

LA COLONISATION BACTERIENNE EST ESSENTIELLE POUR LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME IMMUNITAIRE INTESTINAL DU POULET

Bernd Kaspers¹, Sarah Lettmann¹, Susanne Röhl¹, Catherine Schouler² et Philippe Velge²

¹DEPARTMENT FOR VETERINARY SCIENCES, Institute for Animal Physiology, University of Munich, Germany

²ISP, INRA, UNIVERSITE FRANÇOIS RABELAIS DE TOURS, 37380 Nouzilly, France
Kaspers@lmu.de

INTRODUCTION

La muqueuse intestinale est une structure fascinante. Une simple barrière épithéliale sépare l'intérieur du corps du milieu intestinal où se trouvent les microorganismes (bactéries, champignons, virus et archaé) qui composent le microbiote et les nutriments. Le microbiote est composé de plus de 1000 espèces microbiennes différentes avec un nombre de bactéries équivalent au nombre de cellules corporelles et près de 100 fois plus de gènes que le génome humain. Le microbiote est bien connu pour sa capacité à digérer des produits végétaux, telles que certaines fibres, autrement inaccessible pour le vertébré en tant que source nutritive. Cependant, ces dernières années, il a été démontré que le microbiote influait non seulement les processus métaboliques mais également le développement et la fonctionnalité du système immunitaire. Inversement, la composition du microbiote semble être modulée par le système immunitaire. L'étude du dialogue entre le microbiote, l'épithélium intestinal et le système immunitaire est devenu un axe de recherche en immunologie depuis une dizaine d'années. Les immunologistes ont utilisé des modèles de souris axéniques (animaux stériles) ou gnotoxéniques (animaux avec un microbiote défini). Ces travaux ont fourni des informations riches en modèle murin alors que la connaissance est plus limitée chez les espèces animales domestiques.

1. Le système immunitaire aviaire

Le système immunitaire aviaire est en grande partie semblable à son homologue mammifère, même si certaines différences frappantes sont trouvées, comme l'absence de ganglions lymphatiques et la présence dans le cloaque d'un organe unique pour le développement des lymphocytes B seulement trouvé dans les oiseaux et appelé la bourse de Fabricius. Le système immunitaire est constitué de deux branches : le système inné et le système adaptatif. Le système immunitaire inné fournit une réponse rapide et non spécifique à une exposition à un pathogène alors que le système immunitaire

adaptatif est responsable du contrôle spécifique des pathogènes et de la mémoire immunologique. Les deux systèmes sont constitués de composants cellulaires et solubles dont certains sont connus depuis longtemps, comme les macrophages et les hétérophiles, les peptides antimicrobiens, les composants du système du complément et les anticorps. D'autres ont été caractérisés plus récemment chez la souris, mais restent encore mal définis chez les oiseaux (par exemple les sous-groupes de lymphocytes T ou les cellules lymphoïdes innées). Les deux branches du système immunitaire interagissent étroitement l'une avec l'autre pour assurer une protection adéquate en communiquant au travers des molécules de surface cellulaire et des facteurs solubles appelés cytokines. Les cytokines jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire aux agents pathogènes, dans la vaccination, dans l'immuno-régulation et dans le contrôle de l'inflammation. Depuis la publication initiale du génome du poulet, des progrès significatifs ont été réalisés en immunologie aviaire. Les données génomiques ont fourni des informations de séquence pour les gènes impliqués dans l'immuno-régulation et la fonction des tissus lymphoïdes de la rate, du thymus et de la bourse de Fabricius. En revanche, moins de données sont disponibles pour les tissus muqueux du poumon, du tractus reproducteur et de l'intestin.

2. Développement du système immunitaire inné intestinal du poulet

Par immunohistologie, analyse holistique d'expression de gènes et tests fonctionnels, nous avons étudié le développement du système immunitaire de l'intestin depuis l'éclosion jusqu'à l'âge de sept semaines conjointement chez des poulets de chair et des pondeuses. Les macrophages sont retrouvés en grand nombre dès le jour de l'éclosion tout le long de l'intestin. Leur nombre augmente en parallèle à la croissance intestinale (figure 1). Les macrophages sont localisés dans la lamina propria et ainsi bien positionnés pour détecter rapidement les pathogènes envahissants ou les dommages épithéliaux. Des études sur des

modèles d'infection à *Salmonella enterica* de poussins d'un jour ont révélé que ces macrophages sont entièrement fonctionnels et répondent à l'invasion par le pathogène par la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chimiokines pour attirer plus de phagocytes dans le tissu muqueux ce qui aide à éliminer l'infection. Quelques heures après l'infection, l'interleukine-8 (IL-8) et la chimiokine CCL-16 sont produites et attirent

respectivement des hétérophiles et des macrophages du sang. De plus, l'expression des gènes codant des cytokines effectrices régulant la réponse antimicrobienne tel que l'interféron-gamma a été détectée par RT-PCR. Ainsi, les macrophages et d'autres composants du système immunitaire inné sont présents et fonctionnels à l'éclosion lorsque l'oiseau rencontre les premiers organismes microbiens de son environnement.

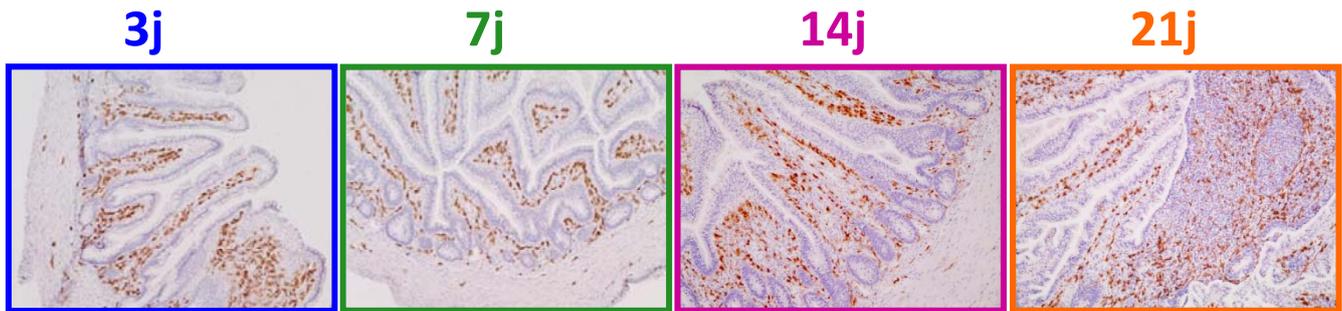


Figure 1: Coloration immunohistologique des macrophages dans le caecum des poules à différents âges (3, 7, 14 et 21 jours post éclosion). Les macrophages se trouvent dans la lamina propria mais pas dans l'épithélium.

En plus des composants cellulaires du système immunitaire inné, les composants solubles sont trouvés tôt après l'éclosion. Ceux-ci comprennent plusieurs molécules de la phase aiguë de la famille des pentraxines et des peptides antimicrobiens de la famille des défensines. Cependant, leur rôle fonctionnel dans l'intestin aviaire n'a pas été étudié en raison de l'absence de modèles animaux appropriés déficients en un ou plusieurs de ces facteurs. Les peptides antimicrobiens sont produits par des cellules épithéliales des cryptes appelées cellules de Paneth et sont sécrétés dans la couche du mucus. Les bactéries envahissant la barrière du mucus entrent en contact avec ces facteurs et sont efficacement lysées. La plupart des auteurs s'accordent à dire que les cellules de Paneth sont absentes chez le poulet et même si l'ARNm spécifique des défensines se trouve dans les échantillons de tissus intestinaux, on ne sait pas très bien où ils sont produits et quels mécanismes provoquent leur synthèse et leur sécrétion.

3. Développement des composants intestinaux du système immunitaire adaptatif

Alors que le système immunitaire inné semble être fonctionnel à l'éclosion, les composants du système immunitaire adaptatif sont absents à ce moment-là.

Des études de développement ont montré que les lymphocytes B, les producteurs d'anticorps, commencent à migrer de la bourse de Fabricius autour de l'éclosion. De même, la migration des lymphocytes T du thymus commence peu avant l'éclosion, mais les grandes vagues de migration cellulaire ne sont observées que quelques jours après l'éclosion. Il est important de noter que les deux populations de lymphocytes sont rares dans le tissu intestinal pendant les deux premières semaines après l'éclosion (figure 2). Par la suite, de plus en plus de lymphocytes colonisent les tissus muqueux et on observe la formation d'agrégats lymphoïdes. La présence de lymphocytes peut être démontrée dans la lamina propria et dans l'épithélium sous forme de lymphocytes intra-épithéliaux. Cette dernière population est constituée de cellules T spécialisées dans le contrôle de cellules infectées par des virus. Ces lymphocytes sont appelés lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et sont caractérisés par l'expression de la protéine de surface cellulaire CD8. Les cellules T-helper (exprimant la molécule CD4) sont plus restreintes à la lamina propria et se trouvent à proximité immédiate d'agrégats lymphoïdes. Les lymphocytes B commencent à coloniser l'intestin à peu près au même moment. Ils forment des structures lymphoïdes organisées appelées plaques de Peyer et tonsilles caecaux.

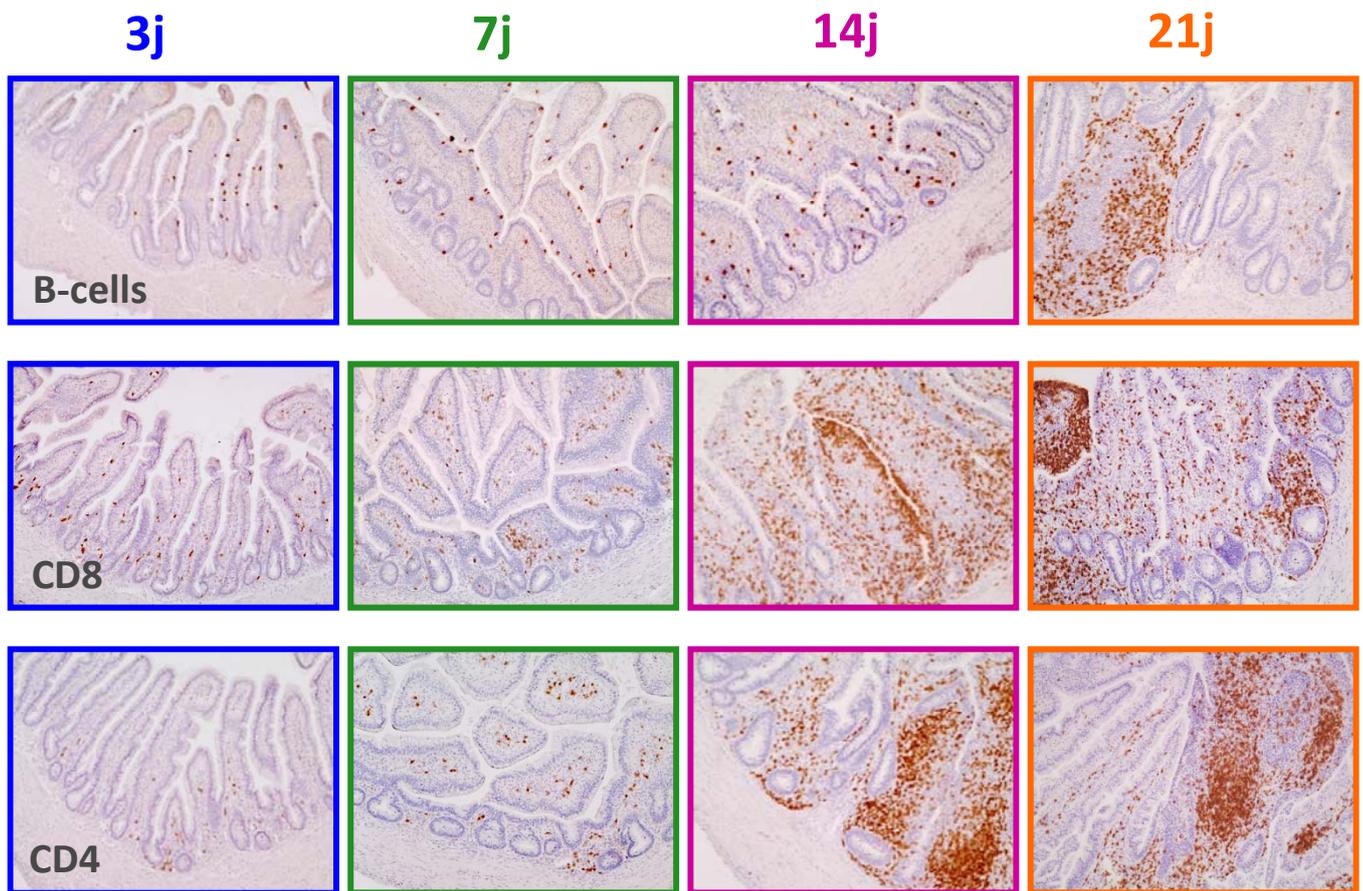


Figure 2: Coloration immunohistologique des lymphocytes B, des lymphocytes T CD8 + et CD4 + dans le caecum de poudeuses à différents âges. Un petit nombre de lymphocytes est trouvé au cours des deux premières semaines d'âge, mais la colonisation progresse rapidement par la suite. A trois semaines, on observe une formation d'agrégats lymphoïdes.

Des études réalisées il y a plus de 50 ans avec des oiseaux élevés dans des conditions exemptes de germes ont montré que la colonisation bactérienne a une influence significative sur la maturation du système immunitaire associé à l'intestin. Cette observation a été confirmée dans des modèles de souris sans germes et dans nos propres études avec des poulets axéniques. Pour définir l'impact du microbiote, nous avons étudié des groupes d'oiseaux axéniques, monoxéniques (colonisés par la souche d'*Escherichia coli* Nissle1917), gnotoxénique (colonisés par un mélange de quatre souches bactériennes : *E. coli*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, et *Clostridium*). Ces oiseaux ont été comparés à des poulets avec un microbiote (EOPS, exempt d'organisme pathogène spécifique).

Même en l'absence complète d'un microbiote, le système immunitaire inné s'est développé normalement. Aucune différence n'a été observée en ce qui concerne la colonisation par les macrophages et des analyses par microarrays ont montré des profils d'expression non perturbés pour plusieurs gènes du système immunitaire inné. De façon très contrastée, le développement du système

immunitaire adaptatif a été fortement altéré. Les lymphocytes B étaient absents dans la lamina propria d'oiseaux de quatre semaines malgré le développement normal des cellules B dans la bourse de Fabricius. Les régions formées des cellules B étaient fortement sous-développées dans les tonsilles caecales et ne contenaient pas de centres germinatifs (Figure 3), qui sont essentiels pour la production d'anticorps IgA et IgY. En conséquence, la production d'IgA était absente chez les oiseaux axéniques dans l'intestin et dans le sérum (figure 4). De façon similaire, nous avons observé l'absence de lymphocytes T CD4 + et CD8 + chez les animaux axéniques. La monocolonisation par *E. coli* n'a pas permis la réversion totale de ce phénotype mais a conduit à la production d'IgA dans le sérum. Ces anticorps étaient, dans une large mesure, spécifiques de *E. coli*. Les oiseaux colonisés par quatre souches bactériennes ont montré une maturation significative du système immunitaire adaptatif dans l'intestin. Ceci était plus prononcé dans les tonsilles caecales que dans les centres germinatifs et la production d'IgA a été observée.

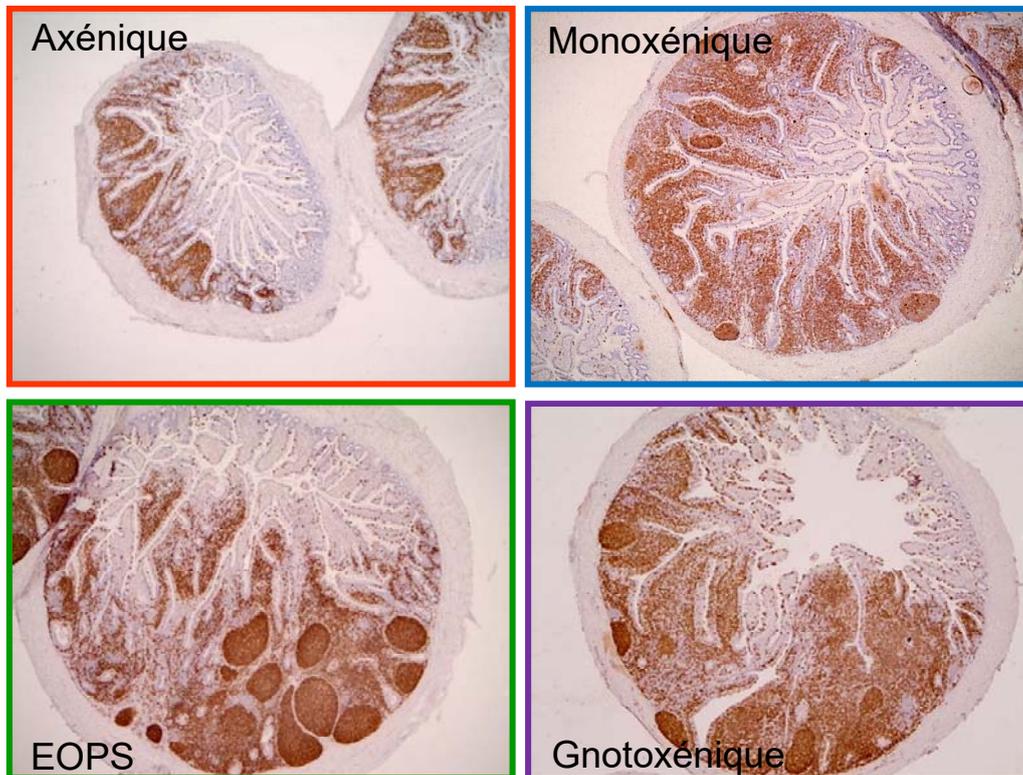


Figure 3: Coloration immunohistologique des lymphocytes B dans les tonsilles cécaux de pondeuses axéniques, monoxéniques, gnotoxéniques ou EOPS. L'absence de microbiote (axénie) conduit à une structure très peu développée du tonsille cécal. La réversion du phénotype n'a été que partielle chez les oiseaux mono-colonisés (*E. coli*). La colonisation avec quatre souches a favorisé la maturation et a induit la formation de quelques petits centres germinaux en comparaison avec les témoins EOPS.

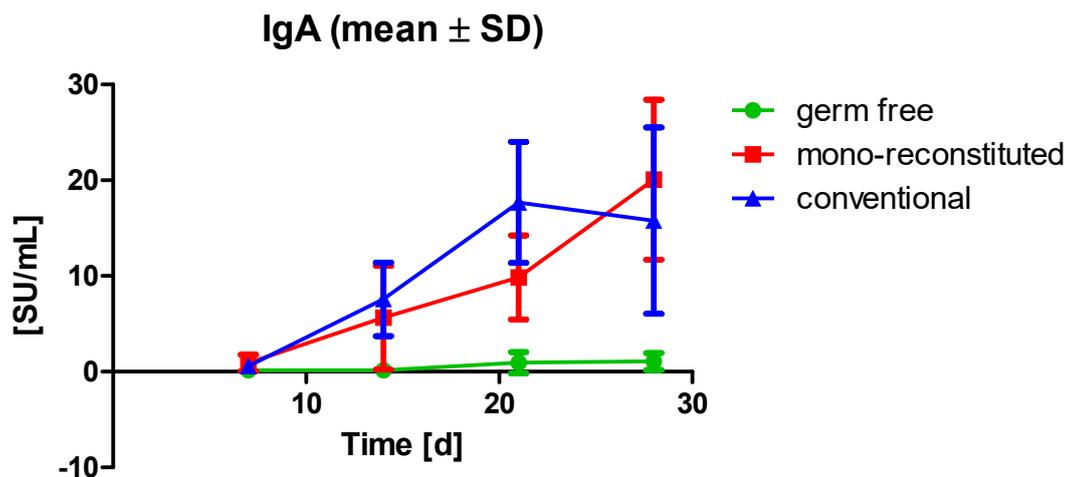


Figure 4: Concentration d'immunoglobuline A dans le sérum d'oiseaux axéniques, gnotoxéniques et EOPS (n = 5). On note une quasi absence d'IgA chez les oiseaux axéniques.

Les observations immunohistologiques ont été corroborées par des analyses d'expression génique. La comparaison des données de microarrays a montré la surexpression d'un grand nombre de gènes associés à la fonction immunitaire et aux processus de développement chez les poulets EOPS par rapport aux animaux axéniques. Le plus frappant est que les gènes liés à la maturation des cellules B sont sous exprimés chez les oiseaux axéniques, ceci étant en accord avec le phénotype observé par immunohistologie. L'AID, une enzyme essentielle pour la migration des classes d'immunoglobulines d'IgM à IgA et IgY, était faiblement exprimée chez les oiseaux axéniques mais significativement plus exprimée chez les poulets monoxéniques. Le niveau d'expression est augmenté chez les animaux gnotobiotiques pour atteindre un niveau d'expression équivalent à celui observé chez les oiseaux EOPS.

Dans les conditions naturelles, les oiseaux éclosent sous la poule et absorbent la nourriture et le microbiote maternel dans les premières heures après l'éclosion. Ainsi, les conditions EOPS peuvent ne pas refléter le modèle naturel du développement du système immunitaire. Pour répondre à cette question, nous avons comparé les oiseaux d'un génotype donné élevé soit dans des conditions EOPS soit sur des litières sur lesquelles avaient été élevées des poules pondeuses pendant 4 jours. Ainsi, ce groupe avait un accès immédiat à une microbiote aviaire établi. Bien que nous n'ayons pas observé de différences significatives dans le développement du système immunitaire inné, le système immunitaire adaptatif associé à l'intestin s'est développé plus tôt. De plus, les taux d'IgA dans le sang, la bile et le caecum étaient jusqu'à trois fois plus élevés chez les oiseaux recevant le microbiote maternel en comparaison avec les oiseaux EOPS.

CONCLUSION

Le développement du système immunitaire intestinal est contrôlé par des facteurs ontogéniques et environnementaux. Le système immunitaire inné se développe au début de l'ontogenèse et est présent à l'éclosion, protégeant ainsi les oiseaux pendant la phase critique de rencontre soudaine avec des microbes après l'éclosion. Son développement ultérieur n'est pas fortement influencé par le microbiote. En revanche, le développement du système immunitaire adaptatif est fortement influencé par la colonisation bactérienne de l'intestin. L'absence de bactéries conduit à des défauts de développement sévères avec un manque de lymphocytes B et T dans la muqueuse intestinale et l'absence de formation d'anticorps. Nos études indiquent clairement que la maturation complète du système immunitaire de l'intestin nécessite un

microbiote complexe. Cependant, la composition précise d'un microbiote optimale est encore inconnue. Dans les conditions naturelles, les poussins entrent en contact immédiat avec la flore maternelle tandis que les oiseaux éclos dans les conditions commerciales de production avicole sont essentiellement stériles. On ne sait toujours pas très bien comment ces conditions affectent le développement du système immunitaire des muqueuses, la capacité de contrôler les microorganismes pathogènes, la santé et le bien-être des animaux. Il est intéressant de noter que les études en modèle murin ont montré que les nutriments et les produits de fermentation influent également sur l'état fonctionnel du système immunitaire des muqueuses soit directement, soit par l'intermédiaire de médiateurs sécrétés par les cellules épithéliales. Le rôle de l'épithélium, du mucus, des macro et micronutriments sur le système immunitaire aviaire n'a pas été étudié à ce jour mais devrait être pris en compte dans des études futures.