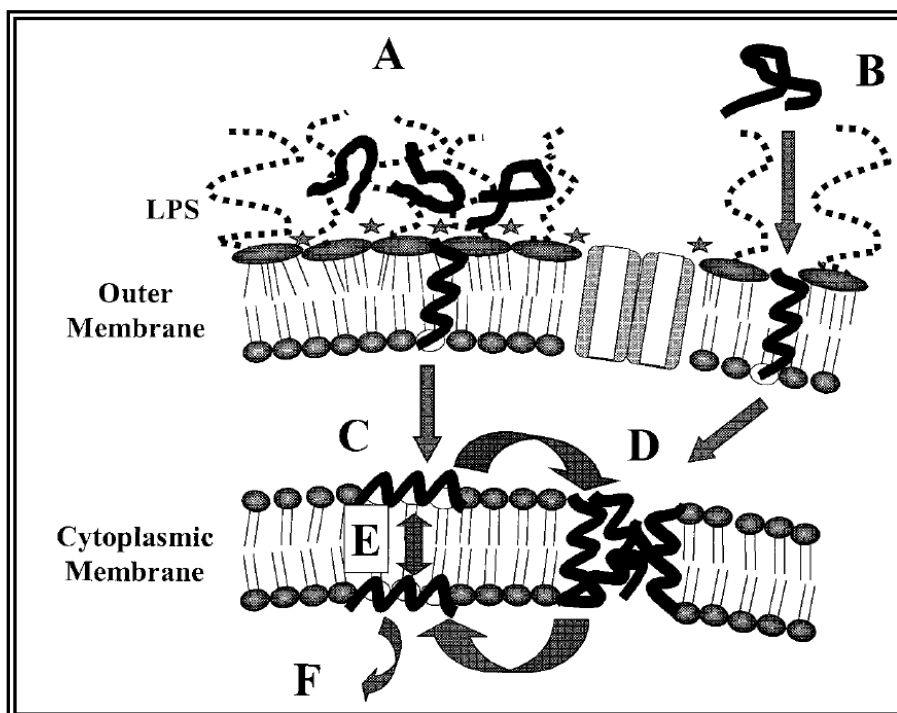


Figure 13 : Mécanisme proposé de l'action des PAC vis-à-vis de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif (Hancock et Chapple, 1999).

3.6.7. Action sur les cellules des mammifères:

À côté de leur rôle comme antibiotiques naturels, les PAC possèdent un effet cytotoxique sur les cellules de l'hôte. L'activité antimicrobienne ou l'activité cytotoxique sont démontrées avec des essais de cytotoxicité contre plusieurs types de cellules (microorganismes et cellules des mammifères et surtout les cellules sanguines). L'activité biologique des PAC dépend de l'environnement où ils existent, ainsi la fonction principale des peptides cytotoxiques dans les sécrétions antimicrobiennes est la fourniture d'une première ligne de défense contre les microorganismes envahissants alors que, quelques peptides cytotoxiques qui existent dans les venins fonctionnent comme des toxines et sont utilisés pour des fins de défense ou pour tuer des proies (Kourie et Shorthouse, 2000).

Contrairement aux bactéries, le feuillet externe de la membrane cellulaire des cellules eucaryotes porte une charge négative moindre ce qui explique partiellement les effets différents des peptides sur les cellules eucaryotes comparativement aux cellules procaryotes dont la membrane contient un mélange de phospholipides chargés négativement et zwitterioniques (Gudmundsson et Agerberth, 1999).

L'activité cytotoxique des PAC naturels et synthétiques a été investiguée par mesure de l'activité hémolytique vis-à-vis des érythrocytes humains et qui dépend fortement des conditions de réalisation des essais. Certains PAC comme l'histatine et les magainines sont fortement actives contre *Candida albicans* et aussi contre les érythrocytes humains (Helmerhorst et al., 1999).

3.6.8. Activité anti-endotoxinique des peptides antimicrobiens cationiques :

Des statistiques montrent qu'en Amérique du Nord, plus de 500000 patients souffrent de septicémie chaque année (Hancock et Scott, 2000). Aux États-Unis, la septicémie est classée comme la 13ème cause principale de mortalité avec des dépenses allant de 5 à 10 milliards de dollars de la santé annuelle (Gough et al., 1996).

La septicémie est provoquée habituellement par la libération de lipopolysaccharides à partir de la membrane externe des bactéries à Gram négatif; la toxicité de cette endotoxine (LPS) réside dans son lipide A. La septicémie due aux bactéries à Gram positif est présumée pour être causée par la libération des composants de la paroi bactérienne (Hancock et Scott, 2000). Aussi la plupart des antibiotiques induisent l'endotoxémie par la libération du LPS durant la neutralisation et / ou la lyse des bactéries. Contrairement à ce type d'antibiotiques, au moins quelques peptides cationiques ont l'avantage et la capacité de neutraliser le LPS et prévenir l'endotoxémie (Hancock, 1997).

Il a été trouvé que les peptides appartenant à tous les groupes structurels majeurs des peptides antimicrobiens ont la capacité de bloquer l'activation des macrophages par le LPS, ceci peut être dû en grande partie à leur capacité de bloquer la fixation de LPS à LPS-binding protein (LBP). Donc prévenir l'étape initiale de signalisation du LPS qui consiste au transfert du LPS vers CD14 par le LBP aboutissant ainsi à la réduction ou à la prévention des réponses inflammatoires provoquées par le LPS (Scott et al., 2000). De même les PAC inhibent la production des cytokines comme le facteur de nécrose tumorale TNF- α et IL-6 par les macrophages stimulés par le LPS (Hancock et Scott, 2000).

En 1996, Gough et son équipe ont révélé l'activité anti-endotoxinique de deux petits peptides cationiques α -hélicoïdal, MBI-27 et MBI-28 qui sont des dérivés de la cecropine et la mélittine de l'abeille, ils ont la capacité de surmonter l'endotoxémie létale et ils se fixent sur le LPS et préviennent sa capacité d'induire la réponse TNF, ce dernier étant un médiateur majeur dans le choc endotoxinique.

3.6.9. Autres rôles des peptides antimicrobiens cationiques:

Une étude *in vivo* sur l'effet direct des défensines sur les poumons de la souris a montré que l'instillation intratrachéale de concentrations élevées de défensines peut induire une hypoxémie, un affaiblissement de la fonction des mitochondries, une augmentation de perméabilité du poumon et une élévation de cytokine dans le poumon. Ces indices de dysfonctionnement aigu du poumon ont été associés avec un afflux considérable de neutrophiles vers le poumon et une augmentation considérable de la concentration de l'élastase dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire. Les défensines peuvent donc agir comme médiateurs dans la phase initiale des réponses inflammatoires aiguës pulmonaires ce qui suggère que les concentrations élevées des défensines dans les voies aériennes peuvent jouer un rôle important dans la pathogénie des maladies pulmonaires inflammatoires (Zhang et al., 2001). En plus, les défensines isolées à partir des neutrophiles humains et des autres espèces provoquent la libération de l'histamine et la dégranulation des mastocytes péritonéales chez le rat (Befus et al., 1999).

Les défensines des leucocytes jouent un rôle dans le métabolisme des lipides et il a été montré que les défensines augmentent la fixation de la Lp(a) aux cellules endothéliales et aux cellules musculaires lisses, les défensines provoquent aussi une augmentation comparable dans l'internalisation de Lp(a) par chaque type cellulaire sans augmentation concomitante de dégradation (Higazi et al., 1997). Les α -défensines, libérées par les neutrophiles activés ou sénescents, stimulent la fixation d'une lipoprotéine athérogénique Lp(a) à la matrice extracellulaire des cellules endothéliales, un processus qui peut contribuer à l'accumulation de la lipoprotéine dans les lésions de l'athérosclérose (Bdeir et al., 1999)

Des études récentes montrent que l'administration orale de certains PAC, durant les premières heures qui suivent l'éclosion, augmente considérablement la protection contre une variété de bactéries pathogènes (Kogut et al., 2007 ; Kogut et al., 2010).

3.6.10. Les peptides antimicrobiens cationiques comme marqueurs:

En raison de leur variabilité, ces PAC peuvent être exploités comme marqueurs dans certaines pathologies.

En plus de la fonction de l'épithélium intestinal comme barrière physique pour limiter l'accès de microbes entériques à l'hôte, une autre fonction consiste dans la production des β -défensines. HBD-1 est exprimé par l'épithélium du côlon normal et par l'intestin grêle avec un

modèle semblable d'expression dans le côlon inflammé. Par contre, l'expression du HBD-2 est faible dans l'épithélium normal mais augmente dans l'épithélium du côlon inflammé (O'Neil et al., 1999).

La salive de patients souffrant de maladies de la muqueuse orale contient la défensine-1 (HNP-1) et sa concentration est plus élevée chez certains patients que chez le sujet sain (Mizukawa et al., 1999).

D'autres formes de peptides ont été observées dans des cellules leucémiques humaines, telle que la HP 1 et HP1-56, cette dernière est difficile à détecter dans les neutrophiles périphériques normaux et sa présence dans les cellules qui synthétisent activement les composants des granules primaires peut être exploitée comme un marqueur pour les maladies leucémiques (Bateman et al., 1991).

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux :

Cette étude a été réalisée au niveau de l'animalerie du département vétérinaire de l'université El- Hadj Lakhdar (Batna) où une grande salle a été aménagée pour l'élevage expérimental des poulets. La salle est divisée en deux compartiments, le premier est destiné au stockage des aliments tandis que le deuxième est réservé à l'élevage des poulets au sein d'une batterie divisée en cages pour avoir de meilleures conditions expérimentales. Le chauffage est assuré par des radiateurs bain d'huile à température réglable. La ventilation de type statique est assurée par l'ouverture partielle des portes. L'éclairage assuré par des lampes néon est renforcé par des lampes tungstène avec une intensité lumineuse avoisinant 5 Watts/m² et un éclairage de 23h/24h.

La salle d'élevage a été correctement préparée avec un vide sanitaire prolongé suivi d'un nettoyage énergique avec une désinfection et une fumigation avec du formol et du permanganate de potassium.

2. Réception des poussins :

Après une période de préchauffage qui a duré deux jours avant l'arrivée des poussins ; ces derniers de souche « ISA 15 » issus d'un couvoir de la région de Batna sont ramenés dans des cartons de 50 poussins par carton.

Différents élevages de poulets de chair sont réalisés pour cette étude, un élevage de poulets de chair est réservé à étudier l'influence de la BF sur la mortalité, l'évolution pondérale et sur le statut immunitaire principalement le poids de quelques organes. Les poussins sont divisés de façon aléatoire en quatre lots dont le premier sert de témoin. Les poussins du deuxième lot ont subi une vaccination contrairement aux autres lots. Les poussins du troisième lot ont subi une ablation chirurgicale de la bourse de Fabricius durant les 24 heures qui suivent l'éclosion. Les sujets du dernier lot (lot incision) subissent la même opération chirurgicale (incision cutanée et suture de la plaie) que le troisième lot sauf que l'exérèse de la BF n'a pas eu lieu. Le lot incision sert de témoin pour le lot des sujets ayant subi l'ablation de la BF et dont le but est de savoir l'influence de la plaie seule sur les paramètres susmentionnés.

Un deuxième élevage est utilisé pour les études hématologiques, tandis que le troisième est réservé à l'isolement des granules cytoplasmiques des hétérophiles et les tests qui s'ensuivent ainsi que l'influence de la BF sur les protéines sériques et le challenge bactérien.

De l'eau sucrée, à raison de 20g/l, est distribuée aux animaux quelques minutes après leur installation pour leur procurer de l'énergie et éviter tout type de déshydratation (figure1, 2).



Figure 1 : Réception des poussins

3. Alimentation et abreuvement :

L'alimentation des animaux est assurée par un aliment équilibré avec une composition adaptée à la période d'élevage, de démarrage, de croissance et de finition et une granulométrie respectée (type ONAB). L'alimentation ainsi que l'abreuvement sont distribués *ad libitum*.



Figure 2 : Installation et élevage des poussins

4. Vaccination :

Le protocole vaccinal pour le deuxième lot est celui utilisé à titre prophylactique par la majorité des élevages de poulets de chair en Algérie et qui est dirigé contre les maladies de Newcastle et de Gumboro (tableau 1). La vaccination a été faite par voie orale avec une micropipette ou par instillation oculaire suivant les recommandations du fabricant, chaque animal reçoit la dose appropriée en vue d'une meilleure prise vaccinale.

Tableau 1 : Les vaccins utilisés

Vaccin	Vaccination contre
CEVAC® NEW L	primovaccination contre la maladie de Newcastle à 7 j
CEVAC® IBD L	vaccination contre la maladie de Gumboro à 14 j
CEVAC® UNI L	rappel contre la maladie de Newcastle à 21 j

5. Ablation de la bourse de Fabricius :

Afin de mettre en évidence une influence possible de la bourse de Fabricius sur l'activité antibactérienne des hétérophiles et plus spécialement sur l'activité antibactérienne des substances qui existent dans les granulations cytoplasmiques, une ablation de la bourse de Fabricius a été réalisée chirurgicalement suivant la technique décrite par Chang et al. en 1957. Le duvet de la région située au dessus du cloaque a été soigneusement enlevé suivi d'une désinfection à la Bétadine. Une légère pression avec le pouce et l'index est appliquée au dessus du cloaque suivie d'une incision d'environ 0,5 cm avec la pointe du bistouri ; l'étape suivante consiste en l'extériorisation de la bourse et l'ablation de celle-ci par son point d'attache avec l'intestin. L'opération est finalisée par la mise en place d'un point de suture (figure 3) et la désinfection de la plaie par la Bétadine pour éviter une éventuelle contamination. L'ablation de la bourse de Fabricius a été réalisée le premier jour après l'éclosion sur un lot de 30 sujets.



Figure 3: Les étapes principales de la réalisation de l'ablation de la bourse de Fabricius
1: site de l'opération 2: incision 3: extériorisation et excrèse de la BF 4: suture de la plaie 5: bourses de Fabricius

6. Frottis sanguins :

6.1. Prélèvements sanguins :

Les prélèvements sanguins ont été effectués à partir de la veine alaire chez les sujets de grande taille (figure 4) alors que chez les poussins les prélèvements sont plus commodes à partir de la veine jugulaire droite au détriment de la jugulaire gauche qui est plus profonde et qui sont rendues faciles à cet âge par la contention du poussin avec la main gauche (figure 5). Les prélèvements sanguins sont pratiqués sans anticoagulant et suivis par la réalisation extemporanée des frottis sanguins afin de conserver la taille ainsi que la morphologie des cellules dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et éviter tous types de changements morphologiques des granulations cytoplasmiques.



Figure 4 : Prélèvement sanguin à partir de la veine brachiale

Quel que soit le lieu de réalisation des prélèvements sanguins, veine jugulaire ou veine alaire, il s'ensuit parfois une effusion de sang avec formation d'hématomes, ces derniers n'ont aucun effet sur l'état clinique apparent du sujet et se résorbent dans un délai d'une semaine en moyenne. La formation des hématomes est favorisée par la finesse de l'appareil tégumentaire et sa grande mobilité sur les plans sous-jacents. Afin d'éviter et minimiser la formation de ces hématomes, une bonne contention est préconisée et le prélèvement doit être effectué avec une pression modérée tout en évitant la sortie de l'aiguille en dehors des veines.



Figure 5 : Prélèvement sanguin à partir de la veine jugulaire

6.2. Réalisations des frottis :

C'est une étape clé dans les études hématologiques et elle est garante de la meilleure interprétation des changements hématologiques, le frottis sanguin doit occuper les deux tiers de la lame et aussi le frottis doit avoir trois parties à savoir la tête, le corps et la queue (figure 8). Cette étape consiste à déposer une goutte de sang près de l'extrémité libre de la lame (figure 6) et à mettre une deuxième lame, de préférence à bords rodés, avec un angle de 45° et avec un geste vif et rapide on essaye d'étaler le sang avant l'arrivée aux bords de la deuxième lame, les frottis sanguins de mauvaise qualité sont écartés sur place. La lame est ensuite secouée modérément pour assurer un séchage rapide et complet.



Figure 6 : Réalisation des frottis sanguins

6.3. Coloration des frottis :

La coloration des frottis sanguins initialement effectuée avec le MGG (May-Grünwald Giemsa) donne des résultats insatisfaisants.

La coloration utilisée est la coloration de Wright qui est de loin la plus appropriée pour les frottis sanguins des volailles. La technique de coloration utilisée est celle de Campbell, 1995.

Une première étape consiste à préparer la coloration de Wright comme suit :

- Préparation de la solution du colorant de Wright : Dissoudre 0,1g de la poudre du colorant de Wright dans 60 ml de méthanol absolu et laisser reposer dans un flacon brun parfaitement étanche pendant 2 semaines. Filtration de la solution juste avant l'utilisation.
- Préparation du tampon de Wright : ce tampon est obtenu par dissolution de 3,80g de phosphate de sodium disodique (Na_2HPO_4) et 5,47g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) dans 500 ml d'eau distillée. Puis ramener le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.

La deuxième étape est la coloration proprement dite par recouvrement.

Les frottis sanguins préalablement séchés sont déposés sur un support de coloration parfaitement horizontale et la coloration de Wright a été faite de la manière suivante :

1. Couvrir les frottis avec la solution du colorant de Wright et laisser agir pendant environ 3 min.
2. Ajouter une quantité égale du tampon de Wright et laisser agir 2-6 min jusqu'à l'apparition d'une couche verte métallique à la surface.
3. Rinçage avec délicatesse des frottis pour éliminer le colorant, le rinçage est effectué avec une pissette remplie d'eau distillée.
4. Séchage des lames à la température ambiante.

7. Numération différentielle des leucocytes :

La numération différentielle des leucocytes chez les volailles est souvent pratiquée manuellement à cause de l'absence et de la rareté d'automates pour les études hématologiques pour cette espèce.

Un nombre de 100 leucocytes a été comptabilisé, en utilisant l'appareil Dosatec DBC 108

(figure 7), sur les frottis sanguins des trois groupes. Les champs d'observation sont localisés dans les zones des frottis sanguins où il y a absence de superposition de cellules (figure 8).

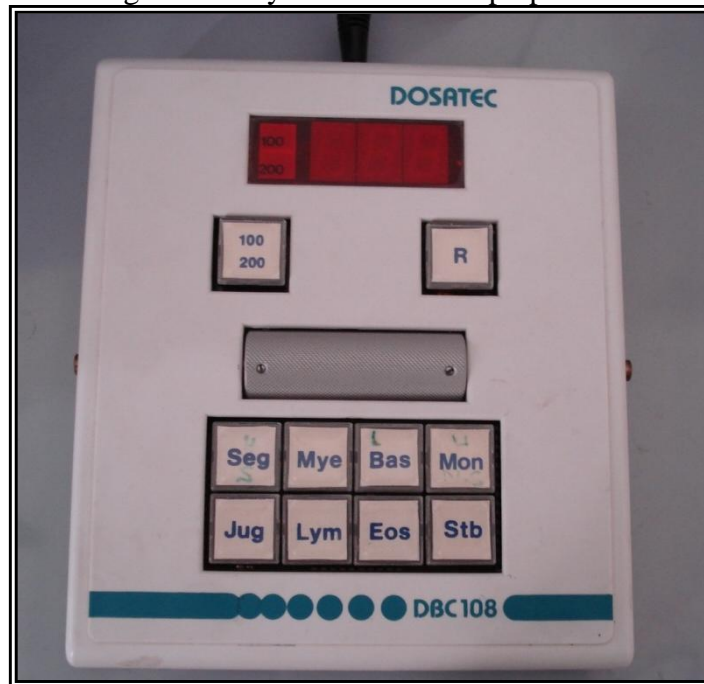


Figure 7 : Appareil pour la numération différentielle

8. Etude morphométrique des hétérophiles :

Outre l'utilisation fastidieuse et monotone du micromètre oculaire, d'autres difficultés de mesure de structures non linéaires rendent l'utilisation de l'instrument en question en voie de disparition surtout avec la progression technologique exponentielle et l'avènement et la généralisation de microscopes ultraperformants.

Des images d'hétérophiles sont numérisées (15 hétérophiles/frottis et 5 frottis /lot) et les mesures de la superficie sont effectuées avec un logiciel spécial Adobe Photoshop CS3 extended version 10.0 (2007). Ce logiciel permet de mesurer non seulement les dimensions linéaires comme le diamètre, qui reste estimatif par rapport à la forme irrégulière des cellules; il permet également des mesures qui nécessitent des calculs assez compliqués comme le périmètre et la surface des cellules. Cette dernière est plus représentative quant à la recherche de changements morphologiques de taille surtout lorsqu'il s'agit des cellules avec une forme géométrique irrégulière (figure 9).

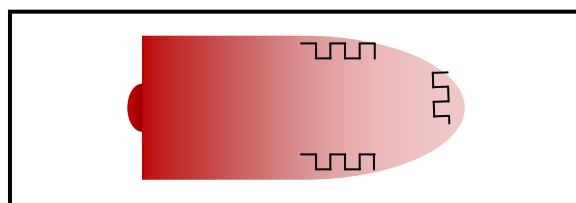


Figure 8 : Frottis sanguin et zone de lecture (en méandre)

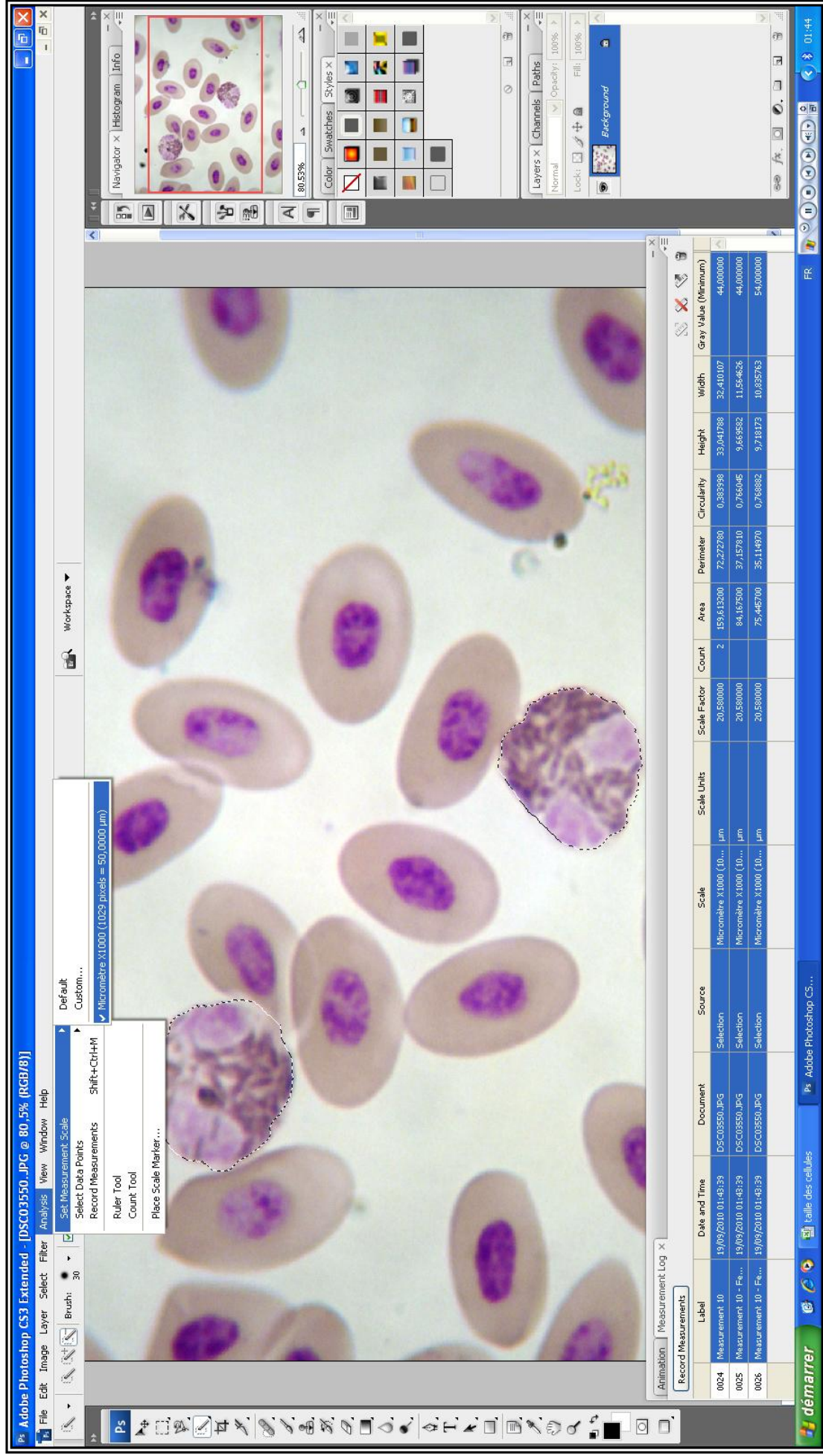


Figure 9 : Interface du logiciel pour les mesures

9. L'extraction des granules cytoplasmiques :

9.1. Injection d'amidon en intrapéritonéale et récupération des hétérophiles :

Les hétérophiles, dont on veut connaître l'activité antibactérienne, sont récupérés pendant la phase exsudative d'une inflammation provoquée par l'injection d'une solution d'amidon dans la cavité péritonéale. D'après les travaux réalisés par Harmon et son équipe en 1994 cette injection est réalisée à partir du 35ème jour d'âge. Le temps optimal pour avoir un exsudat riche en hétérophiles est de 20 à 22 heures après l'injection ; dépassé ce laps de temps un afflux important de macrophages est marqué. La solution d'amidon à 3% stérilisée par autoclavage puis laissée dans un bain marie à 37°C, ensuite injectée minutieusement suivant la technique décrite par Sabet et al., 1976 en prenant soin d'éviter les sacs aériens. Le lavage de la cavité péritonéale a été fait dans le laps de temps susmentionné par une solution de tampon phosphate salin (phosphate buffered saline : PBS, pH : 7,2) et qui a pour but de récupérer le liquide inflammatoire avec les cellules qui y existent.

Le lavage de la cavité péritonéale se déroule de la façon suivante :

- Une quantité de 70 ml de PBS est injectée à l'intérieur de la cavité péritonéale.
- Léger massage de la cavité abdominale
- Introduction, à travers une boutonnière faite à la cavité péritonéale, d'un tube à centrifuger en polypropylène fond conique préalablement perforé pour assurer la pénétration du liquide.
- Aspiration du liquide qui existe à l'intérieur du tube au moyen d'une seringue de 10 ml munie d'un tuyau en polypropylène
- Le liquide aspiré est déposé dans des tubes à centrifuger fond conique

9.2. Purification des hétérophiles :

L'exsudat inflammatoire contient, en plus des hétérophiles, d'autres leucocytes. Pour séparer les hétérophiles des autres leucocytes les étapes suivantes sont nécessaires :

- Le liquide récupéré de la cavité péritonéale est laissé environ 5 minutes pour la sédimentation des débris. Le sédiment est éliminé alors que le surnageant est

récupéré. Cette étape est suivie d'une centrifugation (centrifugeuse réfrigérée : Sigma 3K10) à 250 x g pendant 10 minutes pour la précipitation des cellules qui seront récupérées et lavées trois fois par le PBS.

9.3. Désintégration ultrasonique des hétérophiles :

Cette étape a pour but de détruire les membranes cytoplasmiques pour la libération des granulations intracytoplasmiques. Elle est réalisée par passage aux ultrasons (BANDELIN sonopuls HD 200) (des salves de 90% pendant 15 secondes trois fois avec une puissance KE76/D). Le tube contenant les cellules est émergé dans un bain de glace pendant la sonification pour éviter la dénaturation des substances recherchées (figure 10).



Figure 10 : Désintégration ultrasonique des hétérophiles

9.4. Extraction des granules cytoplasmiques :

La récupération des granules est réalisée après sédimentation des débris cellulaires (membranes plasmiques, noyaux...) par centrifugation à une vitesse de 800 x g à 4°C pendant 30 min. Le surnageant issu de la première centrifugation et qui contient les granules cytoplasmiques est centrifugé à une vitesse de 27000 x g dans une centrifugeuse réfrigérée (Sigma 3K30) à 4°C pendant 30 minutes pour assurer la sédimentation des granules cytoplasmiques (figure 11). Les granules ainsi obtenus vont subir l'extraction dans l'acide acétique 5% à 4°C avec un agitateur magnétique pendant 16h afin d'obtenir les substances qui existent à l'intérieur des granules intracytoplasmiques. Cette extraction est suivie d'une centrifugation à une vitesse de 27000 x g à 4°C pendant 30 minutes, le surnageant qui contient les substances des granulations est récupéré tandis que le culot a subi une deuxième extraction suivie d'une centrifugation.

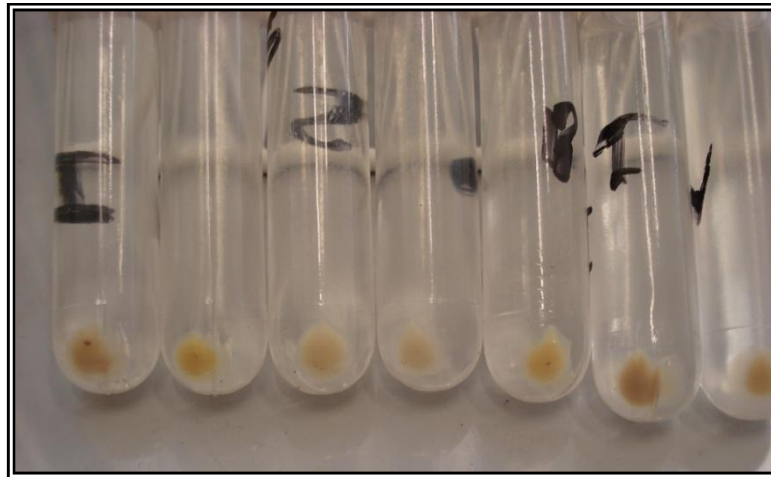


Figure 11: Les granulations cytoplasmiques après centrifugation à 27000 x g

9.5. Dialyse de l'extrait des granules :

Elle est réalisée dans des boudins de dialyse Spectra/Por® CE avec des pores de 1000 Da et dont la capacité est de 0,81 ml/cm, cette dialyse a été faite dans l'acide acétique à 1% avec un agitateur magnétique et à 4°C pendant 16 h. Cette étape consiste à éliminer les sels et toutes les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da.

9.6. Lyophilisation :

Cette étape a pour but de concentrer les substances obtenues par extraction des granules cytoplasmiques après dialyse, elle permet également une meilleure conservation des extraits pour une utilisation future et éviter leur détérioration.

Le premier stade de la lyophilisation consiste à une congélation rapide des produits à lyophiliser, suivi d'un deuxième stade qui est la dessiccation et qui consiste à sublimer les échantillons et donc éliminer la glace qui y existe.

9.7. Quantification des protéines dans les échantillons :

La méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) a été préférée suite à sa stabilité et sa sensibilité remarquable pour le dosage des protéines surtout lors de concentrations assez faibles.

La courbe étalon a été achevée en respectant les étapes suivantes :

- Une gamme étalon de concentrations a été effectuée à partir d'une solution-mère de l'albumine du sérum bovin (BSA), les concentrations utilisées sont (5, 10, 20, 40, 80, 100, 120, 150, et 200) $\mu\text{g/ml}$.
- Préparation des réactifs :

Solution A : 2 g de Na_2CO_3 dans 100 ml de NaOH à 0,1 N, cette normalité est obtenue par dissolution de 0,4 g de NaOH dans 100 ml d'eau distillée.

Solution B : 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml de tartrate de sodium et de potassium (tartrate Na-K) avec une concentration de 0,1%.

Solution C : préparée extemporanément 50 ml de solution A + 1 ml de solution B

Réactif D (réactif de FOLIN-CIOALTEU) : réalisée extemporanément, une dilution avec l'eau distillée du réactif de Folin (1:1).

- Dosage :
 - 1 ml de chaque concentration-étalon est transféré vers un tube à essai sec et propre.
 - Une quantité de 5 ml de la solution C est rajoutée à chaque tube, les tubes sont rapidement homogénéisés en utilisant un vortex et laisser reposer à température ambiante pendant 15 min.
 - 0,5 ml du réactif D est additionné aux tubes préalablement reposés puis rapidement homogénéisés et la solution est laissée reposer à température ambiante pendant 30 min.
 - L'absorption de la solution bleue a été effectuée à une longueur d'onde de 600 nm et avec l'utilisation d'un spectrophotomètre " Shimadzu UV 120-01" (figure 12)

La courbe étalon est tracée en utilisant le logiciel Microsoft Office Excel 2007 (figure 13) et qui présente un coefficient de corrélation assez élevée ($r = 0,99$) entre la concentration et

l'absorption à 600 nm, Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'utilisation de l'albumine issue des œufs.

Il est possible de quantifier les protéines des échantillons en suivant les étapes précités et en utilisant la formule de la courbe de tendance ($y = 0,001853x$).



Figure 12: Spectrophotomètre (Shimadzu UV 120-01)

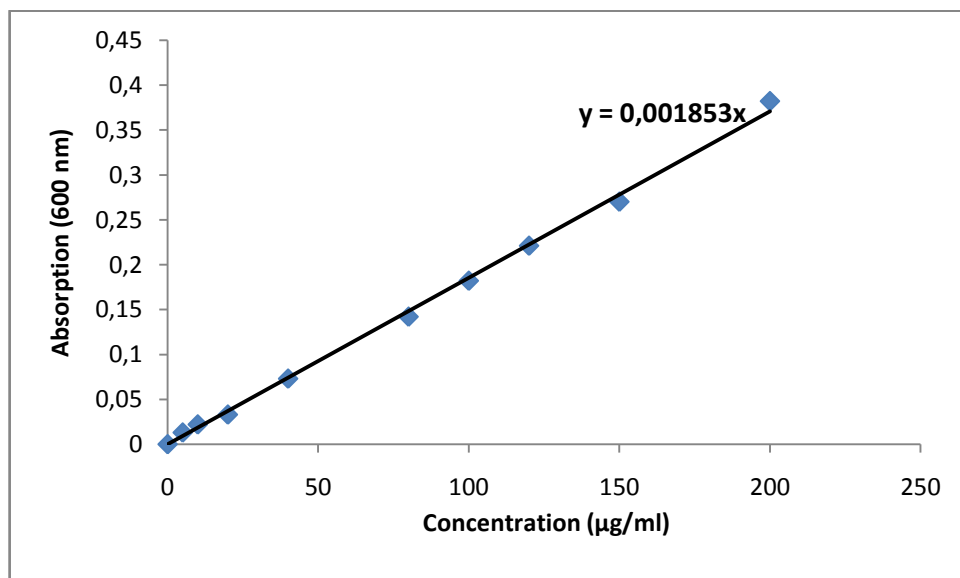


Figure 13: Courbe étalon de la concentration des protéines

10. Electrophorèse de l'extrait des granulations :

Pour une meilleure vérification de la pureté, de la caractérisation ainsi que de la qualité des substances faisant l'objet d'extraction à partir des granulations intracytoplasmiques, une électrophorèse de zone a été utilisée dans cette partie d'étude et elle est réalisée sur un support en gel de polyacrylamide traité à l'acide et à l'urée (AU-PAGE : acide urea-polyacrylamide gel electrophoresis) suivant la technique décrite par Harwig et al., 1993.

Le protocole utilisé pour la réalisation de ce type d'électrophorèse, qui est assez spécifique pour ce genre de substances, est le suivant :

- Préparation du gel : Ce type d'électrophorèse permet la séparation des substances en fonction du poids moléculaire et de la charge électrique, ainsi ce type permet de séparer deux protéines avec un poids moléculaire identique mais une charge différente. On a utilisé que le gel de séparation sans qu'il ait besoin d'un gel de concentration, le gel est préparé extemporanément de la façon suivante (Steinberg et Lehrer, 1997) :

Composé	Quantité
Urée	2,8 g
Eau distillée	18,0 ml
60 % Acrylamide + 1,6 % bis-acrylamide	8,9 ml
Acide acétique	43,2%
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), 4% (v/v)	5,33 ml
Persulfate d'ammonium, 10%	0,8 ml

On a procédé à une dégazéification en utilisant une pompe à vide et un Büchner pour éliminer l'air emmagasiné dans la solution et qui risque de contrarier le bon déroulement de l'électrophorèse. Les deux dernières substances (TEMED, persulfate d'ammonium) sont ensuite rajoutées pour assurer la polymérisation.

- Empilement du gel : les tubes en verre où l'électrophorèse a été effectuée sont préalablement et parfaitement lavés et rincés, une de leur extrémité a été fermée au moyen de parafilm. Ces tubes sont remplis, en utilisant une pipette Pasteur, en prenant soin d'éviter la formation des bulles d'air, les tubes sont remplis aux 3/4. Juste après le remplissage des tubes avec la matrice d'électrophorèse, une petite quantité d'eau distillée a été rajoutée

soigneusement à chaque tube à la surface de la solution du gel sans mélanger à une profondeur de 3-4 mm pour donner une surface plane au gel.

La polymérisation a lieu dans les 30 min qui suivent et se traduit par la formation d'une ligne réfractive entre l'eau rajoutée et le gel polymérisé.

- Préparation du tampon d'électrophorèse : le tampon d'électrophorèse utilisé est l'acide acétique à 5 % qui est préparé à partir de l'acide acétique glacial. Les deux réservoirs sont remplis par le même tampon :

- Acide acétique glacial : 100 ml
- Eau distillée : 1900 ml

- Migration pré-électrophorétique : l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide traité à l'acide et à l'urée se fait à pôles inversés (cathode attaché au réservoir du bas et anode au réservoir du haut), les tubes sont placés dans l'appareil d'électrophorèse (figure 14) (Disc Electrophoresis – Phywe), une pré-électrophorèse sans échantillons a été effectuée en vue d'éliminer le TEMED. Cette étape se fait à 150 Volts pendant 2 h, à la fin le tampon d'électrophorèse est remplacé par un nouveau tampon.

- Préparation des échantillons : les échantillons sont mélangés à leur tampon (2:1). La composition du tampon des échantillons est la suivante :

- Urée : 54,04 g
- Acide acétique glacial : 5 ml
- Eau distillée : ajouter la quantité désirée pour atteindre le volume final de 100 ml
- Vert de méthyle

Ce tampon de l'échantillon permet à la fois de donner une certaine densité à l'échantillon qui se dépose ainsi facilement au fond des puits et ne flotte plus et il permet aussi de suivre l'avancement de l'électrophorèse grâce à la substance colorée qu'il contient (vert de méthyle).

- Dépôt des échantillons et électrophorèse : après avoir mélangé les échantillons et le tampon, c'est le dépôt qui consiste à mettre les échantillons doucement au moyen d'une micropipette au fond des logettes. L'électrophorèse se fait avec une intensité de 2,5 mA/tube d'une façon continue et en suivant la migration au moyen du déplacement du vert de méthyle et l'électrophorèse est arrêtée lorsque cette substance approche l'extrémité inférieure du tube.

- Décollement des gels : après la migration, les gels cylindriques sont dégagés de leurs étuis en utilisant un bac rempli d'eau et en injectant de l'eau entre le gel et le tube cylindrique au moyen d'une seringue avec aiguille montée jusqu'à leur libération.
- Coloration : la révélation se fait dans la solution ci-dessous et en utilisant un bac de coloration adapté et un agitateur IKA VIBRAX – VXR afin d'accélérer le temps de coloration. La composition de la solution de coloration utilisée est la suivante :
 - Blue de Commassie R-250 : 0,25 g
 - Méthanol : 125ml
 - Acide acétique glacial : 25 ml
 - Eau distillée : 100ml
- Décoloration : elle se fait plusieurs fois de suite jusqu'à l'obtention d'un fond assez clair en utilisant la solution de décoloration dont la composition est la suivante :
 - Méthanol : 100 ml
 - Acide acétique glacial : 100 ml
 - Eau distillée : 800 ml

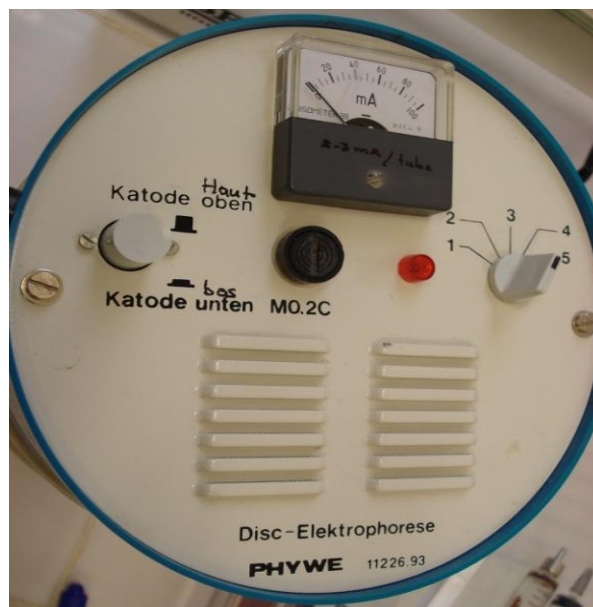


Figure 14: Appareil d'électrophorèse verticale

11. Etude de l'activité antibactérienne :

11.1. Etablissement des courbes étalons pour la quantification des UFC/ml :

Dans le but de connaître le nombre des unités formant colonies par millilitre (UFC / ml) des courbes standards sont réalisées.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 et *Escherichia coli* 25922: afin d'obtenir des UFC en phase exponentielle de croissance, phase où les bactéries sont très sensibles, on a procédé comme suit :

1. Ensemencement des bactéries dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive suivi d'une incubation de 24h dans une étuve à 37°C.
2. Une colonie a été transférée à partir d'une boîte de pétri vers 50 ml d'un bouillon trypticase soja (TSB) stérile puis incubation à 37°C dans un bain marie agité pendant 18-24h pour atteindre la phase stationnaire de la croissance bactérienne.
3. Une quantité de 1 ml de la culture en phase stationnaire a été transférée vers un flacon contenant 49 ml de TSB frais et incubation pendant 2,5 à 3 h dans un bain marie agité.
4. La subculture obtenue est transférée à un tube à centrifuger fond conique et centrifugation pendant 10 min à 4°C à 880 x g.
5. Le culot bactérien est lavé une fois (10 min, 4°C, environ 880 x g) avec 10 ml de tampon phosphate de sodium pH 7,4 réfrigéré et stérile, et resuspension dans 5 ml du même tampon réfrigéré.
6. Une quantité suffisante a été prélevée pour mesurer la densité optique à 620 nm avec un spectrophotomètre LKB Novaspec Model 4049.
7. Des dilutions décimales successives effectuées à partir de la subculture lavée et une quantité de 50 µl est prélevée à partir des trois dernières dilutions (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) et ensemencée en utilisant un étaloir en verre sur gélose nutritive pour *Staphylococcus aureus* et sur gélose au désoxycholate pour *Escherichia coli*.
8. Incubation à 37°C pendant environ 24 h et dénombrement des UFC.
9. Etablissement des courbes : absorption à 620 nm versus UFC/ml en utilisant le Microsoft Office Excel 2007 avec l'insertion de la courbe de tendance ainsi que sa formule (figure 15, 16).

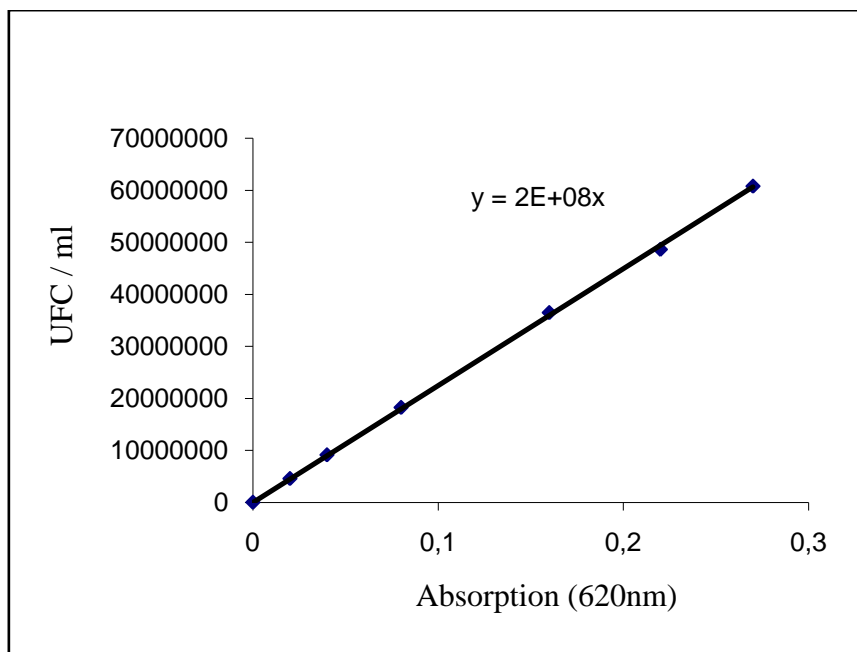


Figure 15: Courbe standard pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tampon phosphate de sodium 10 mmol pH=7,4

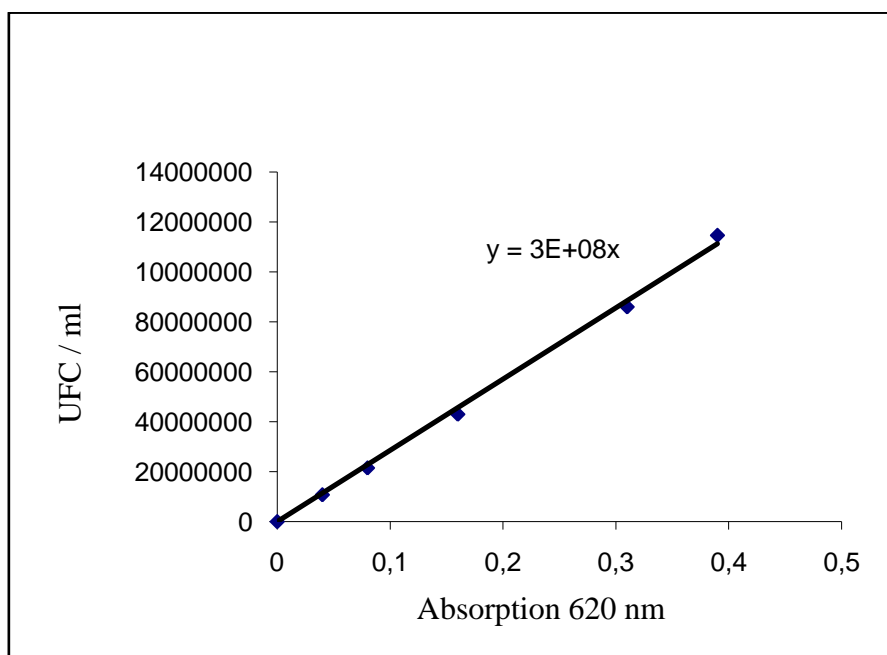


Figure 16: Courbe standard pour *Escherichia coli* ATCC 25922 tampon phosphate de sodium 10 mmol pH=7,4

11.2. Tests de l'activité antibactérienne :

Technique ultrasensible de diffusion radiale : L'activité antibactérienne réalisée par une technique ultrasensible de diffusion radiale selon la technique décrite par Lehrer et ses

collaborateurs en 1991 en utilisant des souches standards : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et d'*Escherichia coli* ATCC 25922.

Protocole :

1. Une colonie a été transférée à partir d'une boîte de pétri vers 50 ml d'un bouillon trypticase soja (TSB) stérile puis incubation à 37°C dans un bain marie agité pendant 18-24h pour atteindre la phase stationnaire de la croissance bactérienne.
2. Une quantité de 1 ml de la culture en phase stationnaire a été transférée vers un flacon contenant 49 ml de TSB frais et incubation pendant 2,5 à 3 h dans un bain marie agité.
3. La subculture obtenue est transférée à un tube à centrifuger fond conique et centrifugation pendant 10 min à 4°C à 880 x g.
4. Le culot bactérien est lavé une fois (10 min, 4°C, environ 880 x g) avec 10 ml de tampon phosphate de sodium pH 7,4 réfrigéré et stérile, et resuspension dans 5 ml du même tampon réfrigéré.
5. Une quantité suffisante a été prélevée pour mesurer la densité optique à 620 nm et connaître le nombre d'UFC en se basant sur les formules des courbes étalons préétablies pour chaque souche bactérienne.
6. Une quantité de 8 ml de gel à 1% d'agarose avec 0,1% TSB et 10⁶ UFC est versée en premier lieu dans une boîte de pétri en verre sur une surface parfaitement horizontale.
7. Réaliser soigneusement des puits d'environ 3 mm de diamètre au moyen d'un emporte-pièce.
8. Mettre une quantité de 5 µl des extraits des granulations des hétérophiles dans les puits et éviter tout type de débordement.
9. Incuber dans une étuve à 37°C pendant 3 h pour assurer une meilleure diffusion des substances dans la couche bactérienne.
10. Après la diffusion, additionner une quantité de 7ml d'un autre type de gel d'agarose à 1 % et contenant 6 % de TSB.
11. Incuber dans une étuve à 37°C pendant 18 h
12. Mesure des zones d'inhibition

12. L'activité antibactérienne contre *Salmonella enteritidis* et test ELISA :

Un challenge bactérien est effectué par administration orale d'une souche de *Salmonella enteritidis* suivant la technique décrite par Babu et ses collaborateurs (2004). Brièvement, une quantité de 10^9 UFC / sujet est administrée à 35 j d'âge à des lots témoins et sans bourse de Fabricius. La période post-inoculation consiste à observer soigneusement les sujets et des prélèvements sanguins à partir de la veine alaire sont effectués 10 j après, le sérum récupéré est rapidement congelé en vue d'une utilisation ultérieure pour le test ELISA dont le but est d'enquêter sur la réaction des animaux vis-à-vis du challenge bactérien et principalement la capacité à produire des anticorps spécifiques.



Figure 17 : Kit ELISA pour *Salmonella enteritidis* (IDEXX)

La détection des anticorps anti-*Salmonella enteritidis* est effectuée au moyen d'un kit ELISA IDEXX (figure 17) tandis que la lecture des microplaques est effectuée avec un lecteur ELISA (Metertech Σ 960) (figure18) pour la détection de ces anticorps.



Figure 18 : Lecteur ELISA Metertech Σ960

13. Clairance de l'encre de Chine :

L'encre de Chine (Rotring Art 591017) a été injecté aux animaux par voie intraveineuse en vue de tester le pouvoir de phagocytose et aussi la clairance de cette substance, ce test est réalisé suivant la technique décrite par Sarker et al, 2000; Chao et Lee en 2001; Li et al., 2001 avec quelques modifications.

Toutefois, la pratique de l'injection intraveineuse de l'encre de Chine est assez délicate et nécessite une bonne maîtrise de la technique. Une injection erronée en sous cutanée peut avoir des conséquences directes sur la clairance de l'encre de Chine de la circulation sanguine, aussi une injection extravasculaire ou une fuite de ce liquide complique énormément le sort et la suite de l'injection par étalement de cette substance qui masque complètement la veine.

Le protocole utilisé est le suivant :

1. Centrifugation de l'encre à (2000 x g, 30min) pour éliminer les particules qui peuvent exister.
2. Récupérer le surnageant dans un tube stérile et laisser le tube dans un bain marie à 40°C.
3. Injection IV dans la veine alaire de 1 ml/kg de poids vif
4. Des prélèvements sanguins de 100 µl sont effectués avant l'injection (0 min) et à 5, 10 et 15 min après l'injection de l'encre de Chine.

5. Le sang prélevé est transféré directement dans des tubes contenant 2 ml de citrate de sodium à 1 %.
6. Centrifugation 850 x g pendant 10 min.
7. Récupération du surnageant et mesure de l'absorption à 675 nm avec un spectrophotomètre " Shimadzu UV 120-01 " (figure 12) en utilisant l'échantillon t = 0 min pour faire un "blanc".

14. Electrophorèse des protéines sériques :

Pour compléter cette étude et afin de déterminer et rechercher une influence possible de la BF sur les protéines sériques, une électrophorèse horizontale est réalisée sur bandes d'acétate de cellulose (figure 19).

L'analyse densitométrique des bandes obtenues est effectuée au moyen d'un logiciel : MESURIM.

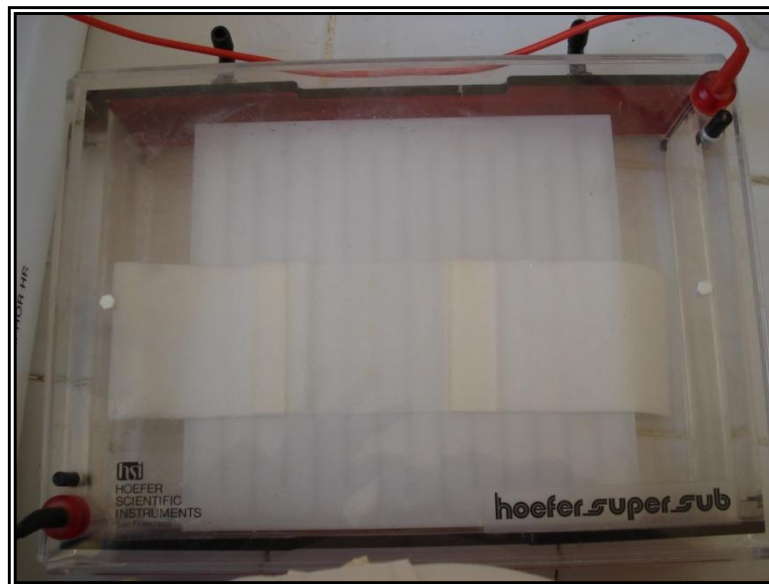


Figure 19 : Appareil d'électrophorèse horizontale (Hoefler super sub)

15. Analyse des résultats :

L'analyse statistique des résultats obtenus est effectuée au moyen de Microsoft Office Excel 2007 et SigmaPlot 11.0 (2008). Les tests utilisés sont principalement le Test t de Student et aussi l'ANOVA.

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'ablation de la bourse de Fabricius :

L'ablation de la bourse de Fabricius, organe central du système lymphoïde, avec un rôle clé dans les mécanismes de défense pourrait avoir une influence directe tant sur le taux de mortalité que sur l'évolution pondérale des sujets.

1.1. Effet sur la mortalité :

Durant cette étude, on a enregistré les taux de mortalité représentés dans le tableau et l'histogramme suivants :

Tableau 1 : Les taux de mortalité

	Nombre des sujets	Total des sujets morts	Taux de mortalité (%)
Sans BF	29	8	27,59
Incisé	30	5	16,67
Vacciné	16	3	18,75
Témoin	25	8	32,00

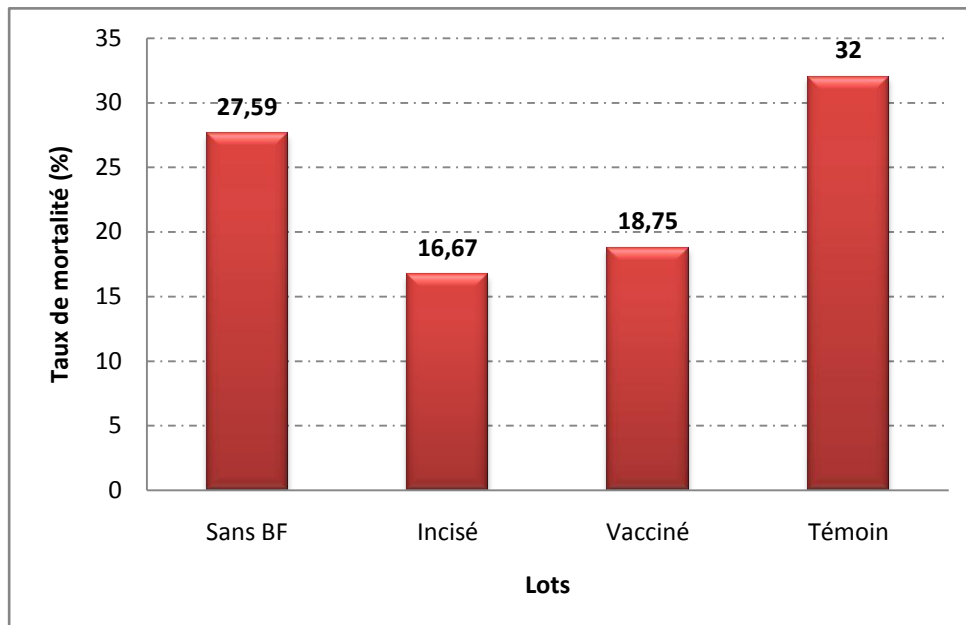


Figure 1: Taux de mortalité (%)

Une première lecture des résultats montre que l'ablation de la BF n'a aucune influence sur le taux de mortalité malgré l'absence d'antibiothérapie de couverture après l'ablation de cette glande.

Pour une meilleure compréhension de la période critique d'élevage et qui peut mettre en péril la vie des sujets, le taux de mortalité est représenté suivant les tranches d'âge (tableau 2 ; figure 2).

Tableau 2 : La mortalité suivant les tranches d'âge

Lots Age	sans BF	Incision	Témoin	Vacciné
0-7j	3	4	3	0
8-14j	4	0	3	3
15-21j	0	0	1	0
22-28j	0	1	1	0
29-34j	1	0	0	0
Total	8	5	8	3

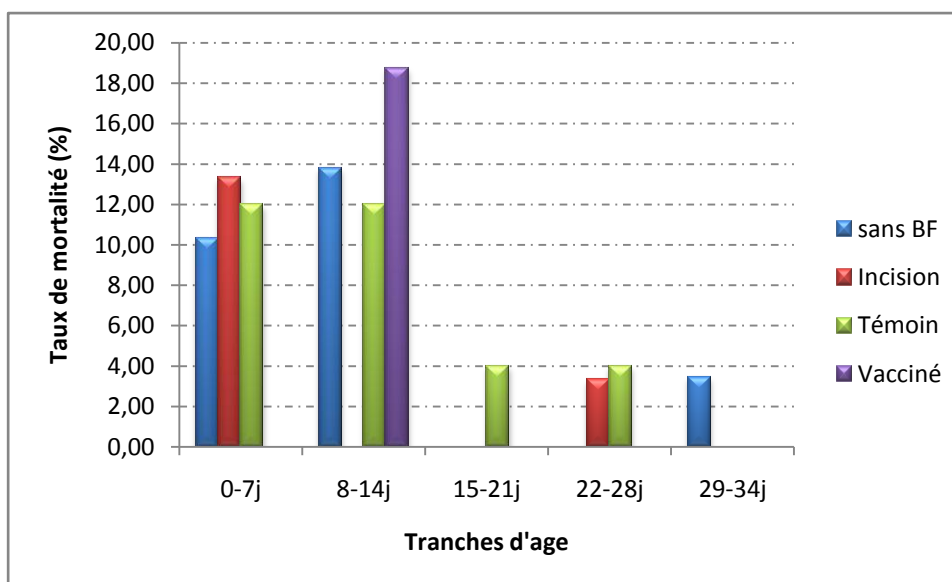


Figure 2: Taux de mortalité suivant les tranches d'âge

Le taux de mortalité observé se ressemble dans les quatre lots et on a observé une forte mortalité durant les deux premières semaines. Durant les neuf premiers jours d'âge on a enregistré :

- Sept mortalités parmi les 8 mortalités enregistrées durant toute la période expérimentale dans le lot des sujets ayant subi l'ablation de la BF.
- Quatre mortalités parmi les 5 mortalités enregistrées durant toute la période expérimentale pour le lot incisé
- Quatre mortalités parmi les 8 mortalités enregistrées durant toute la période expérimentale au sein du lot témoin
- Aucune mortalité dans le lot vacciné.

L'étude de la mortalité suivant les tranches d'âge montre que 62,5% de la mortalité a lieu durant les neufs premiers jours.

La mortalité des poussins durant les premiers jours est un phénomène assez fréquent en élevage avicole, mais dans notre étude elle est encore accentuée par l'absence d'antibiothérapie préventive qui est souvent utilisée en médecine aviaire pour protéger les poussins durant les premiers jours de vie, période assez critique où leurs systèmes de défense ne sont pas encore en pleine fonction ainsi que leur système de thermorégulation qui est assez fragile durant cette même période.

La mortalité, remarquablement élevée durant les 9 premiers jours, chez le groupe sans BF peut être expliquée par l'ablation de la BF et les suites post-opératoires qui en découlent ainsi que l'absence d'aucune couverture d'antibiotique pour éviter les éventuelles interférences.

Les résultats montrent que la bursectomie durant les 24 h qui suivent l'éclosion n'a pas d'influence sur la mortalité et ceci malgré l'absence d'antibiothérapie post-opératoire d'où l'utilisation de cette technique de bursectomie pour les investigations et recherches sur cette glande. Ces résultats sont en complète concordance avec les travaux de Romppanen et Sorvari en 1980 où la bursectomie est réalisée par l'application journalière de la colchicine au niveau des lèvres anales après l'éclosion pendant 4 j.

1.2. Effet sur l'évolution pondérale :

La pesée de 10 sujets choisis au hasard de chaque lot est effectuée chaque semaine en moyenne jusqu'à l'âge de 34 j. Les tableaux et les figures suivants illustrent l'évolution pondérale de chaque lot.

Tableau 3 : Poids des sujets au 3^{ème} jour (g)

Sujets	Incision (g)	Sans BF(g)
1	50,3	53,7
2	59,9	47,6
3	52,9	51,2
4	58,8	51,7
5	52,9	52,6
6	53,2	57,3
7	57,9	52,5
8	50,2	53,8
9	48,0	44,6
10	51,8	52,2
moyenne ± écart-type	53,59 ± 3,99	51,72 ± 3,48

Tableau 4 : Poids des sujets au 7^{ème} jour (g)

Sujets	Témoin et vacciné (g)	Incision (g)	Sans BF (g)
1	83,8	69	102,7
2	120,05	133,9	76,4
3	99,2	115,2	87,9
4	76,2	102	99,3
5	105,0	103	78,4
6	91,2	113	123,5
7	121,7	102,3	71,5
8	94,2	115,8	71
9	93	107,2	107,6
10	89,1	64,4	107,9
moyenne ± écart-type	97,35 ± 14,67	102,58 ± 21,16	89,19 ± 15,41

Tableau 5 : Poids des sujets au 15^{ème} jour (g)

Sujets	Témoïn	Vacciné	Incision	Sans BF
1	269,0	240,0	205,0	166,2
2	123,4	168,0	159,3	264,3
3	245,0	227,0	245,3	264,2
4	237,0	222,0	105,3	183,0
5	254,0	288,0	178,3	209,9
6	203,7	200,6	208,3	258,2
7	190,4	140,5	99,0	267,4
8	165,4	241,4	239,4	143,8
9	267,2	235,8	210,6	124,6
10	205,0	177,0	141,5	178,0
moyenne ± écart-type	216,01 ± 47,40	214,03 ± 43,05	179,2 ± 51,86	205,96 ± 54,45

Tableau 6 : Poids des sujets au 21^{ème} jour (g)

Sujets	Témoïn	Vacciné	Incision	Sans BF
1	552,2	566,0	474,8	637,1
2	478,3	390,9	594,2	550,7
3	463,2	470,5	576,1	497,0
4	513,2	301,2	298,8	206,8
5	481,0	502,3	557,0	248,1
6	577,1	555,2	530,7	579,1
7	552,5	363,5	514,0	244,3
8	405,3	527,3	492,4	249,0
9	572,1	359,7	460,3	639,8
10	452,0	563,9	596,2	386,4
moyenne ± écart-type	504,69 ± 57,77	460,05 ± 98,26	509,45 ± 88,30	423,83 ± 176,34

Tableau 7 : Poids des sujets au 29^{ème} jour (g)

Sujets	Témoin	Vacciné	Incision	Sans BF
1	763,5	958,4	1094,0	403,8
2	664,3	1004,0	819,2	405,6
3	749,4	857,3	1049,7	1006,4
4	882,5	732,6	979,3	1009,1
5	813,3	956,4	590,5	825,7
6	821,6	996,3	867,4	1012,4
7	119,0	1022,2	934,3	695,5
8	442,8	950,9	961,8	1012,8
9	900,8	1008,0	912,7	1164,6
10	962,1	952,2	759,8	726,9
moyenne ± écart-type	711,93 ± 253,86	943,83 ± 87,70	896,87 ± 146,98	826,28 ± 265,04

Tableau 8 : Poids des sujets au 34^{ème} jour (g)

Sujets	Témoin	Vacciné	Incision	Sans BF
1	1364,2	1245,6	900,7	760,3
2	1326,5	1183,4	1415,9	586,7
3	1132,3	1074,5	1103,5	598,4
4	1306,4	1032,1	1328,2	1392,4
5	1293,4	1167,4	1186,7	1081,5
6	829,3	1292,7	1322,5	1524,6
7	1259,7	989,3	1316,9	1423,7
8	1325,5	1115,4	846,1	1086,3
9	1309,7	1316,2	1040,9	952,8
10	1533,2	1415,1	1291,0	1076,4
moyenne ± écart-type	1268,02 ± 182,91	1183,17 ± 135,17	1175,24 ± 195,36	1048,31 ± 332,85

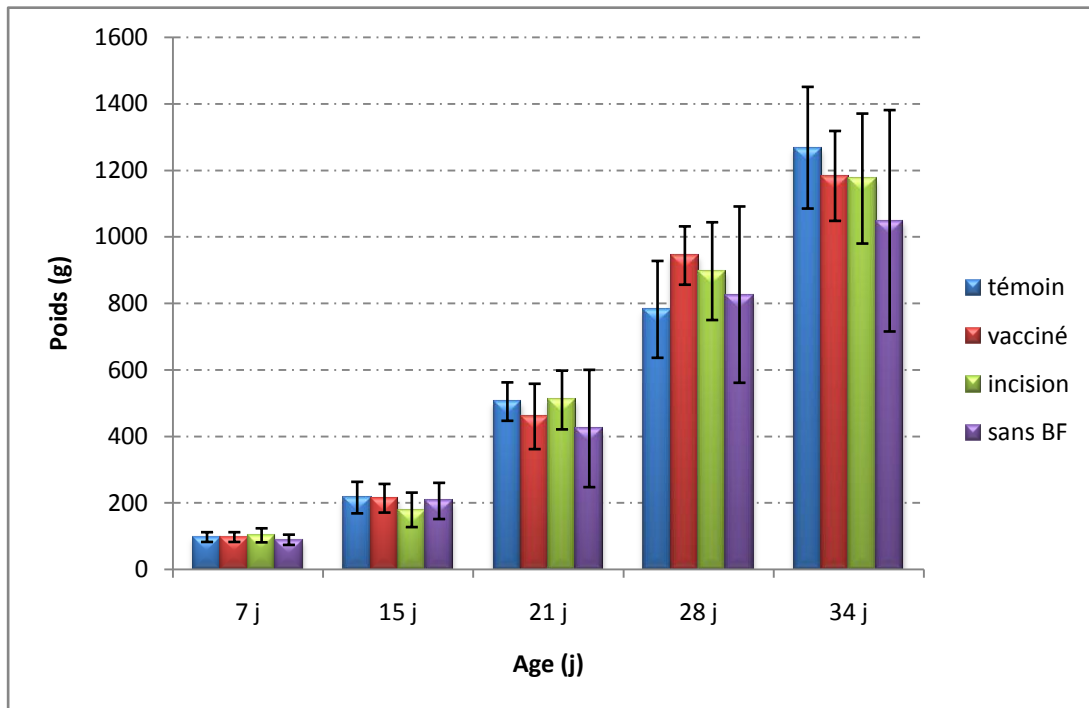


Figure 3: La croissance des poulets avec l'écart-type

L'analyse des résultats de l'évolution pondérale des sujets montre une évolution pondérale normale et semblable pour les quatre groupes au cours des trois premières semaines, mais au delà de la troisième semaine d'âge on note des différences de poids assez remarquables (figure 4).

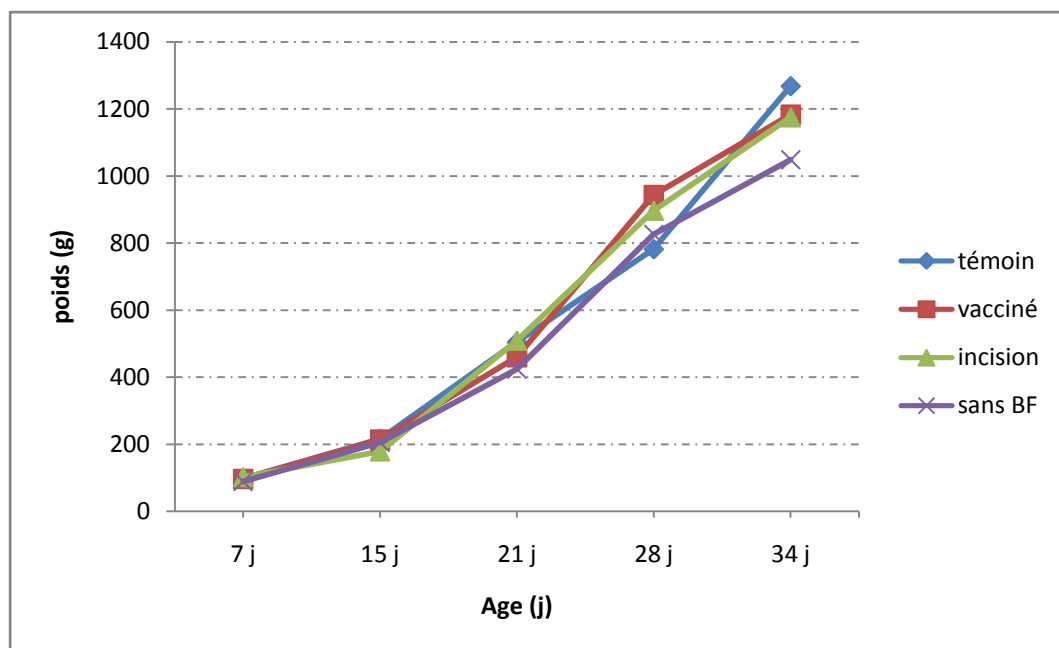


Figure 4: La courbe de croissance des sujets

L'écart-type représenté par la figure 3 est assez élevé chez le groupe des sujets ayant subi l'ablation de la bourse de Fabricius contrairement aux autres groupes, l'écart-type élevé s'explique par un faible degré d'homogénéité du lot et les sujets de ce groupe ont une hétérogénéité de poids assez remarquable. On suggère que cette hétérogénéité est la conséquence d'un affaiblissement de la capacité immunitaire des sujets suite à l'ablation d'un organe primaire du système immunitaire. Cet affaiblissement se manifeste au fil du temps par la diminution de la résistance des animaux aux attaques des microorganismes et aux autres agressions avec des répercussions directes sur l'évolution pondérale des sujets.

L'analyse statistique des résultats montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les quatre groupes durant les quatre premières semaines (lot témoin et le lot sans BF: $p = 0,089$). Ces résultats montrent que la BF n'a aucune influence sur l'évolution pondérale des sujets. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Romppanen et Sorvari en 1980. Les sujets du lot incision montrent une évolution pondérale presque identique au lot vacciné ce qui confirme que la plaie opératoire seule n'a pas d'influence sur l'évolution pondérale.

1.3. Effet sur le statut immunitaire :

La recherche d'une relation possible entre l'ablation de la BF et certains organes qui participent dans les phénomènes de défense et les réponses immunitaires nous a incité à réaliser le poids de ces organes (figure 5) ainsi que leur poids relatif (figure 6) qui est plus représentatif et qui permet de minimiser les différences individuelles surtout devant un échantillonnage assez réduit. Le poids vif des animaux ainsi que le poids des organes étudiés est représenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Poids vif des poulets et des organes à 35j

	Poids vif (g)	Foie (g)	Rate (g)	Bourse de Fabricius (g)
Témoin	630	21,7	0,5	1,4
	564	17,7	0,5	2
	603	22,3	1,1	1,5
Vacciné	689	20,1	0,3	1,9
	413	16,1	0,5	1,2
	758	26	0,6	2,4
Sans BF	734	20,5	0,5	-
	588	16,2	0,6	-
	604	18,1	0,4	-

Les résultats représentés dans l'histogramme suivant (figure 5) montrent que le poids des organes est presque identique chez les différents groupes et on note une simple différence au niveau du foie mais l'analyse statistique montre l'absence de différences significatives entre les trois groupes.

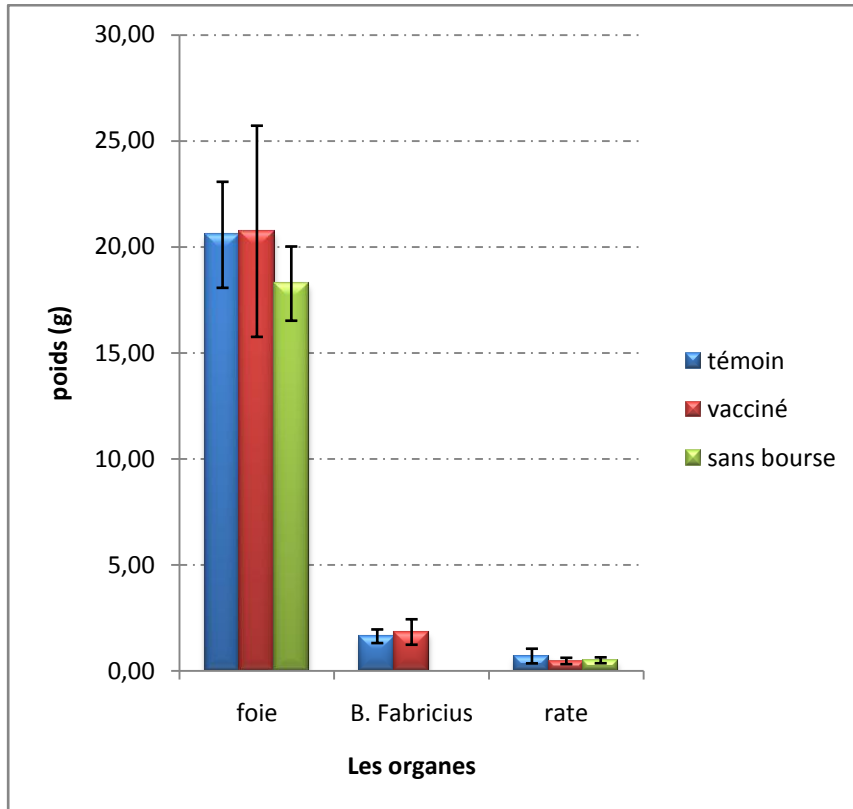


Figure 5: Poids vif de certains organes à 35j

Les résultats de l'étude du poids relatif des organes sus-cités (figure 6) et qui tient compte du poids vif des animaux ; montrent l'absence de différences significatives entre les trois groupes.

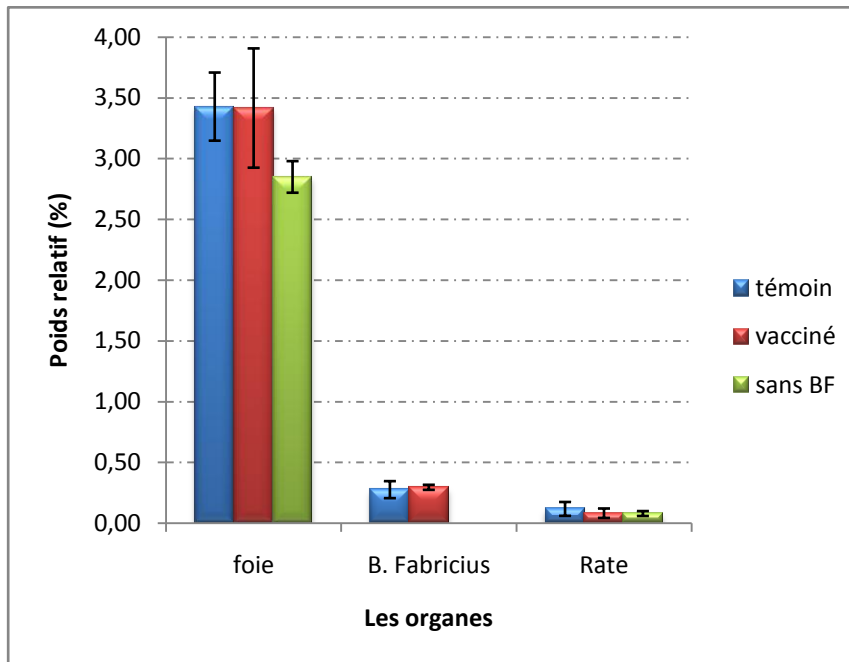


Figure 6: Poids relatif de certains organes

Ces résultats montrent l'absence d'une hypertrophie compensatrice de la rate en réponse à l'ablation de la BF ce qui confirme l'absence d'une interaction apparente entre la BF et cet organe lymphoïde (Romppanen et Sorvari, 1980).

2. Résultats de la coloration :

Lors de la réalisation des frottis sanguins et suite à la pression exercée au moment de l'étalement, certaines cellules sont écrasées et on assiste à une perte de l'intégrité de la membrane plasmique et les granulations cytoplasmiques sont facilement observées s'il s'agit de granulocytes (figure 13).

La bonne connaissance des éléments figurés du sang aviaire revêt un intérêt capital dans la bonne réalisation de l'hémogramme et principalement la formule numération sanguine. La bonne maîtrise des détails des éléments figurés du sang aviaire est une nécessité surtout avec le manque de couler d'hématologie et ceci même dans les pays les plus développés. Une enquête réalisée au Nord-Américain et qui intéresse 18 hôpitaux vétérinaires d'enseignement et 10 laboratoires de diagnostic privés, montre que seulement trois laboratoires utilisent des automates d'analyse multi-espèces 'Abbot Cell Dyn3500', le reste utilisent des techniques indirectes ou estimatives (Gaunt et al., 1995).

2.1. Les érythrocytes :

Contrairement à ceux des mammifères, les érythrocytes des poulets sont des cellules vraies nucléées avec une forme ovale, le noyau est central avec une chromatine condensée de couleur violet foncé (figure 7, 10, 12) avec un cytoplasme éosinophilique homogène.



Figure 7: Erythrocytes ovalaires nucléés avec un monocyte (M) (coloration de Wright, x 1000)

2.2. Les thrombocytes :

Les thrombocytes, à la différence des plaquettes des mammifères, sont des cellules nucléées, souvent observés en amas. Les thrombocytes sont des cellules ovales mais plus petites et plus arrondies que les érythrocytes. Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé, le noyau est plus arrondi que celui des érythrocytes. Le cytoplasme est clair mais non homogène, il possède un aspect réticulaire. Les thrombocytes possèdent un ou plusieurs granules rougeâtres au niveau

des pôles de la cellule (figure 8) comme déjà cité par Campbell (1995) ces granules peuvent être utilisées pour les différencier des lymphocytes de petite taille.

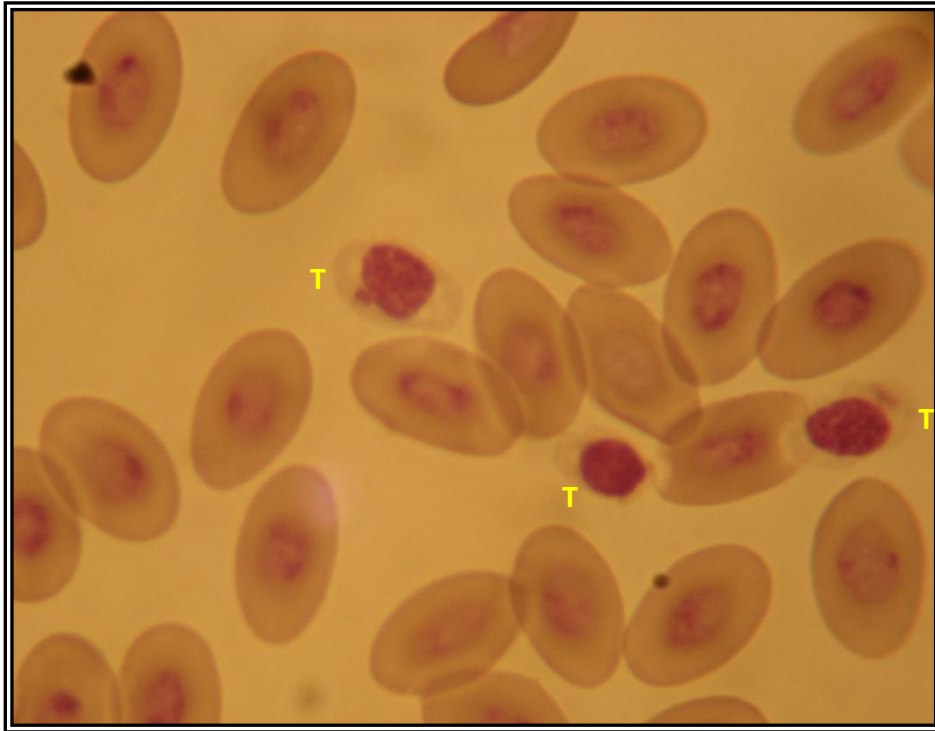


Figure 8: Erythrocytes avec trois thrombocytes (T) (coloration de Wright, x 1000)

2.3. Les lymphocytes :

Ce sont les leucocytes les plus dominants dans le sang des poulets avec différentes tailles, le noyau occupe presque la totalité de la cellule ce qui donne un rapport nucléo-cytoplasmique très élevé.

Les lymphocytes sont de taille variable, les lymphocytes sont le plus souvent "moulés" autour des cellules adjacentes, le cytoplasme des lymphocytes de taille moyenne est plus pâle et basophile. Le cytoplasme des lymphocytes de petite taille peut avoir un aspect en projections cytoplasmiques (figure 9, 11).



Figure 9: Deux lymphocytes (L) et un hétérophile (H) (coloration de Wright, x 1000)

2.4. Les monocytes

Ce sont des cellules mononucléaires de grande taille avec une forme irrégulière et un cytoplasme pâle bleu grisâtre légèrement plus basophile que celui des lymphocytes moyens et larges, avec parfois des granulations fines et occasionnellement des vacuoles cytoplasmiques sont visibles (figure 7, 10) (Campbell, 1995).



Figure 10: Un monocyte (M) entouré d'érythrocytes (coloration de Wright, x 1000)

2.5. Les éosinophiles :

Ces cellules sont arrondies, leur cytoplasme est bleu clair et le noyau de couleur violet, généralement masqué par les granulations cytoplasmiques (figure 11) (Campbell, 1995).

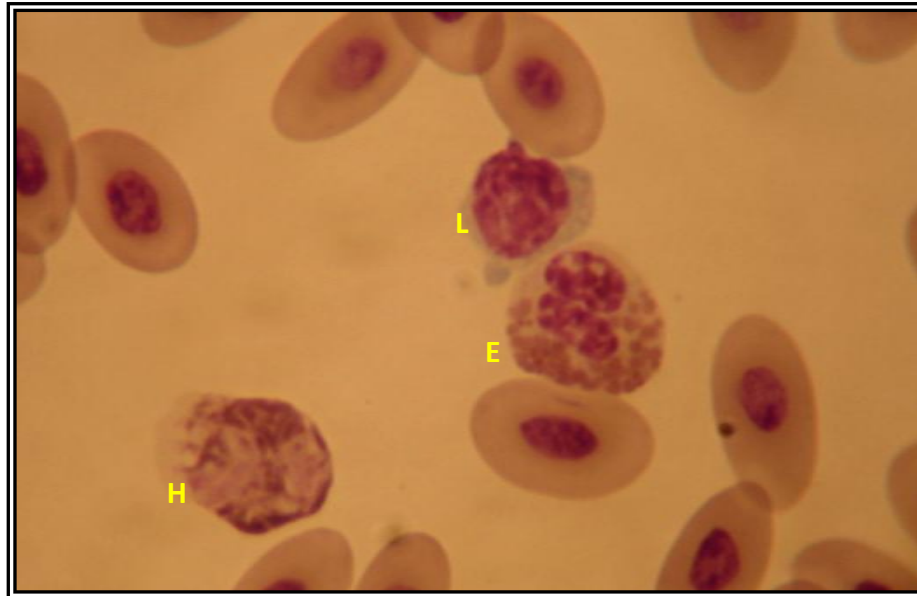


Figure 11: Hétérophile (H), lymphocyte (L) et un éosinophile (E) (coloration de Wright, x 1000)

2.6. Les basophiles :

Les granulocytes basophiles sont moins nombreux que les hétérophiles et les lymphocytes. Ces cellules sont caractérisées par des granulations cytoplasmiques sombres (basophiles) qui masquent presque entièrement le noyau (figure 12). Ces basophiles ont presque la même taille que les hétérophiles.

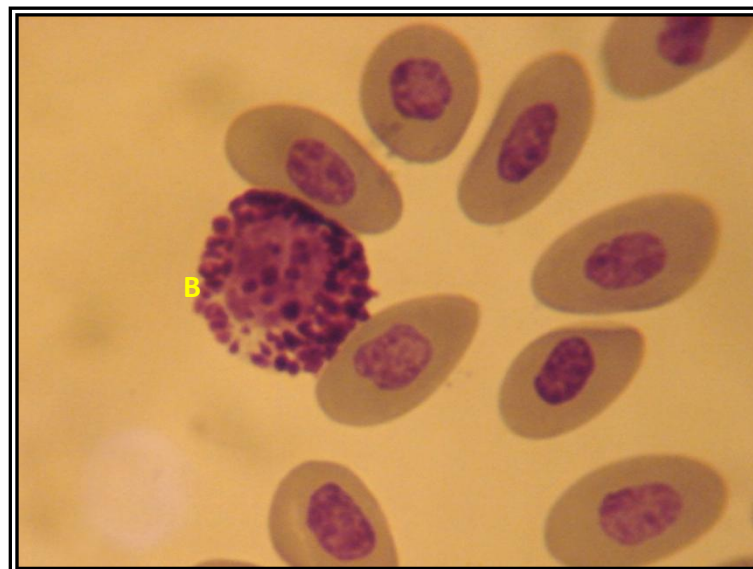


Figure 12: Basophile (B) avec des érythrocytes (coloration de Wright, x 1000)

2.7. Les hétérophiles :

Les hétérophiles sont facilement reconnaissables grâce à leur taille et l'aspect bi ou trilobé du noyau (figure 9, 11, 13) et aussi les granules cytoplasmiques éosinophiliques généralement en forme de bâtonnets. Les noyaux sont partiellement masqués par les granulations cytoplasmiques et la cellule apparaît dans certaines observations comme si elle est binucléée. Ces résultats sont en complète concordance avec ceux avancés par Campbell en 1995 et aussi par Wakenell en 2010.

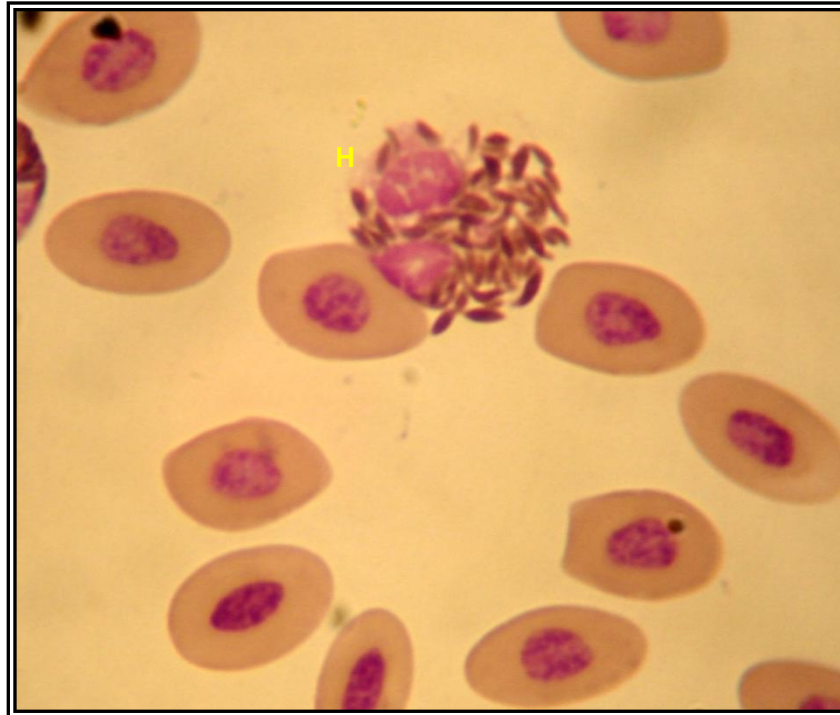


Figure 13: Aspect des granulations cytoplasmiques d'un hétérophile (H) (coloration de Wright, x 1000)

Les résultats de la coloration des frottis sanguins sont en complète concordance avec les résultats avancés par Campbell (1995) après utilisation de la coloration de Wright et avec les résultats de Wakenell (2010).

3. Etude morphométrique des hétérophiles :

L'observation microscopique minutieuse des hétérophiles montrent des formes géométriques assez variables (figure 14) ce qui rend les mesures linéaires rectilignes avec le micromètre oculaire assez difficiles et imprécises. Les mesures de la surface des hétérophiles en utilisant le logiciel suscités sont plus appropriées pour des études comparatives surtout en face des cellules avec une forme géométrique variable.



Figure 14: Forme et aspect géométrique des hétérophiles ($77,80 - 82,29 \mu\text{m}^2$) (Wright, x 1000)

Les mesures avec ce type de logiciel permettent d'effectuer des études comparatives assez concrètes en limitant le facteur humain qui intervient lors des mesures réalisées avec le micromètre oculaire en choisissant le meilleur endroit. La moyenne ainsi que l'écart-type des hétérophiles sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Surface des hétérophiles (μm^2)

	Moyenne \pm écart-type
Lot témoin	82,29 \pm 11,33
Lot vacciné	78,77 \pm 10,59
Lot sans BF	77,80 \pm 12,19

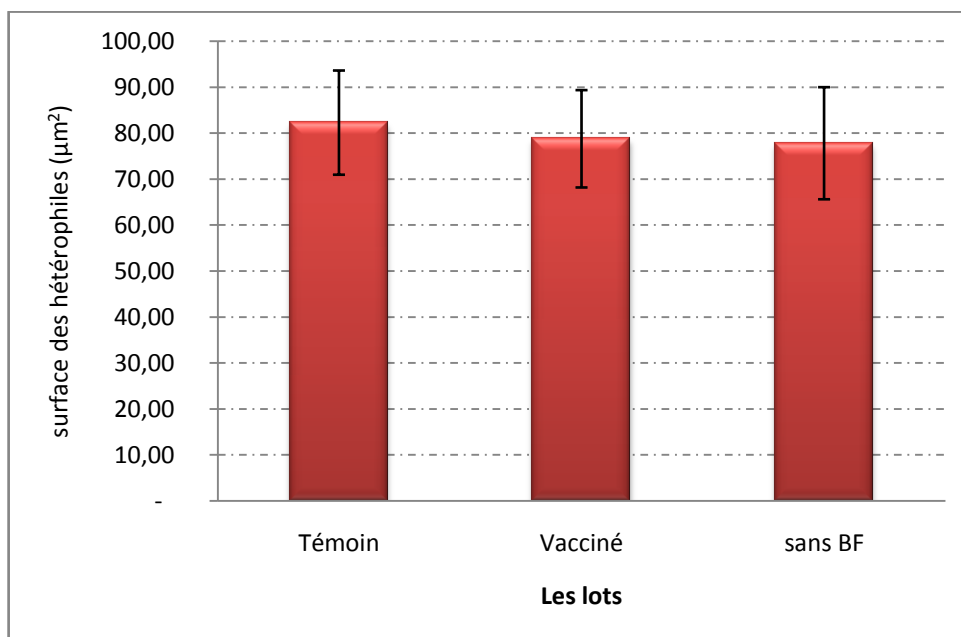


Figure 15: Moyenne et écart-type de la surface des hétérophiles (μm^2)

L'histogramme de la surface des hétérophiles (figure 15) montre des différences imperceptibles entre les trois lots et l'analyse statistique confirme l'absence de différences significatives ($p > 0,05$) entre les trois lots.

4. Numération différentielle des leucocytes :

La numération différentielle des leucocytes est réalisée à 35 j d'âge en vue de mettre en évidence une influence possible sur la population leucocytaire et l'investigation a été étendue vers le rapport hétérophiles sur lymphocytes pour déceler l'existence d'un état de stress chez les différents groupes, le tableau et l'histogramme suivants montrent les résultats de cette étude.

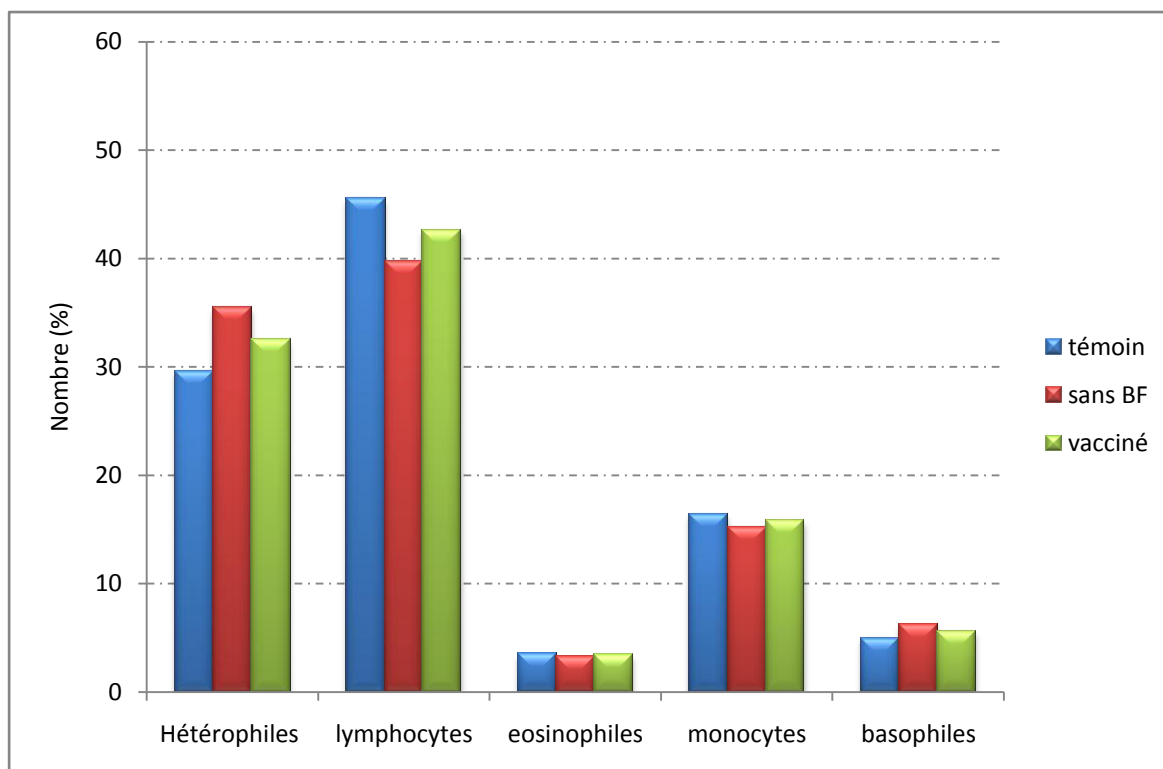


Figure 16: La population leucocytaire

L'étude de la numération différentielle des leucocytes montre que la population des lymphocytes est la plus importante des leucocytes tandis que les hétérophiles représentent la deuxième population et les monocytes occupent la troisième place alors que les basophiles et les éosinophiles occupent la quatrième et la cinquième place respectivement.

L'histogramme (figure 16) montre des différences non significatives entre le pourcentage des hétérophiles et des lymphocytes chez les trois lots, les différences sont encore moins accusées concernant les trois autres populations cellulaires (éosinophiles, monocytes et basophiles) dans les trois lots.

La numération différentielle des leucocytes chez le poulet montre que les lymphocytes sont les leucocytes prédominants contrairement aux mammifères où les neutrophiles sont les cellules qui occupent cette place.

La formule leucocytaire corrobore les trouvailles de Post et al., 2003 et les taux avancés par Wakenell en 2010.

Chez le poulet le rapport hétérophiles sur lymphocytes (H/L) est soumis à une variation en relation avec l'état des sujets et il est fréquemment utilisé comme un indice de stress chez cette espèce et qui est élucidé par l'administration de corticostéroïdes qui provoquent une lymphopénie et une augmentation des hétérophiles circulants chez le poulet (Harmon, 1998). Nos résultats montrent une augmentation du rapport hétérophiles : lymphocytes chez le lot des sujets soumis à une ablation de la BF (figure 17) et qui est probablement due à l'augmentation de la libération des hétérophiles dans la circulation à partir de la moelle osseuse et au largage des hétérophiles à partir du pool de margination. L'étude statistique montre que les différences existantes sont non significatives ($p > 0,05$), et il y a donc absence d'influence ou de relation entre l'ablation de la BF et le rapport H/L.

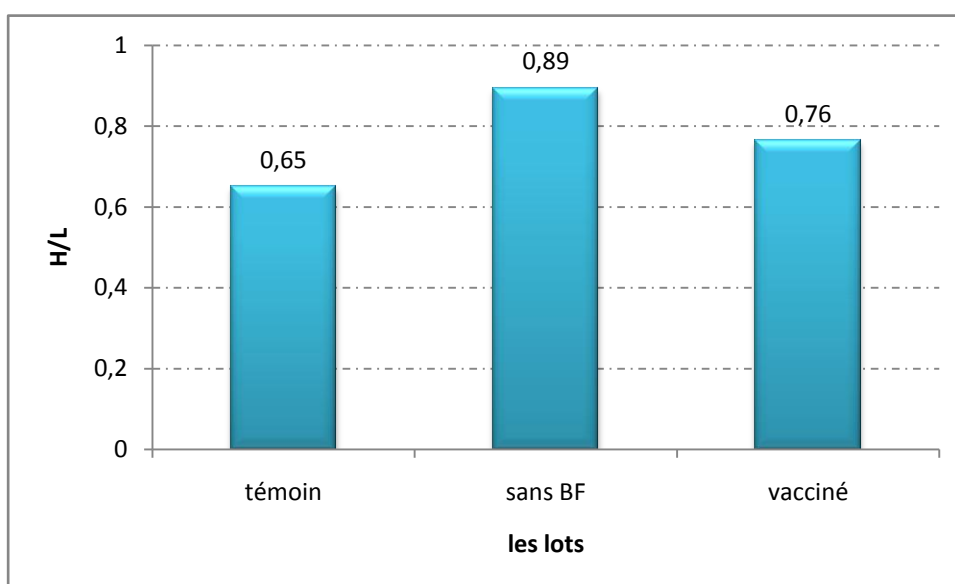


Figure 17: Le rapport hétérophiles / lymphocytes

5. Etude de l'activité antibactérienne :

Technique ultrasensible de diffusion radiale :

L'activité antibactérienne a été testée contre des souches standards de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par une méthode très sensible de diffusion radiale. L'activité antibactérienne même avec des concentrations très faibles montrent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une zone d'inhibition de 0,68 cm. L'existence d'une zone d'inhibition (figure 18) affirme l'existence de molécules à activité antibactérienne puissante. Ceci confirme l'existence d'un mécanisme indépendant de l'explosion respiratoire avec un pouvoir antibactérien très puissant utilisé contre l'invasion des microorganismes et confirme les travaux de Harwig et al., 1994.

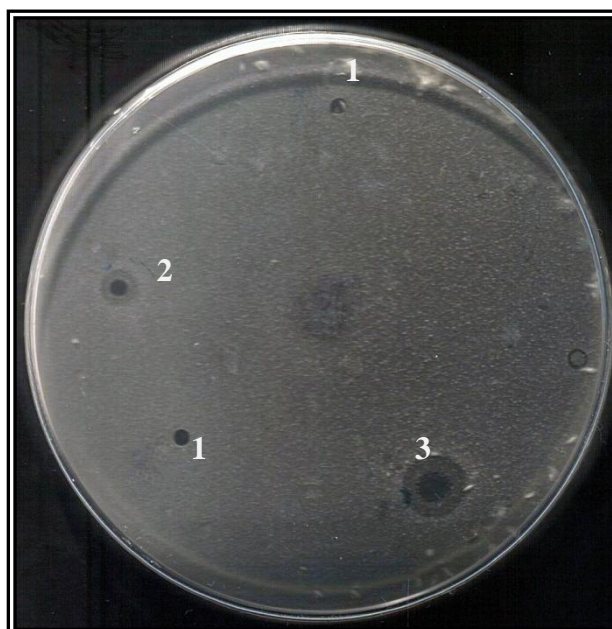


Figure 18: Activité antibactérienne contre *Escherichia coli* ATCC 25922 (1: acide acétique à 0,001%, 2 et 3: extrait des granules cytoplasmiques des hétérophiles issus de sujets témoins et sans BF)

Cette activité antibactérienne remarquable découle principalement des PAC entreposés dans les granules cytoplasmiques des hétérophiles (Harmon et al., 1992 ; Evans et al., 1994 ; Harwig et al., 1994b ; Evans et al., 1995).

Des zones d'inhibition sont observées dans les deux lots ayant subi ou non une bursectomie (tableau 11) et donc les hétérophiles issus de sujets sans BF gardent une activité antibactérienne intacte malgré l'ablation d'un organe lymphoïde central et pour rechercher une éventuelle modulation de cette activité l'utilisation de techniques quantitatives ultraperformantes est fortement recommandée. La modulation de l'activité des hétérophiles a été observée suite à leur incubation avec le virus de la bursite infectieuse aviaire qui provoque une activation de l'explosion oxydative et une diminution de la phagocytose (Lam, 1998).

Tableau 11: Résultats de la diffusion radiale contre *Escherichia coli* 25922

	Concentration (g/ml)	Diamètre de la ZI* (cm)
Groupe témoin	0,08	0,63
Groupe sans BF	0,08	1,1

* : zone d'inhibition

6. L'activité antibactérienne contre *Salmonella enteritidis* :

Une administration orale de *Salmonella enteritidis* a été effectuée aux sujets à l'âge de 35jours afin de connaître la réaction des animaux à un challenge bactérien et aussi pour une meilleure compréhension de l'influence de la BF vis-à-vis d'une attaque par des microorganismes.

6.1. L'influence du challenge bactérien sur l'état clinique :

Aucune manifestation clinique décelable ou changement de comportement des animaux n'ont été observés avec absence de mortalité dans les différents lots et ceci durant les 10 jours qui suivent le test de challenge bactérien.

6.2. La production des anticorps :

Un test d'ELISA est réalisé après 10 jours pour enquêter sur la formation des anticorps anti-*Salmonella enteritidis*.

Les résultats montrent que la production des anticorps est variable d'un sujet à l'autre au sein du même lot (figure 19), certains sujets produisent plus d'anticorps que d'autres et ne dépend pas de la présence ou de l'absence de la BF du moins à l'âge de 35 à 45 j, ces résultats sont en parfaite corrélation avec les travaux de Yamamoto et Glick (1982) qui montrent que le titre des anticorps n'est pas nécessairement associé à la taille de la BF.

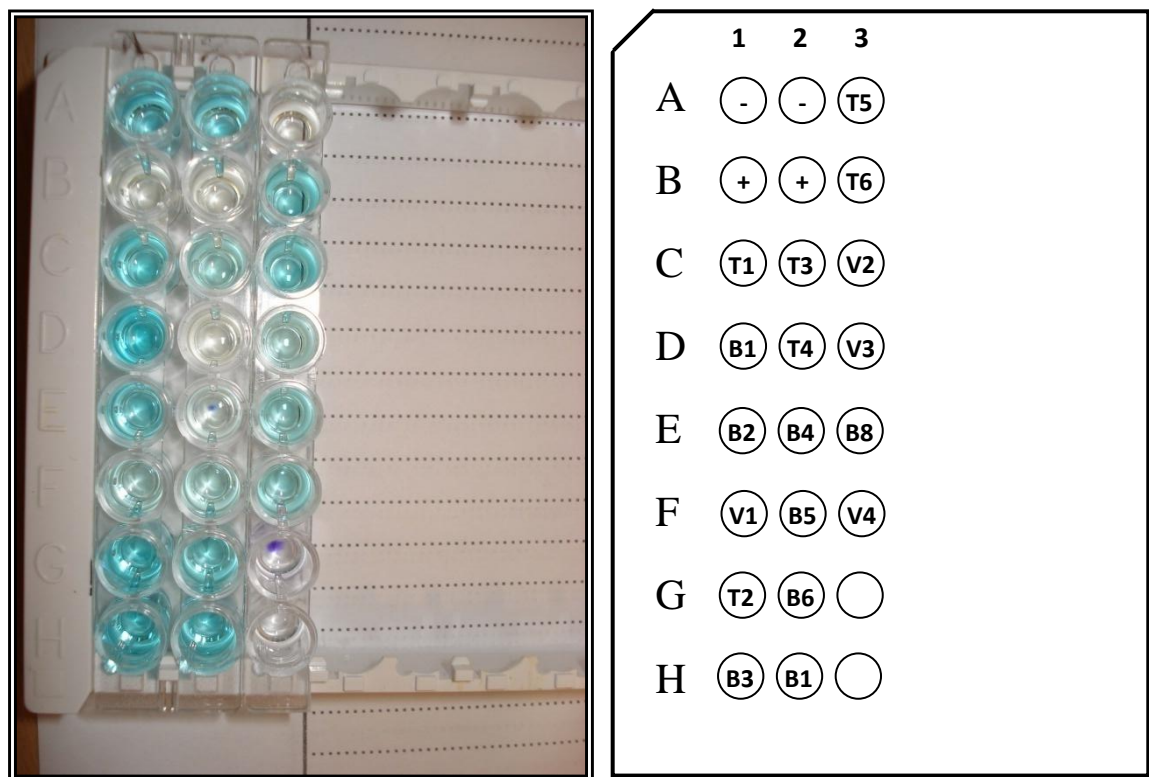


Figure 19: Microplaque ELISA avec la clé de lecture

(T : témoin, B : sans BF, V : vacciné, - : contrôle négatif, + : contrôle positif)

Après la lecture de la microplaque avec le lecteur ELISA Metertech Σ960 en utilisant un filtre de 650 nm, le rapport (échantillon/contrôle négatif) E/N est représenté dans la figure suivante :

	1	2	3
A			0,11
B			0,87
C	1,07	0,58	0,89
D	1,37	0,16	0,45
E	0,97	0,27	0,65
F	0,43	0,48	0,69
G	0,98	0,87	
H	1,21	1,11	

Figure 20: Rapport échantillon sur la moyenne des contrôles négatifs

Les rapports dont la valeur est supérieure à 0,75 sont considérés comme négatifs, entre 0,74 et 0,60 sont suspects, tandis que les échantillons avec un rapport inférieur à 0,59 sont considérés comme positifs (figure 20).

Les résultats du test d'ELISA (figure 19, 20) montre qu'il y a production d'anticorps dirigés contre *Salmonella enteritidis* ce qui confirme que malgré l'ablation de la BF durant les 24h qui suivent l'éclosion, certains sujets (B4, B5) sont capables de produire des anticorps ce qui confirme qu'il y a migration de cellules responsables de la productions d'anticorps avant la naissance durant la vie embryonnaire (Ratcliffe, 2008) et il est de même pour les oiseaux ayant subi une bursectomie hormonale et une bursectomie chirurgicale *in ovo* et qui produisent encore des immunoglobulines (Glick, 1991).

7. Electrophorèse de l'extrait des granulations :

Afin de connaître la nature des substances responsables de cette activité antibactérienne, une électrophorèse des substances a été effectuée sur gel de polyacrylamide (figure 21).

Cette analyse électrophorétique montre que l'activité antibactérienne des granules cytoplasmiques dépend principalement de substances de nature cationique.

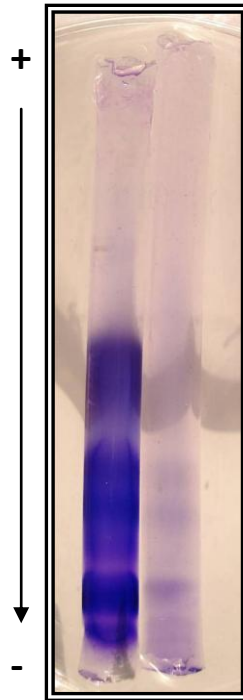


Figure 21: Electrophorèse (AU-PAGE) de l'extrait des granules cytoplasmiques avec courant inversé (cathode en bas), coloré par le bleu de Coomassie R-250.

8. Clairance de l'encre de Chine :

Chez le poulet, les hétérophiles sont les granulocytes dominants dont la fonction majeure est la phagocytose suivie de la destruction des corps étrangers et des microorganismes. Afin de connaître le statut immunitaire des sujets et pour une meilleure appréciation de l'activité phagocytaire totale y compris celle des hétérophiles, un test immunitaire est utilisé pour l'estimation de la capacité phagocytaire *in vivo* et donc la capacité à capter et à éliminer les particules de carbone de la circulation sanguine.

Ce test immunitaire consiste à injecter en intraveineuse une quantité bien définie d'encre de Chine en fonction du poids vif de l'animal et en suivant la clairance de cette substance. La vitesse de la clairance des particules de carbone est directement proportionnelle avec la capacité phagocytaire du sujet.

Les injections intraveineuses correctement réalisées sont suivies d'un changement rapide de la couleur de l'animal, ce changement intéresse la totalité de l'animal c'est-à-dire de la tête aux ergots; puis la couleur revient à la normale après quelques minutes.

Tableau 12 : La cinétique de l'encre de Chine dans le sang chez les différents lots

	Sujets	5 min	10 min	15 min
Bursectomie	B1	0,09	0,033	0,015
	B2	0,053	0,024	0,002
	B3	0,025	0,016	0,006
	B4	0,12	0,08	0,02
	B5	0,157	0,08	0,025
Témoins	T1	0,026	0,005	0,001
	T2	0,069	0,04	0,034
	T3	0,04	0,01	0,005
	T4	0,026	0,03	0,021
	T5	0,054	0,026	0,014
Vacciné	V1	0,019	0,01	0,006
	V2	0,13	0,08	0,019
	V3	0,057	0,016	0,005
	V4	0,036	0,015	0,006
	V5	0,025	0,01	0

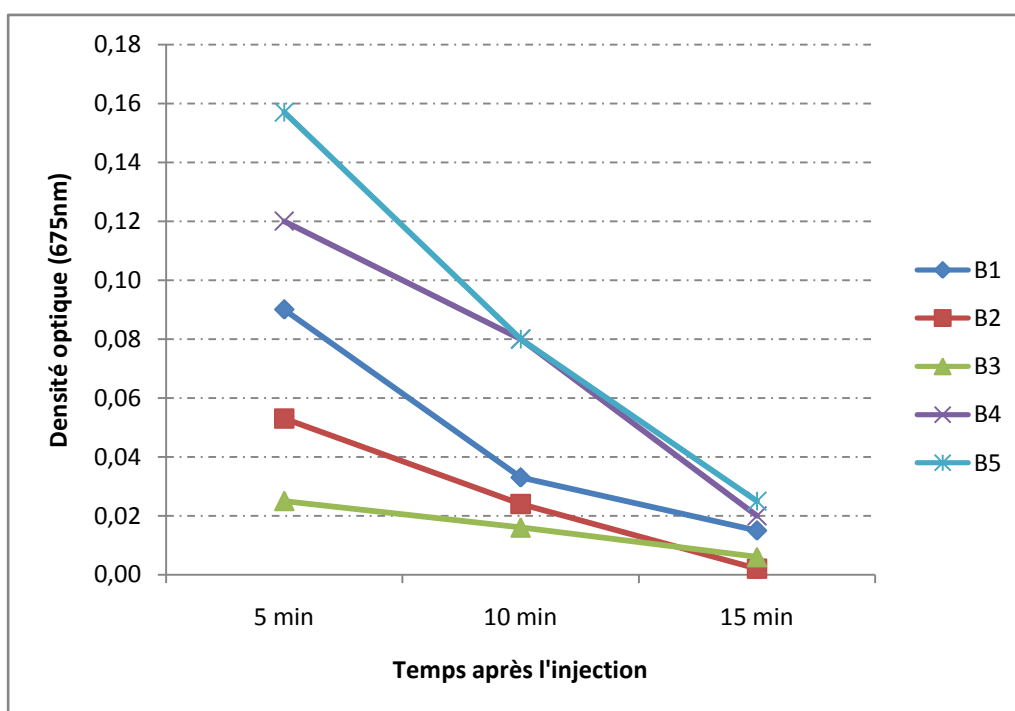


Figure 22: La clairance de l'encre de Chine chez les sujets sans BF

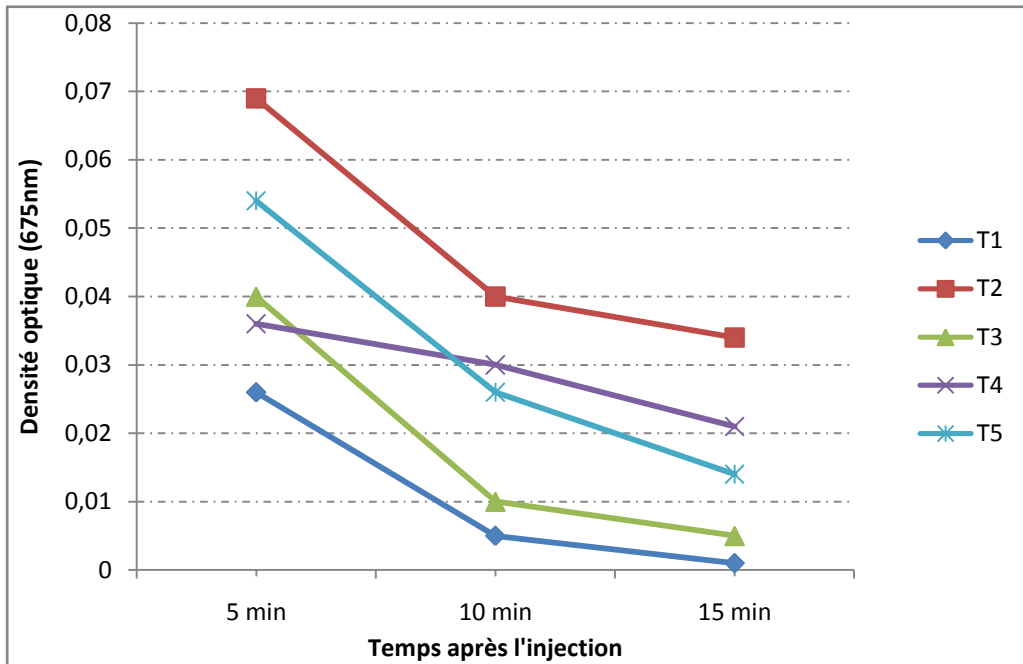


Figure 23: La clairance de l'encre de Chine chez les sujets témoins

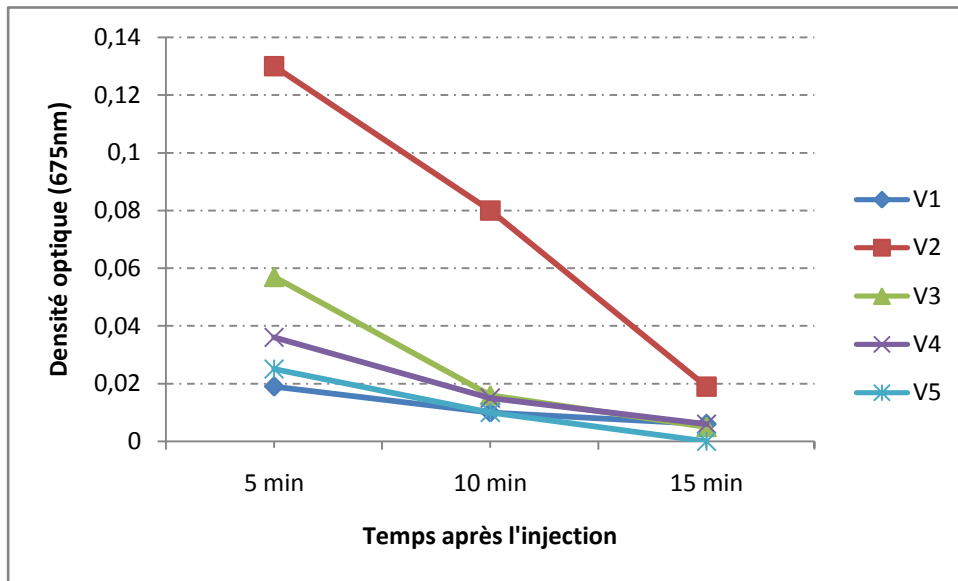


Figure 24: La clairance de l'encre de Chine chez les sujets vaccinés

Les résultats de la clairance et l'élimination des particules de carbone de la circulation sanguine est un phénomène assez rapide, toutefois les résultats montrent l'existence de variations individuelles au sein du même lot (tableau 12 ; figure 22, 23, 24). Les graphes montrent aussi que la phagocytose de ces particules est surtout marquée par l'existence de

deux phases différentes et ceci chez presque la totalité des sujets étudiés et quelque soit le lot, ces deux phases sont les suivantes :

1. la première phase (de 5 à 10 min) : est rapide et accélérée
2. la deuxième phase (de 10 à 15 min) : est comparativement plus lente que la première.

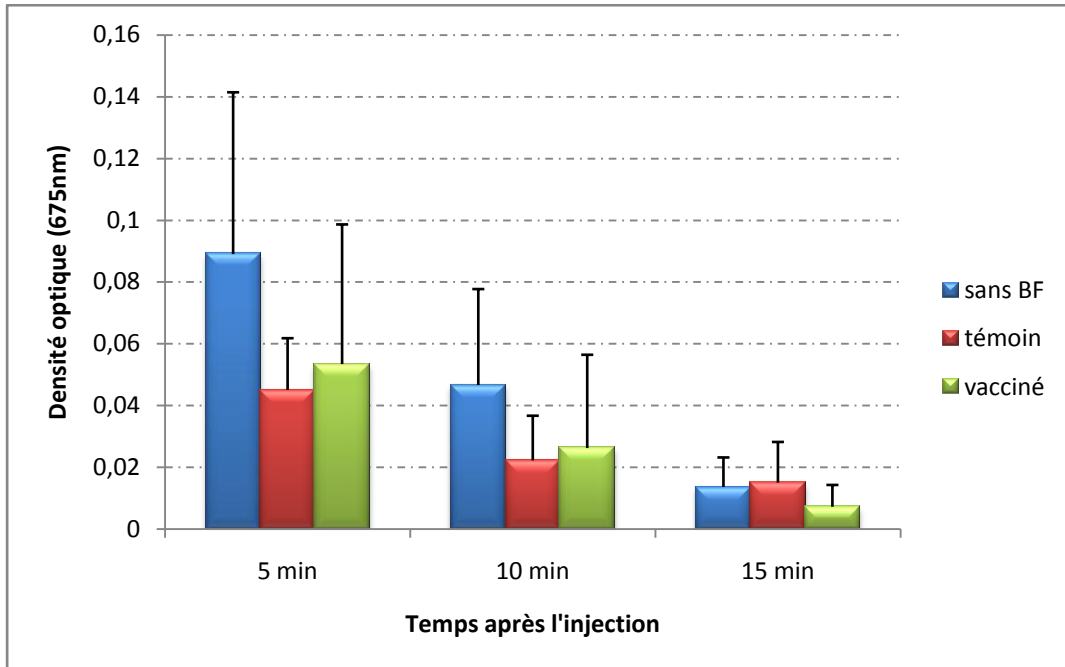


Figure 25: La clairance de l'encre de Chine chez les différents lots

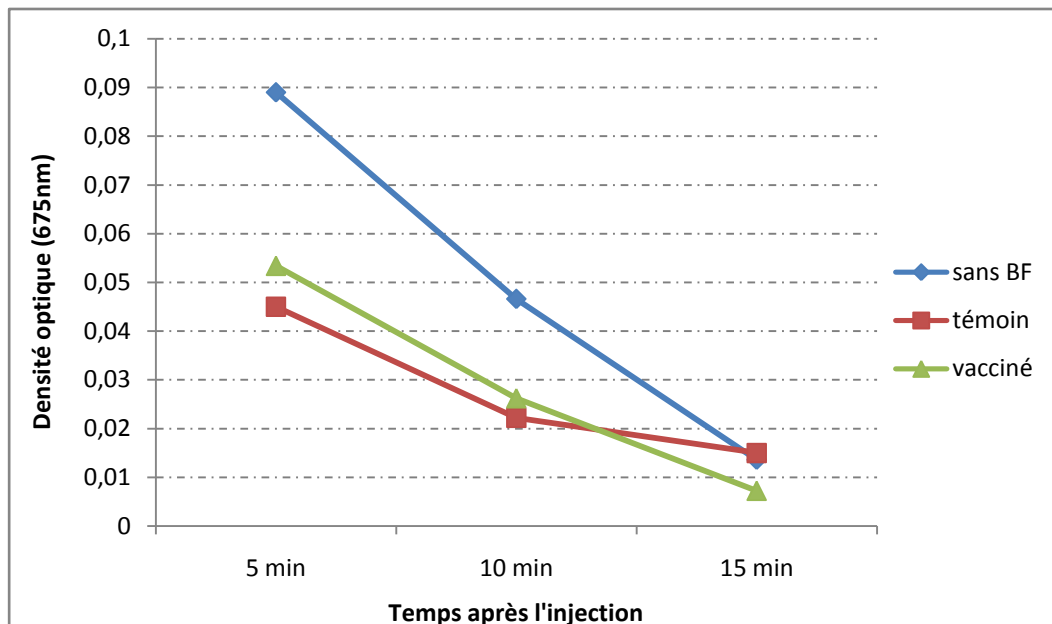


Figure 26: L'évolution de la clairance chez les lots différents

La phagocytose des particules de carbone est presque identique chez le lot témoin et le lot vacciné, alors que la phagocytose et l'élimination de ces particules de la circulation sanguine est plus lente chez les sujets sans BF et surtout durant la première phase de la clairance mais la deuxième phase est une phase compensatrice où on note une phagocytose plus rapide que les deux autres lots pour atteindre une valeur assez identique dans les 15 min qui suivent l'injection de l'encre de Chine (figure 26).

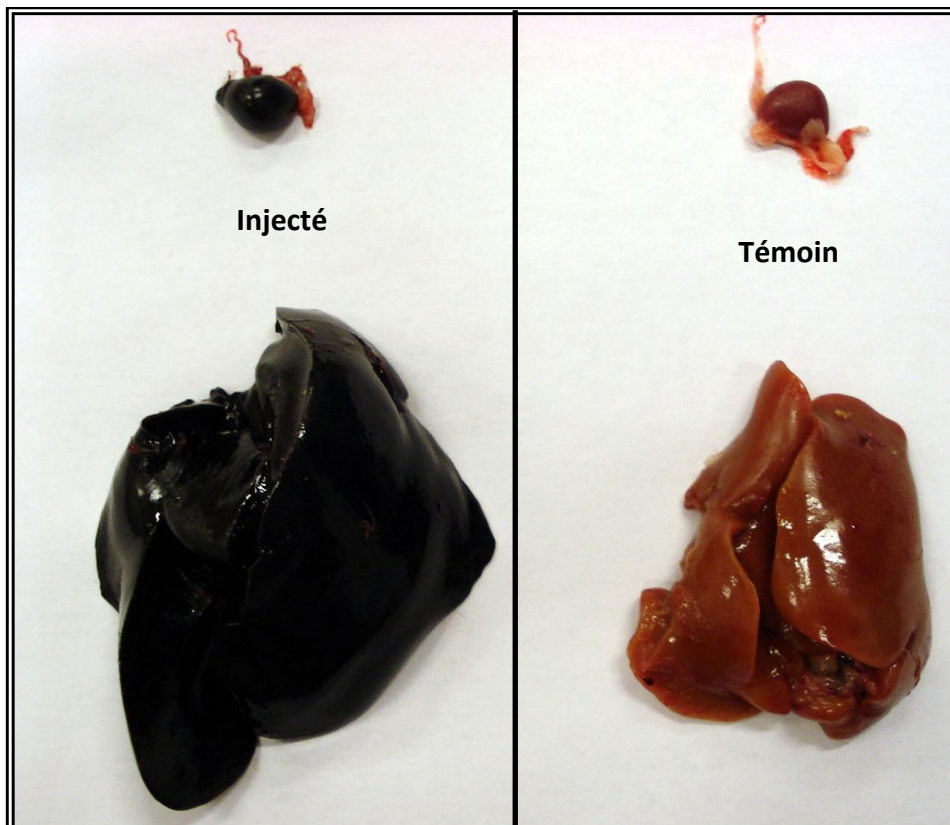


Figure 27: Aspect du foie et de la rate chez un animal après l'injection de l'encre de Chine et animal témoin.

Les résultats de la clairance de l'encre de Chine montrent sa forte concentration au niveau de la rate et aussi au niveau du foie (figure 27) ; ceci est dû à la richesse en leucocytes et aussi en macrophages qui assurent la phagocytose des particules de l'encre de Chine et assurent ainsi l'épuration de la circulation sanguine dans un laps de temps assez court. La phagocytose constitue la première étape de la destruction des corps étrangers et des microorganismes et possède un rôle clé dans la résistance aux maladies (Lamont, 1986). L'étude de la phagocytose *in vivo* montre que les sujets, même avec l'ablation de la BF, détiennent encore un système de défense assez puissant qui leur permet de résister aux agents pathogènes.

L'absence de différences significatives entre les différents lots montre que le système de phagocytose fonctionne indépendamment de la BF.

Les résultats de la clairance de l'encre de Chine montrent qu'il n'y a pas d'influence du poids des sujets sur la phagocytose des particules de carbone (tableau 13). La clairance de l'encre n'est pas donc affectée par le poids des sujets ce qui est en accord avec les travaux de Kreukniet et ses collaborateurs en 1994.

Tableau 13 : Le poids des sujets de la clairance à 35j (g)

Sujet	Témoins (T)	Vaccinés (V)	Sans BF (B)
A	630	635	734
B	550	689	592
C	564	558	598
D	603	758	685
E	563	622	604

9. Profil électrophorétique des sérums :

Dans le but de tester l'influence de la BF sur les protéines sériques, l'électrophorèse de ces protéines sur bande d'acétate de cellulose montre un profil électrophorétique comparable dans les deux lots (figure 28).

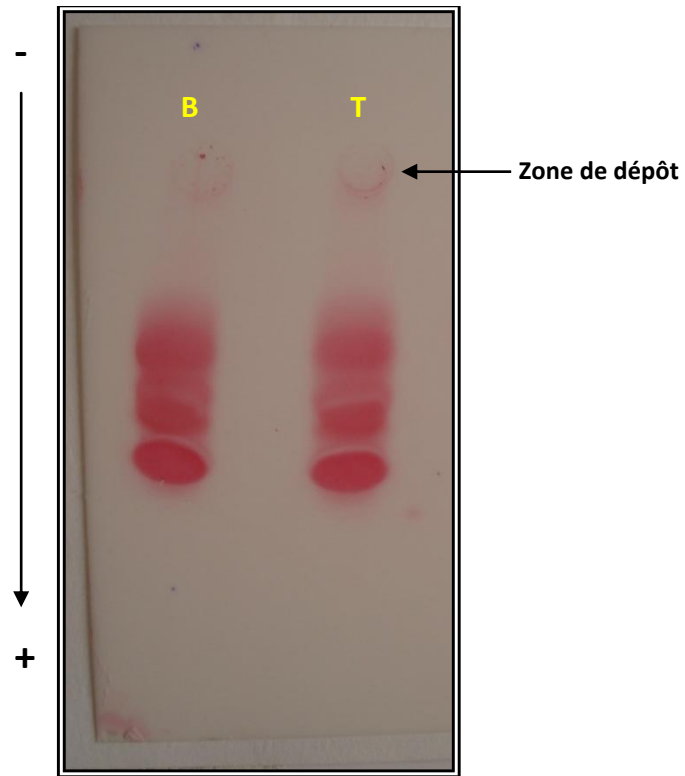


Figure 28: Electrophorèse des protéines sériques (B : sans BF, T : témoin)

L'analyse densitométrique des bandes d'électrophorèse, en utilisant un logiciel approprié (Mesurim), montre les courbes ci-dessous qui ont un profil électrophorétique presque identique (figure 29, 30).

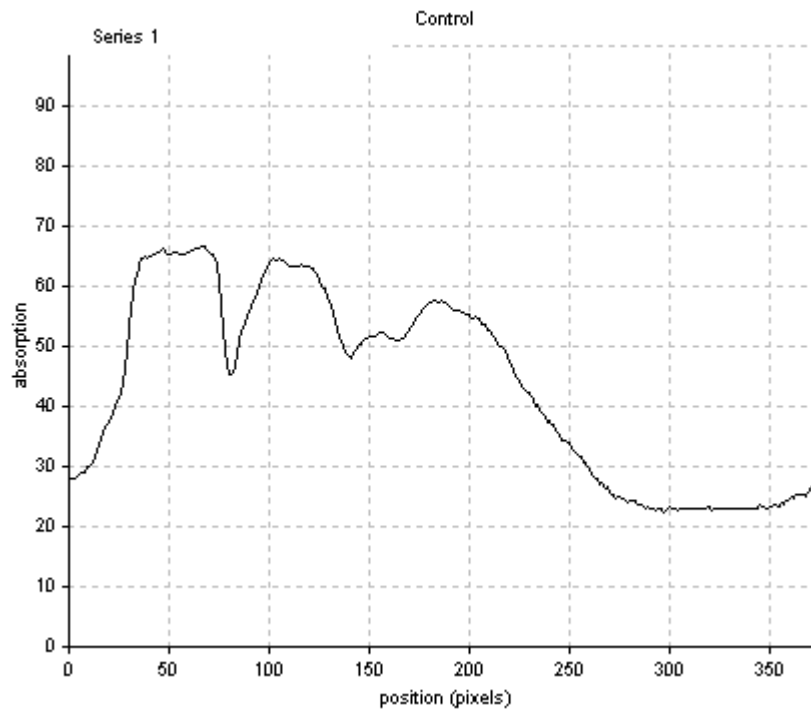


Figure 29: Profil électrophorétique (lot témoin)

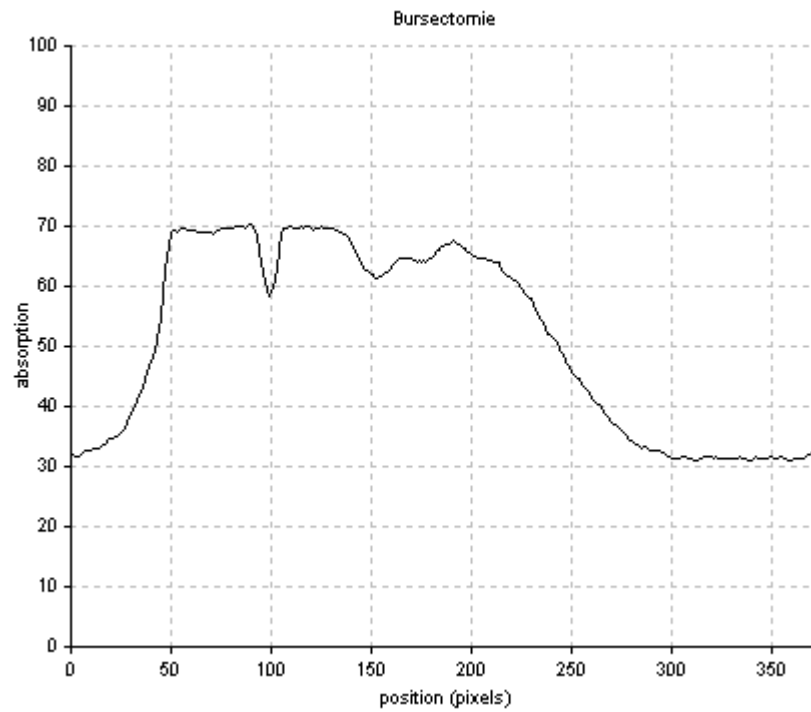


Figure 30: Profil électrophorétique (lot sans BF)

CONCLUSION

La bursectomie chirurgicale néonatale réalisée dans les 24h post-éclosion est une méthode efficace pour la recherche et les investigations sur l'immunité à médiation cellulaire et à médiation humorale. Cette technique d'ablation chirurgicale de la BF n'a pas d'influence significative directe sur la mortalité, l'évolution pondérale et le poids de certains organes du moins durant les 35j de vie. Néanmoins, la bursectomie a un effet sur l'homogénéité du lot et les sujets ont une hétérogénéité de poids assez remarquable. On suggère que cette hétérogénéité est due à une immunité des sujets qui est fortement compromise par l'ablation d'un organe primaire du système immunitaire. Cet affaiblissement se manifeste au fil du temps et la résistance des animaux aux microorganismes et aux autres agressions est affectée avec des répercussions directes sur l'évolution pondérale des sujets.

L'ablation de la BF durant les 24h post-éclosion n'influe pas sur la production des anticorps à 35j d'âge. En effet, le test ELISA confirme la production des immunoglobulines dirigées contre *Salmonella enteritidis* malgré l'ablation de la BF qui est le site de la maturation des lymphocytes B responsables de la production des anticorps. Ceci consolide la théorie de la migration des lymphocytes B vers d'autres sites et organes durant la vie embryonnaire.

La bursectomie des sujets n'a pas d'influence significative sur la taille des hétérophiles et la numération différentielle. Toutefois, l'activité antibactérienne qui découle des granules cytoplasmiques des hétérophiles issus des poulets ayant subi l'ablation de la BF est remarquable et elle n'est pas compromise par l'ablation de la BF.

La phagocytose est un moyen de défense et qui est assuré principalement par les macrophages et les hétérophiles qui participent activement dans ce processus de défense. La quantification de la capacité phagocytaire totale des particules de carbone qui est réalisée *in vivo* montre des différences assez faibles et non significatives entre les différents lots. Ceci signifie qu'il n'y a pas d'influence de la BF sur la capacité phagocytaire totale des sujets. Les résultats montrent aussi que le foie et la rate sont les organes principaux qui assurent la phagocytose.

Cette étude montre que la BF n'a pas d'influence sur la numération différentielle des leucocytes. Cette dernière montre que les lymphocytes constituent la population la plus importante des leucocytes alors que les hétérophiles viennent en deuxième position. Dans les granulocytes, les hétérophiles viennent en première position suivies des basophiles et des éosinophiles. Les résultats montrent aussi une nette augmentation du rapport hétérophiles : lymphocytes chez le lot des sujets soumis à une ablation de la BF ; cette augmentation est probablement due à l'augmentation de la libération des hétérophiles dans la circulation à partir de la moelle osseuse et du pool de margination et une diminution des lymphocytes.

Les hétérophiles du poulet sont les granulocytes les plus abondants chez le poulet de chair, Ces cellules possèdent des granules cytoplasmiques dont l'activité antibactérienne est remarquable.

Notre étude montre que les hétérophiles du poulet, avec leur activité antibactérienne, jouent un rôle-clé dans le système immunitaire inné et constituent un bouclier protecteur très efficace contre les microorganismes envahissants.

RECOMMANDATIONS

- L'utilisation de techniques encore plus performantes et ultrasensibles comme la PCR en temps réel pour la quantification et la mise en évidence des peptides cationiques et pour mettre en évidence l'existence d'une relation possible entre la BF et les hétérophiles.
- L'étude de l'influence de la BF sur des hétérophiles isolés à partir de la circulation sanguine par centrifugation sur gradient discontinu de Ficoll-Hypaque. Réaliser d'autres tests de l'activité des hétérophiles comme la phagocytose *in vitro* contre des bactéries et des levures.
- La réalisation de la bursectomie chimique durant la phase embryonnaire par la testostérone ou le cyclophosphamide.
- L'étude élargie aux animaux qui souffrent de pathologies qui touchent la BF est indispensable pour étudier leur influence sur les hétérophiles.
- Des travaux plus approfondies avec l'utilisation de techniques quantitatives sont donc nécessaires pour comprendre l'effet exact de la BF sur l'activité antibactérienne des hétérophiles et principalement sur les filets tueurs des hétérophiles (heterophil extracellular traps : HETs) formés par un réseau de filaments.
- Des expériences supplémentaires sont également nécessaires pour expliquer les mécanismes sous-jacents ayant des effets directs ou indirects sur l'hémogramme aviaire.

REFERENCES

- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessing, R., Jörnvall, H., Wigzell, H.; Gudmundsson, G.H. (2000). The Human Antimicrobial and Chemotactic Peptides LL-37 and α -Defensins are Expressed by Specific Lymphocyte and Monocyte Populations. *Blood*. 96(9): 3086-3093.
- Agerberth, B., Grunewald, J., Castaños-Velez, E., Olsson, B., Jörnvall, H., Wigzell, H., Eklund, A., Gudmundsson, G.H. (1999). Antibacterial Components in Bronchoalveolar Lavage Fluid Healthy Individuals and Sarcoidosis Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 160: 283-290.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouellette, A.J. (2000). Secretion of Microbial α -Defensins by Intestinal Paneth Cells in Response to Bacteria. *Nature Immunology*. 1(2): 113-118.
- Babu, U., Dalloul, R.A., Okamura, M., Lillehoj, H.S., Xie, H., Raybourne, R.B., Gaines, D., Heckert, R.A. (2004) Salmonella enteritidis clearance and immune responses in chickens following Salmonella vaccination and challenge. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 101: 251-257.
- Bacha, W.J., Bacha, L.M., (2000). *Color Atlas of Veterinary Histology*, second ed. Blackwell Publishing.
- Bals, R. (2000). Epithelial Antimicrobial Peptides in Host Defense against Infection. *Respir Res*. 1: 141-150.
- Bals, R., Goldman, M.J., Wilson, J.M. (1998a). Mouse β -Defensin 1 Is Salt-Sensitive Antimicrobial Peptide Present in Epithelia of the Lung and Urogenital Tract. *Infection and Immunity*. 66(3): 1225-1232.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., Wilson J.M. (1998b). Human β -defensins 2 is a Salt-sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung. *Journal of Clinical Investigation*. 102(5): 874-880.
- Bals, R., Weiner, D.J., Wilson, J.M. (1999). The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest*. 103:303-307.
- Barra, D., Simmaco, M., Boman, H.G. (1998) Gene-encoded peptide antibiotics and innate immunity. Do 'animalcules' have defence budgets?. *FEBS Letters* 430 : 130-134
- Bateman, A., Singh, A., Shustik, C., Mars, W.M., Solomon, S. (1991). The Isolation and Identification of Multiple Forms of the Neutrophil Granule Peptides from Human Leukemic Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(12): 7524-7530.
- Bdeir, K., Cane, W., Canziani, G., Chaiken, I., Weisel, J., Koshinsky, M.L., Lawn, R.M., Bannerman, P.G., Sachais, B.S., Kuo, A., Hancock, M.A., Tomaszewski, J.,

- Raghunath, P.N., Ganz, T., Higazi, A.A-R., Cines, D. (1999). Defensin Promotes the Binding of Lipoprotein (a) to Vascular Matrix. *Blood*. 94(6): 1007-2019.
- Befus, A.D., Mowat, C., Gilchrist, M., Hu, J., Solomon, S., Bateman, A. (1999). Neutrophil Defensins Induce Histamine Secretion from Mast Cells: Mechanisms of Action. *The Journal of Immunology*. 163: 947-953.
 - Biggar, D., Strugess, J. (1978). Hydrogen Peroxide Release by Rat Alveolar Macrophages: Comparison with Blood Neutrophils. *Infection and Immunity*. 19(2): 621-629.
 - Blomqvist, M., Bergquist, J., Westman, A., Håkansson, K., Håkansson, P., Fredman, P., Ekman, R. (1999). Identification of Defensins in Human Lymphocyte Nuclei. *Eur. J. Bioch.* 263: 312-318.
 - Bøe, R., Silvola, J., Yang, J., Moens, U., McCray Jr, P.B., Stenfors, L.E., Seljfelid, R. (1999). Human β -Defensin-1 mRNA is Transcribed in Tympanic Membrane and Adjacent Auditory Canal Epithelium. *Infection and Immunity*. 67(9): 4843-4846.
 - Borregaard, N., Cowland, J, B. (1997). Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*. 89(10): 3503-3521.
 - Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
 - Brockus, C.W., Jackwood, M.W., Harmon, B.G. (1998). Characterization of β -defensin prepropeptide mRNA chicken and turkey bone marrow. *Animal genetics*. 29: 283-289.
 - Brogden, K.A., Kalfa, V.C., Ackermann, M.R., palmquist, D.E., McCray Jr, P.B., Tack B.F. (2001). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(1): 331-334.
 - Brune, K., Leffell, M.S., Spitznagel, J.K. (1972). Microbial Activity of Peroxidaseless Chicken Heterophile Leukocytes. *Infection and Immunity*. 5(3): 283-287.
 - Brune, K., Spitznagel, J.K. (1973). Peroxidaseless Chicken Leukocytes: Isolation and characterization of Antibacterial Granules. *The journal of infectious diseases*. 127(1): 84-94.
 - Caldwell, D.J., Manning, D.Y., Caldwell, D.Y., McElroy, A.P., Hargis, B.M., Porter, T.E. (1999). Effects of Bursal Antisteroidogenic Peptide (BASP) on Chicken Embryonic Pituitary Secretion of Growth Hormone (GH) and Prolactin (PRL): Evaluation in a Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA). *Domestic Animal Endocrinology*. 16 (1): 81-87.
 - Campbell, T. W. (1995). *Avian Hematology and Cytology*, 2nd edition. Blackwell Publishing Company, Ames, Iowa. Pp. 3–5.

- Catterall, J.R., Black, C.M., Leventhal, J.P., Rizk, N.W., Wachtel, J.S., Remington, J.S. (1987). Nonoxidative Microbicidal Activity in Normal Human Alveolar and Peritoneal Macrophages. *Infection and Immunity*. 55(7): 1635-1640.
- Caxton-Martins, A.E., Daimon, T. (1976). Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells. *J. Anat.* 122(3): 553–558.
- Chang, T.S., Rheims, M.S., Winter, A.R. (1957). The Significance of the Bursa of Fabricius in Antibody Production in Chickens. I-Age of Chicken. *Poultry Science*. 36: 735-738.
- Chao, C. H., Lee, Y.P. (2001). Relationship between reproductive performance and immunity in Taiwan Country chickens. *Poultry Science* 80:535-540.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P. (1996). Innate Immunity. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(36): 21808-21813.
- Chuammitri, P., Ostojić J., Andreasen C. B., Redmond S. B., Lamont S. J., Palić D. (2009) Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils *Vet Immunol Immunopathol*. 129(1-2):126-31
- Ciriaco, E., Pinera, P.P., Diaz-Esnal, B., Laura, R. (2003). Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc. Res. Tech.* 62, 482–487.
- Clark, P., Boardman, W., Raidal, S. (2009). *Atlas of Clinical Avian Hematology*. Wiley-Blackwell
- Cole, A.M., Darouiche, R.O., Legarda, D., Connell, N., Diamond, G. (2000). Characterization of a Fish Antimicrobial Peptide: Gene Expression, Subcellular Localization, and Spectrum of Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(8): 2039-2045.
- Conlon, P., Smith, D., Gowlett, T. (1991). Oxygen radical production by avian leukocytes. *Can. J. Vet. Res.* 55: 193–195.
- Daimon, T., Caxton-Martins, A. (1977). Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leucocytes. *J. Anat.* 123(3):553-562.
- Denbow, D.M. (2000) gastrointestinal anatomy and physiology. Dans: GC Whittow (editor). *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press, London. p. 299-325.
- Diamond, G., Kaiser, V., Rhodes, J., Russell, J.P., Bevins, C.L. (2000). Transcriptional Regulation of β -defensin Gene Expression in Tracheal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 68(1): 113-119.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, L., Bevins, C.L. (1991). Tracheal Antimicrobial Peptide, a Cysteine-Rich Peptide from Mammalian Tracheal Mucosa: Peptide Isolation and Cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 3952-3956.

- Dinauer, M., Lekstrom-Himes, J., Dale, D. (2000) Inherited neutrophil disorders: molecular basis and new therapies. *Hematology*. 303-318.
- Edgerton, M., Koshlukova, S.E., Araujo, M.W.B., Patel, R.C., Dong, J., Bruenn, J.A. (2000). Salivary Histatin 5 and Human Neutrophil Defensin 1 Kill *Candida albicans* Via Shared Pathways. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(12): 3310-3316.
- Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S.L., Szklarek, D., Ganz, T, Selsted, M.E., Lehrer, R.I. (1989). Purification and Antimicrobial Properties of Three Defensins from Rat Neutrophils. *Infection and Immunity*. 57(70): 2021-2027.
- Ekino, S., Sugino, K., Urano, T., Matsuno, K., Kotani, M. (1985). The bursa of Fabricius: a trapping site for environmental antigens. *Immunology*. 55: 405-410.
- Evans, E.W., Beach, G.G., Wunderlich, J., Harmon, G.B. (1994). Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *Journal of leukocyte biology*. 56: 661-665.
- Evans, W.E., Beach, F.G., Moore, K.M., Jackwood, M.W., Glisson, J.R, Harmon, B.G. (1995). Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, and CHP3. *Veterinary microbiology*. 47: 295-303.
- Farnell, M.B., Donoghue, A.M., de Los Santos, F.S., Blore, P.J., Hargis, B.M., Tellez, G., Donoghue, D.J. (2006). Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poultry Science* 85: 1900–1906.
- Faurschou, M., Sørensen, O. E., Johnsen, A. H., Askaa, J., Borregaard, N. (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1591, 29–35.
- Fellah, J. S., Jaffredo, T., Dunon, D. (2008). Development of the avian immune system. Dans: Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A., editors. *Avian Immunology*. Elsevier.
- Feng, X., Su, X., Wang, F., Wei, J., Wang, F., Cao, R., Zhou, B., Mao, X., Zheng, Q., Chen, P. (2010) Isolation and potential immunological characterization of TPSGLVY, a novel bursal septapeptide isolated from the bursa of Fabricius. *Peptides*. 31 :1562–1568
- Frank, R.W., Gennaro, R., Shneider, K., przybylski, M., Romeo, D. (1990). Amino Acid Sequences of Two Proline-Rich Bactenecins. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(31): 18871-18874.
- Friedrich, C.L., Moyles, D., Beveridge, T.J., Hancock, R.E.W. (2000). Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(8): 2086-2092.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. (1990). A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(19): 11333-11337.

- Ganz, T. (1987). Extracellular Release of Antimicrobial Defensins by Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Infection and immunity*. 55(3): 568-571.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 3: 710-720.
- Ganz, T., Lehrer, R.I. (1995). Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66(2):191-205.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S.L., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I. (1985). Defensins, Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76: 1427-1435.
- Gaunt, S. D., Prescott-Mathews, J.S., King, W.W., Scholl, D.T. (1995). Clinical hematology practices at veterinary teaching hospitals and private diagnostic laboratories. *Vet. Clin. Pathol.* 24: 64-67.
- Gennaro, R., Skerlavaj, B., Romeo, D. (1989). Purification, Composition, and Activity of Two Bactenecins, Antibacterial Peptides of Bovine Neutrophils. *Infection and Immunity*. 57(10): 3142-3146.
- Glick, B. (1991). Historical Perspective: The Bursa of Fabricius and its Influence on B-cell Development, Past and Present. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 30: 3-12.
- Goitsuka, R., Chen, C.L., Benyon, L., Asano, Y., Kitamura, D., Cooper, M.D. (2007). Chicken cathelicidin-B1, an antimicrobial guardian at the mucosal M cell gateway. *PNAS* 104(38): 15063-15068.
- Gougerot-Pocidallo, M. A. (2002). polynucléaires neutrophiles humains. *Revue Française des Laboratoires*, N° : 341
- Gougerot-Pocidallo, M. A., El Benna, J., Dang, P. M.C., Elbim, C. (2007) Quand les polynucléaires neutrophiles attrapent les agents pathogènes dans leurs filets. *Medecine sciences*. 23(5): 464-465.
- Gough, M., Hancock, R.E., Kelly, N.M. (1996). Antidotoxin Activity of Cationic Peptide Antimicrobial Agents. *Infection and Immunity*. 64(12): 4922-4927.
- Gudmundsson, G.H., Agerberth, B. (1999). Neutrophil Antibacterial Peptides, Multifunctional Effector Molecules in the Mammalian Immune System. *The Journal of Immunological Methods*. 232: 45-54.
- Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 238:325-332.
- Gupta, A., Hasler, P., Gebhardt, S., Holzgreve, W., Hahn, S., 2006. Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075:118–122.

- Guthmiller, J.M., Vargas, K.G., Skirkantha, S., Schomberg, L.I., Weistroffer, McCray, Jr, P.B., Tack, B.F. (2001). Susceptibility of Oral Bacteria and Yeast to Mammalian Cathelicidins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(11): 3216-3219.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 92(9): 3007-3017.
- Hancock, R.E., Chapple, D.S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(6): 1317-1323.
- Hancock, R.E.W. (1997). Peptide Antibiotics. *The Lancet*. 349(9049): 418-422.
- Hancock, R.E.W., Diamond, G. (2000). The role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences. *Trends In Microbiology*. 8(9): 402-410.
- Hancock, R.E.W., Falla, T., Brown, M. (1995). Cationic Bacterial Peptides. *Advances in Microbial Physiology*. 37: 135-175.
- Hancock, R.E.W., Scott, M.G. (2000). The Role of Antimicrobial Peptides in Animal Defenses. *PNAS*. 97(16): 8856-8861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M. (2001). Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(8): 5707-5713.
- Harder, U., Meyer-Hoffert, U., Teran, L.M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., Schröder, J.M. (2000). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL- β , but not IL-6, induce Human β -defensin-2 in Respiratory Epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 22: 714-721.
- Harmon, B.G. (1998). Avian Heterophils in Inflammation and Disease Resistance. *Poultry Science*. 77: 972-977.
- Harmon, B.G., Glisson, J.R., Nunally, J.C. (1992). Turkey Macrophage and heterophil Bactericidal Activity against *Pasteurella multocida*. *Avian diseases*. 36: 986-991.
- Harmon, R.J., Newbould, F.H.S. (1980). Neutrophil Leukocyte as a Source of Lactoferrin in Bovine Milk. *Am. J. Vet. Res*. 41(10): 1603-1606.
- Harwig, S.S.L., Chen, N.P., Park, A.S.K., Lehrer, R.I. (1993). Purification of Cysteine-Rich Bioactive Peptides from Leukocytes by Continuous Acid-Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 208: 382-386.
- Harwig, S.S.L., Swiderek, K.M., Kokryakov, V.N., Tan, L., Lee, T.D., Panyuticha, E.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Lehrer, R.I. (1994). Gallinacins: Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides of Chicken Leukocytes. *FEBS Letters*. 342: 821-285.
- Haynes, R.J., Tighe, P.J., Dua, H.S. (1999). Antimicrobial Defensin Peptides of the Human Ocular Surface. *Br. J. Ophthalmol*. 83: 737-741.

- Helmerhorst, E.J., Reijnders, I.M., Hof, M., Veerman, E.C.I., Amerongen, A.V.N. (1999). A critical Comparison of the Hemolytic and Fungicidal Activities of Cationic Antimicrobial Peptides. *FEBS Letters*. 449: 105-110.
- Higazi, A.A-R., Lavi, E., Bdeir, K., Ulrich, A.M., Jamieson, D.G., Rader, D.J., Usher, D.C., Kane, W., Ganz, T., Cines D.B. (1997). Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Blood*. 89(12): 4290-4298.
- Hirabayashi, Y., Taniuchi, S., Kobayashi, Y. (1985). A Quantitative Assay of Oxidative Metabolism by Neutrophils in Whole Blood Using Flow Cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 82: 253-259.
- Hodinka, R.L., Modrzakowski, M.C. (1983). Bactericidal Activity of Granule Contents from Rat Polymorphonuclear Leukocytes. *Infection and Immunity*. 40(1): 139-146.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr, C.A., Ezekowitz, R.A.B. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*. 284: 1313-1318.
- Hristova, K., Selsted, M.E., White, S.H. (1997). Critical Role of Lipid Composition in Membrane Permeabilization By Rabbit Neutrophil Defensins. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(39): 24224-24233.
- Huttner, K.M., Bevins, C.L. (1999). Antimicrobial Peptides as Mediators of Epithelial Host Defense. *Pediatric Research*. 45(6): 785-794.
- Ingham, H.R., Sisson, P.R., Middleton, R.L., Narang, H.K., Codd, A.A., Selkon, J.B. (1981) Phagocytosis and Killing of Bacteria in Aerobic and Anaerobic Conditions. *J. Med. Microbiol*. 14: 391-399.
- Islam, D., Bandholtz, L., Nilsson, J., wigzell, H., Christensson, B., Agerberth, B. and Gudmundsson, G.H. (2001). Downregulation of Bactericidal Peptides in Enteric Infections: A Novel Immune Escape Mechanism with Bacterial DNA as a Potential Regulator. *Nature medicine*. 7(2): 180-185.
- Jia, H.P., Schutte, B.C., Schudy, A., linzmeir, R., Guthmiller, J.M., Johnson, G.K., Tack, B.F., Mitros, J.P., Rosenthal, A., Ganz., McCray Jr, P.B. (2001a). Discovery of New Human β -Defensins Using a Genomics-Based Approach. *Gene*. 263: 211-218.
- Jia, H.P., Starner, T., Ackermann, M., Kirby, P., Tack, B.F., McCray Jr, P.B. (2001b). Abundant Human β -Defensin-1 Expression in Milk and Mammary Gland Epithelium. *J. Pediatr*. 138: 109-112.
- Joiner, K. A., Ganz, T., Albert, J., Rotrosen, D. (1989). The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J. Cell Biol*. 109:2771-2782.

- Khenenou, T. (2008). Etude Morphométrique et Histologique des Organes Lymphoïdes (Bourse de Fabricius, Thymus, Rate) chez le Poulet de Chair Pendant la Vie Postnatale. Mémoire de magister. Département vétérinaire, université de Batna.
- Klut, M.E., Whalen, B.A., Hogg, J.C. (2001). Dynamic Changes in Neutrophil Defensins during Endotoxemia. *Infection and Immunity*. 69(12): 7793-7799.
- Kogut, M.H., Genovese, K.J., He, H., Li, M.A., Jiang, Y.W. (2007). The effects of BT/TAMUS 2032 cationic peptides on innate immunity and susceptibility of young chickens to extraintestinal *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infection. *International Immunopharmacology*. 7:912-919.
- Kogut, M.H., He, H., Genovese, K.J., Jiang, Y. (2010). Feeding the BT cationic peptides to chickens at hatch reduces cecal colonization by *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and primes innate immune cell functional activity. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7:23-30
- Kourie, J.I., Shorthouse, A.A. (2000). Properties of Cytotoxic Peptide-Formed Ion Channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278: C1063-C1087.
- Kreukniet, M.B., Nieuwland, M.G.B., van der Zijpp, A. J. (1994). Phagocytic activity of two lines of chickens divergently selected for antibody production. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 44:377–387.
- Kumar, V., Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*. 10: 1325–1334.
- Lam, K.M. (1998). Alteration of chicken heterophil and macrophage functions by the infectious bursal disease virus. *Microbial Pathogenesis*. 25: 147–155.
- Lamont, S.J., (1986). Genetic associations of reticuloendothelial activity in chickens. *Proc. 3rd World Congress on Genet. Applied to Livestock Production*. Agricultural Communications, University of Nebraska, Lincoln, NE XI:643–647.
- Lassila, O, Lambris, J.D., Gisler, R.H. (1998) A role for Lys-His-Gly-NH₂ in avian and murine B cell development. *Cell Immunol*. 122:319–28.
- Latimer, K.S., Bienzel, D. (2000). Determination and interpretation of avian leukogram. Dans: *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N.C. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Latimer, K.S., Tang, K.N., Goodwin, M.A., Steffens, W.L., Brown, J. (1988) Leukocyte Changes Associated with Acute Inflammation in Chickens. *Avian Diseases*. 32:760-772, 1988
- Lee, I.H., Chang, K.Y., Choi, C.S., Kim, H.R. (1999). Cecropin D-Like Antibacterial Peptides from the Sphingid Moth, *Agrius convolvuli*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 41: 178-185.

- Lehmann, O.J., Hussain, I.R., Watt, P.J. (2000). Investigation of β -Defensin Gene Expression in the Ocular Anterior Segment by Semiquantitative RT-PCR. *Br. J. Ophthalmol.* 84: 523-526.
- Lehrer, I.R., Barton, A., Daher, K, A., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Selsted, M.E. (1989). Interaction of Human Defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of Bactericidal. *J. Clin. Invest.* 84: 553-561.
- Lehrer, I.R., Selsted, M.E., Szklarek, D., Fleischmann, J. (1983). Antibacterial Activity of Microbicidal Cationic Proteins 1 and 2, Natural Peptide Antibiotics of Rabbit Lung Macrophages. *Infection and Immunity.* 42(1): 10-14.
- Lehrer, R.I., Daher, K., Ganz,T., Selsted, M.E. (1985). Direct Inactivation of Viruses by MCP-1 and MCP-2, Natural Peptide Antibiotics from Rabbit Leukocytes. *Journal of Virology.* 54(2): 467-472.
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.S., Jackson, R., Eisenhauer, P. (1991). Ultrasensitive Assays for Endogenous Antimicrobial Polypeptides. *Journal of Immunological Methods.* 137: 167-173.
- Levy, O. (1996). Antibiotic Proteins of Polymorphonuclear Leukocytes. *Eur. J Haematol.* 56: 263-277.
- Levy, O. (2000a). A neutrophil-derived anti-infective molecule: Bacterial/Permeability-Increasing Protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy:* 2925-2931.
- Levy, O. (2000b). Antimicrobial Proteins and Peptides of Blood: Templates for Novel antimicrobial Agents. *Blood.* 96: 2664-2676.
- Levy, O. (2002a). Impaired Innate Immunity at Birth: Deficiency of Bactericidal/Permeability-Increasing protein (BPI) in the Neutrophil of Newborns. *Pediatric Research.* 51(6): 667-669.
- Levy, O. (2002b). Therapeutic Potential of the Bactericidal/Permeability-Increasing Protein. *Expert Opin. Investing. Drugs.*11(2): 159-167.
- Li, Z., Nestor, K. E., Saif, Y. M., Anderson, J. W., Patterson, R. A. (2001). Effect of selection for increased body weight in turkeys on lymphoid organ weights, phagocytosis, and antibody responses to fowl cholera and Newcastle disease-inactivated vaccines. *Poult. Sci.* 80:689–694.
- Liu, L., Wang, L., Jia, H.P., Zhao, C., Heng, H.H.Q., Schutte, B.C., McCray Jr, P.B., and Ganz, T. (1998). Structure and Mapping of the Human β -Defensin HBD-2 Gene and Its Expression at Sites of Inflammation. *Gene.* 222: 237-244.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L., Randali, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biological. Chem.* 193(1): 265-275.
- Lynn, D. J., Higgs, R. , Lloyd, A. T., O'Farrelly, Cl., Herve-Grepinet, Y. Nys, F. S. L. Brinkman, P. L. Yu, A. Soulier, P. Kaiser, V., Zhang, G., Lehrer, R. I., (2007).

- Avian beta-defensin nomenclature: A community proposed update. *Immunol. Lett.* 110: 86–89.
- Macrae, E.K., Spitznagel, J.K. (1975). Ultrastructural Localization of Cationic Proteins in Cytoplasmic Granules of Chicken and Rabbit Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Cell. Sci.* 17: 79-94.
 - Mak, P., Wójcik, K., Thogersen, I.B. and Dubin, A. (1996). Isolation, Antimicrobial Activities, and Primary Structures of Hamster Neutrophil Defensins. *Infection and Immunity.* 64(11): 4444-4449.
 - Mallow, E.B., Harris, A., Salzman, N., Russell, J.P., DeBerardinid, R.J., Ruchelli, E., Bevins, C.L. (1996). Human Enteric Defensins. Gene Structure and Developmental Expression. *The Journal of Biological Chemistry.* 271(8): 4038-4045.
 - Mambula, S.S., Simons, E.R., Hastey, R., Selsted, M., Levitz, S.M. (2000). Human neutrophil-mediated Nonoxidative Antifungal Activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity.* 68(11): 6257-6264.
 - Mandell, G.L. (1974). Bactericidal Activity of Aerobic and Anaerobic Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and immunity.* 9(2): 337-341.
 - Martinez de Tejada, G., Pizzaro-Cerda, J., Moreno, E., Moriyón, I. (1995). The Outer Membranes of *Brucella* Spp. Are Resistant to Bactericidal Cationic Peptides. *Infection and Immunity.* 63(8). 3054-3061.
 - McLelland, J. (1990). A colour atlas of avian anatomy. Wolfe publishing Ltd. England
 - Milona, P., Townes, C. L., Bevan, R. M., Hall, J. (2007). The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9 have antimicrobial activity against *Salmonella* serovars. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 169-174.
 - Mitchell, E. B., Johns, J. (2008) Avian Hematology and Related Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice.* 11(3): 501-522
 - Miyakawa, Y., Ratnakar, P., Rao, A.G., Costello, M.L., Matieu-Costello, O., Lehrer, R.I., Catanzaro, A. (1996). In Vitro Activity of the Antimicrobial Peptides Human and Rabbit Defensins and Porcine Leukocyte Protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity.* 64(3): 926-932.
 - Mizukawa, N., Sugiyama, K., Ueno, T., Takagi, S., Sugahara, T. (1999). Defensin-1, an Antimicrobial Peptide Present in the Saliva of Patient with Oral Diseases. *Oral Diseases.* 5: 139-142.
 - Nagahata, H., Yatsu, A., Noda, H. (1986). The Evaluation of a Quantitative Assay for Estimating the Bactericidal Activity of Bovine Neutrophils by Nitroblue Tetrazolium Reduction. *Br. Vet. J.* 142: 578-584.

- Nagaoka, I., Hirota, S., Yomogida, S., Ohwada, A., Hirata, M. (2000). Synergetic Actions of Antibacterial Neutrophil Defensins and Cathelicidins. *Inflamm. Res.* 49: 73-79.
- Namavar, F., Verweij-Van Vught, A.M.J.J., Vel, W.A.C., Bal, M., MacLaren. (1984). Polymorphonuclear Leukocyte Chemotaxis by Mixed Anaerobic and Aerobic Bacteria. *J. Med. Microbiol.* 18: 167-172.
- Newman, S.L., Gootee, L., Gabay, J.E., Selsted, M.E. (2000). Identification of Constituents of Human Neutrophil Azurophil Granules that Mediate Fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity.* 68(10): 5668-5672.
- O'Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., Kagnoff, M.F. (1999). Expression and Regulation of the Human β -Defensin hBD-1 and hBD-2 in Intestinal Epithelium. *The Journal of Immunology.* 163: 6718-6724.
- Odeberg, H., Olsson, I. (1975). Antibacterial Activity of Cationic Proteins from Human Granulocytes. *The journal of Clinical Investigation.* 56: 1118-1124.
- Oláh, E., Vervelde, L. (2008). Structure of the Avian Lymphoid System. Dans: Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A., editors. *Avian Immunology.* Elsevier.
- Ouellette, A.J. (1999). Mucosal Immunity and Inflammation IV. Paneth cell Antimicrobial Peptides and the Biology of the Mucosal Barrier. *Am. J. Physiology.* 277 (Gastrointest. Liver Physiol. 40): G257-G261.
- Ouellette, A.J., Satchell, D.P., Hsieh, M.M., Hagen, S.J., Selsted, M.E. (2000). Characterization of Luminal Paneth Cell α -Defensins in Mouse Small Intestine. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(43): 33969-33973.
- Panyutich, A., Shi, J., Boutz, P.L., Zhao, C., Ganz, T. (1997). Porcine Polymorphonuclear Leukocytes Generate Extracellular Microbial Activity by Elastase-Mediated Activation of Secreted propeptidases. *Infection and Immunity.* 65(3): 978-985.
- Penniell, R., Spitznagel, J. K. (1975). Chicken neutrophils: Oxidative metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:5012-5015.
- Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P.M., van Strijp. (2001). J.A.G. *Staphylococcus aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing Via The Novel Virulence Factor MprF is Based on Modification of Membrane Lipids With L-lysine. *J. Exp. Med.* 193(9): 1067-1076.
- Post, J., Rebel, J.M.J., ter Huurne, A.A.H.M. (2003). Automated blood cell count: A sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. *Poultry Science.* 82: 591-595.

- Qu, X-D., Lehrer, R.I. (1998). Secretory Phospholipase A₂ Is the Bactericide for staphylococci and other Gram-Positive Bacteria in Human Tears. *Infection and Immunity*. 66(6): 2791-2797.
- Ratcliffe, M.J.H (2008) B Cells, The Bursa of Fabricius and the Generation Of Antibody Repertoires. Dans: Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A., editors. *Avian Immunology*. Elsevier.
- Risso, A. (2000). Leukocyte Antimicrobial Peptides: Multifunctional Effector Molecules of Innate Immunity. *J. Leukoc. Biol.* 68: 785-792.
- Rodríguez-Méndez, A.J., Luna-Acosta, J.L., Carranza, M., Harvey, S., Arámburo, C, Luna, M. (2010) Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships? *General and Comparative Endocrinology* 167 : 297–307
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M., Gennaro, R. (1988). Structure and Bactericidal Activity of an Antibiotic Dodecapeptide Purified from Bovine Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(20): 9573-9575.
- Romppanen, T., Sorvari, T.E. (1980). Chemical bursectomy of chickens with colchicine applied to the anal lips. *Am J Pathol.* 100(1):193–208.
- Ryan, L.K., Rhodes, J., Bhat, M., Diamond, G. (1998). Expression of β -defensin Gene in Bovine Alveolar Macrophages. *Infection and Immunity*. 66(2): 878-881.
- Sabet, T., Hsia, W.C., Stanitz, M., El-Domeiri, A., Van Alten, P. (1977). A Simple Method for Obtaining Peritoneal Macrophage from Chickens. *Journal of Immunological Methods*. 14: 103-110.
- Sarker, N., Tsudzuki, M., Nishibori, M., Yasue, H., Yamamoto, Y. (2000). Cell-mediated and humoral immunity and phagocytic ability in chicken lines divergently selected for serum immunoglobulin M and G levels. *Poult. Sci.* 79:1705–1709.
- Schibli, D.J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T.D., Weincek, McCray, Jr, P.B., Tack, B.F., Vogel, H.J. (2002). The Solution Structures of the Human β -Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(10): 8279-8289.
- Schröder, J.M. (1999). Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell. Mol. Life. Sci.* 56(1-2):32-46.
- Scocchi, M., Bontempo, D., Boscolo, S., Tomasinsig, L., Giulotto, E., and Zanetti, M. (1999). Novel cathelicidins in horse leukocytes. *FEBS Lett.* 57, 459–464.
- Scott, M., Vreugdenhil, A.C.E., Buurman, W.A., Hancock, R.E.W., Gold, M.R. (2000). Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. *Journal of Immunology*. 164: 549-553.

- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H., Cullor, J. S. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268: 6641-6648.
- Selsted, M.E. Ouellette, A.J. (1995). Defensins in Granules of phagocytic and Non-phagocytic Cells. *Trends in Cell Biology.* 5: 114-119.
- Selsted, M.E., Brown, D.M., DeLange, R.J., Lehrer, R.I. (1983). Primary Structures of MCP-1 and MCP-2, Natural Peptide Antibiotics of Rabbit Lung Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry.* 258(23): 14485-14489.
- Selsted, M.E., Harwig, S.S.L. (1987). Purification, Primary Structure, and Antimicrobial Activities of a Guinea Pig Neutrophil Defensin. *Infection and Immunity.* 55(9): 2281-1186.
- Selsted, M.E., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Schilling, J.W., Lehrer, R.I. (1985). Primary Structures of Three Human Neutrophil Defensins. *J. Clin. Invest.* 76: 1436-1439.
- Selsted, M.E., Szklarek, D., Lehrer, R.I. (1984). Purification and Antibacterial Activity of Antimicrobial Peptides of Rabbit Granulocytes. *Infection and Immunity.* 45(1): 150-154.
- Selsted, M.E., Tang, Y-Q., Morris, W.L., McGuire, P.A., Novotny, M.J., Smith, W., Henschen, A.H., Cullor, J.S. (1993). Purification Primary Structures and Antibacterial Activities of β -Defensins, a New Family of Antimicrobial Peptides from Bovine Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry.* 268(9): 6641-6648.
- Shamova, O., Brogden, K.A., Zhao, C., Nguyen, T., Korkryakov, V.N., Leherer, R.I. (1999). Purification and Properties of Proline-Rich Antimicrobial Peptides from Sheep and Goat Leukocytes. *Infection and Immunity.* 67(8): 4106-4111.
- Shi, J., Zhang, G., Wu, H., Ross, C., Blecha, F., Ganz, T. (1999). Porcine Epithelial β -Defensin 1 Is Expressed in the Dorsal Tongue at Antimicrobial Concentrations. *Infection and Immunity.* 67(6): 3121-3127.
- Shimoda, M., Ohki, K., Shimamoto, Y., Kohashi, O. (1995). Morphology of Defensin-Treated *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity.* 63(8): 2886-2891.
- Singh, P.K., Tack, B.F., McCray, P.B., JR.and Welsh, M.J. (2000). Synergistic and Additive Killing by Antimicrobial Factors Found in Human Airway Surface Liquid. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L799-L805.
- Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M., Gennaro, R. (1999). SMAP-29: A Potent Antibacterial and Antifungal Peptide from Sheep Leukocytes. *FEBS Letters.* 463: 58-62.
- Skerlavaj, B., Scocchi, M., Gennaro, R., Risso, A., Zanetti, M. (2001). Structural and Function Analysis of Horse Cathelicidin Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(3): 715-722.

- Steinberg, D. A., Hurst, M.A., Fujii, C.A., Kung, A.H.C., Ho, J.F., Cheng, F.C., Louny, D.J., Fiddes, J.C. (1997). Protegrin-1: A Broad-Spectrum, Rapidly Microbial Peptide with In Vivo Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(8): 1738-1742.
- Steinberg, D. A., Lehrer, R. I. (1997). Designer assays for antimicrobial peptides: disputing the “one size fits all” theory. Dans: Shafer W M, editeur. *Methods in molecular biology*. Totowa, N.J: Humana Press; 1997.
- Takemura, H., Kaku, M., Kohno, S., Hirakata, Y., Tanaka, H., Yoshida, R., Tomono, K., Koga, H., Wada, A., Hirayama, T., Kamihira, S. (1996). Evaluation of Susceptibility of Gram-Positive and –Negative Bacteria to Human Defensins by Using Radial Diffusion Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(10): 2280-2284.
- Tang, Y-Q., Yuan, J., Miller, C.J., Selsted, M.E. (1999). Isolation, Characterization, cDNA Cloning, and Antimicrobial Properties of Two Distinct Subfamilies of α -Defensins from Rhesus Macaque Leukocytes. *Infection and Immunity*. 67(11): 6139-6144.
- Tapan, A., Daniel, K., George, H., George, V., Gideon, G. (1986). Tripeptide structure of bursin, a selective B-cell-differentiating hormone of the bursa of Fabricius. *Science*. 231:997–9.
- Tencza, S.B., Douglass, J.P., Creighton Jr., D.J., Montelaro, R.C., Mietzner, T.A. (1997). Novel Antimicrobial Peptides Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Other Lentivirus Transmembrane Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(11): 2394-2398.
- Toivanen, P (2004) Bursa of Fabricius. *Encyclopedia of Immunology*. PP 393-396
- Topp, R.C., Carlson, H.C. (1972b). Studies on Avian Heterophils, II- Histochemistry. *Avian Dis*. 16(2): 369-373.
- Topp, R.C., Carlson, H.C. (1972c). Studies on Avian Heterophils, III- Phagocytic Properties. *Avian Dis*. 16(2): 374-380.
- Travis, S.M., Anderson, N.N., Forsyth, W.R., Espiritu, C., Conway, B.D., Greenberg, E.P., McCray, Jr, P.B., Lehrer, R.I., Welsh, M.J., Tack, B.F. (2000). Bactericidal Activity of Mammalian Cathelicidin-Derived Peptides. *Infection and Immunity*. 68(5): 2748-2755.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N-N., Waring, A.J., Lehrer, R.I. (1998). Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(9): 2206-2214.
- Valore, E.V., Martin, E., Harwig, S.S.L., Ganz, T. (1996). Intramolecular Inhibition of Human Defensin HNP-1 by Its Propiece. *J. Clin. Invest*. 97(7): 1624-1629.

- Valore, E.V., Park, C.H., Quayle, A.J., Wiles, K.R., McCray Jr, P.B., Ganz, T. (1998). Human β -Defensin-1: An Antibacterial Peptide of Urogenital Tissues. *J. Clin. Invest.* 101: 1633-1642.
- Van Dijk, A., Tersteeg-Zijderveld, M.H.G., Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L.M., Jansman, A.J.M., Veldhuizen, E.J.A., and Haagsman, H.P., (2009). Chicken heterophils are recruited to the site of Salmonella infection and release antibacterial mature Cathelicidin-2 upon stimulation with LPS. *Mol. Immunol.* 46, 1517–1526.
- Vel, W.A.C., Namavar, F., Werweij, A.M.J., Pubben, A.N.B., MacLaren, D.M. (1984). Killing Capacity of Human Polymorphonuclear Leukocytes in Aerobic and Anaerobic Conditions. *J. Med. Microbiol.* (18): 173-180.
- Wakenell, P. S. (2010). Hematology of Chickens and Turkeys. Dans: Schalm's veterinary hematology, Weiss, D. J, Wardrop, K.J. (eds.). 6th ed. Wiley-Blackwell.
- Walton, E., (1978). The Preparation, Properties and Action on Staphylococcus Aureus of Purified Fractions From the Cationic Proteins of Rabbit Polymorphonuclear leukocytes. *Br. J. exp. Path.* 59: 416-413.
- Weiss, D.J., Ramaiah, S.K., Walcheck, B. (2010). Neutrophil distribution and function. Dans: Schalm's veterinary hematology, Weiss, D. J, Wardrop, K.J. (eds.). 6th ed. Wiley-Blackwell.
- Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I., Odelberg, H. (1978). Purification and Characterization of a Potent Bactericidal and Membrane Active Protein from the Granules of Human Polymorphonuclear Leukocytes. *The Journal of biological chemistry.* 253(8): 2664-2672.
- White, S.H., Wimley, W.C., Selsted, M.E. (1995). Structure, Function, and membrane Integration of Defensins. *Current Opinion in Structural Biology.* 5: 521-527.
- Wilde, C.G., Griffith, J.E., Marra, M.N., Snable, J.L., Scott, R.W. (1989). Purification and Characterization of Human Neutrophil Peptide 4, a Novel Member of the Defensin Family. *The Journal of Biological Chemistry.* 264(19): 11200-11203.
- Wilson, C.L., Ouellette, A.J., Satchell, D.P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y.S., Stratman, J.L., Hultgren, S.J., Matrisian, L.M., Parks, W.C. (1999). Regulation of Intestinal α -Defensin Activation by the Metalloproteinase Matrilysin in Innate Host defense. *Science.* 286: 113-117.
- Wimley, W.C., Selsted, M.E., White, S.H. (1994). Interactions Between Human Defensins and Lipid Bilayers: Evidence for Formation of Multimeric Pores. *Protein Science.* 3: 1362-1373.
- Witko-Sarsat, V, Cramer, E.M., Hieblot, C., Guichard, J., Nusbaum, P., Lopez, S., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (1999). Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: Evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* 94:2487–2496.

- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-mecarelli, L. (2000). Biology of Disease, Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation*. 80(5): 617-653.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R.E.W. (1999). Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 38: 7235-7242.
- Yamamoto, Y., Glick, B. (1982). A Comparison of the Immune Response Between Two Lines of Chickens Selected for Differences in the Weight of the Bursa of Fabricius. *Poultry Sci*. 61:2129–2132.
- Zeya, H.I., Spitznagel, J.K. (1966a). Cationic Proteins of polymorphonuclear Leukocyte Lysosomes. I- Resolution of Antibacterial and Enzymatic Activities. 91(2): 750-754.
- Zeya, H.I., Spitznagel, J.K. (1966b). Cationic Proteins of polymorphonuclear Leukocyte Lysosomes. II- Composition, Properties, and Mechanism of Antibacterial Action. *Journal of Bacteriology*. 91(2): 755-762.
- Zhang, H., Porro, G., Orzech, N., Mullen, B., Liu, M., Slutsky, S. (2001). Neutrophil Defensins Mediate Acute Inflammatory Response and Lung Dysfunction in Dose-Related Fashion. *Am. J. Physiol Lung Cell. Mol. Physiol*. 280: L947-L954.
- Zhao, C., Nguyen, T., Liu, L., Sacco, R.E., Brogden, K.A., Lehrer, R.I. (2001). Gallinacin-3, an Inducible Epithelial β -Defensin in the chicken. *Infection and Immunity*. 69(4): 2684-2691.
- Zhao, C., Nguyen, T., Liu, L., Shamova, O., Brogden, K., Lehrer, R.I. (1999). Differential Expression of Caprine β -Defensin in Digestive and Respiratory Tissues. *Infection and Immunity*. 67(11): 6221-6224.

Résumé: Les hétérophiles du poulet sont l'équivalent des neutrophiles chez les mammifères, ils constituent la pierre angulaire du système immunitaire inné et, pour cela, ils sont dotés de mécanismes de défenses très efficaces pour s'opposer à l'invasion des microorganismes.

Cette étude a été réalisée sur des poulets de chair pour mettre en évidence l'influence de la bursectomie chirurgicale, réalisée dans les 24h post-éclosion, sur quelques paramètres hématologiques et immunitaires et spécialement sur les hétérophiles. Les granulations cytoplasmiques des hétérophiles sont récupérées par centrifugation de gradient de densité et le contenu protéique est extrait. L'activité antibactérienne de ces extraits a été testée contre des souches standards de *S. aureus* et *E. coli* par une méthode très sensible de diffusion radiale. Les résultats montrent que les granules cytoplasmiques des hétérophiles issus de sujets sans BF gardent une activité antibactérienne intacte malgré l'ablation d'un organe lymphoïde central.

Cette activité antibactérienne est un mécanisme indépendant d'oxygène et afin de connaître la nature des substances responsables de cette activité antibactérienne, une électrophorèse de ces substances bioactives a été effectuée sur gel de polyacrylamide traité à l'acide et à l'urée (AU-PAGE) montre que ces substances possèdent une migration cathodale remarquable.

Notre étude confirme l'activité antibactérienne non oxydative des hétérophiles du poulet de chair et approuve leur rôle clé dans le système immunitaire constituant ainsi un bouclier protecteur très efficace contre les microorganismes envahissants.

Mots clés: poulet de chair, hétérophiles, bourse de Fabricius, activité antibactérienne.

المخلص: تعد الخلايا المتغايرة عند الدجاج نظير الخلايا الحبيبية المتعادلة عند الثدييات، وتمثل حجر الزاوية للمناعة الفطرية وهي مجهزة بآليات دفاعية فعالة جدا للتصدي لأي هجوم من طرف الكائنات المجهرية الدقيقة.

أجريت هذه الدراسة على الدجاج اللاحم للتعرف على التأثير الناجم عن إزالة غدة **Fabricius** جراحيًا خلال الأربعة والعشرين ساعة التي تلت الفقس على بعض المعايير الدموية والمناعية وخصوصًا على الخلايا المتغايرة. تم استخراج الحبيبات السيتوبلازمية للخلايا المتغايرة واستخلاص محتواها ودراسة تأثيره على *E. coli* و *S. aureus*. وهذا باستعمال طريقة حساسة جدا للانتشار الشعاعي. وضحت نتائج الدراسة احتفاظ الحبيبات السيتوبلازمية للخلايا المتغايرة في المجموعة التي أزيلت لها غدة **Fabricius** بمخائصها المثبطة لنمو البكتيريا رغم إزالة غدة لمفاوية مركزية.

بعد هذه الفعالية المضادة للميكروبات من الآليات غير المؤكسدة، ولأجل معرفة طبيعة المواد المسؤولة عن هذا التثبيط تم القيام بالترحيل الكهربائي لها في هلام **polyacrylamide** المعالج بالحمض واليوريا (AU-PAGE) حيث اظهر ذلك هجرة معتبرة لهذه المواد اتجاه القطب السالب. أكدت هذه الدراسة وجود الفعالية غير المؤكسدة المضادة للبكتيريا عند الخلايا المتغايرة عند الدجاج اللاحم وهو ما يؤكد دورها المحوري في الجهاز المناعي حيث تشكل الدرع الواقية والفعالة ضد الكائنات المجهرية الدقيقة المهاجمة.

الكلمات الدالة: الدجاج اللاحم، الخلايا المتغايرة، غدة **Fabricius**، الفعالية ضد البكتيريا.

Abstract: Heterophils in broilers are the counterpart of mammalian neutrophils. They constitute the angular stone of the innate immune system against invading microorganisms with highly potential antimicrobial equipment.

This study was carried out on broilers to show the effect of surgical bursectomy, realized 24h post-eclosion, on some blood and immune parameters especially on heterophils. The cytoplasmic granules obtained by centrifugation gradient were extracted and their contents were tested against standard strains of *S. aureus* and *E. coli* by using an ultrasensitive radial diffusion method. The results showed that the cytoplasmic granules of heterophils obtained from bursectomized chickens keep their antibacterial activity even the ablation of a central lymphoid organ.

This antibacterial activity is oxygen independent mechanism and to show the nature of these substances, one-dimensional acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis (AU-PAGE) of granule extract was done and showed remarkable cathodal migration.

Our study confirms the non-oxidative antibacterial activity of heterophils in broilers and their key roles in the immune system was approved and form a very powerful shield against invading microorganisms.

Key words: broilers, heterophils, bursa of Fabricius, antibacterial activity.