

EFFETS COMBINES DE LA GENETIQUE ET DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LA REPONSE VACCINALE CHEZ LA POULE PONDEUSE.

**Lecoeur Alexandre¹, Blanc Fany¹, Gourichon David², Bruneau Nicolas¹, Burlot
Thierry³, Calenge Fanny¹, Pinard-van der Laan Marie-Hélène¹**

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

²*INRAE, PEAT, Nouzilly, France,*

³*NOVOGEN, 5 rue des compagnons, Secteur du Vau Ballier, 22960 Plédran, France*

alexandre.lecoeur@inrae.fr

RÉSUMÉ

La plupart des vaccins présentent une efficacité variable. Les variations génétiques de l'hôte et celles du microbiote intestinal en sont deux des raisons probables. Etudier leurs effets combinés sur la réponse vaccinale est notre objectif. Cette étude a reposé sur 4 lignées de poule pondeuse : 2 lignées expérimentales différant pour le niveau de leur réponse vaccinale, et 2 lignées commerciales éloignées génétiquement. Une forte perturbation du microbiote intestinal a été induite par un cocktail d'antibiotiques donné à deux temps différents (de 1 à 3 jours d'âge ou pendant 3 jours avant vaccination). La réponse vaccinale a été suivie par des tests d'inhibition de l'hémagglutination et la composition du microbiote caecal a été évaluée par analyse de séquences amplifiées du gène de l'ARNr 16S. Les quatre lignées ont présenté des niveaux de réponse vaccinale différents 15, 19 et 21 jours après vaccination. Nous avons logiquement observé une réponse plus élevée de la lignée sélectionnée génétiquement pour ce caractère, intermédiaire pour la lignée témoin non sélectionnée et faible pour les deux lignées commerciales. Les effets des antibiotiques sur la réponse vaccinale ont varié selon la lignée, avec une dynamique différente selon le temps. Ainsi, une lignée commerciale a montré une réponse plus faible que les autres dans le groupe ayant reçu les antibiotiques juste avant vaccination. Enfin, la prise d'antibiotiques a eu un effet sur la composition du microbiote intestinal caecal au jour 43 (fin de l'expérience) pour chaque lignée. Le microbiote des animaux traités est moins riche et moins diversifié, avec un microbiote composé de quelques VSA (Variant de séquence d'amplicon) dominants d'abondances extrêmement élevées. De plus, nous avons identifié un effet de groupe dans presque tous les cas. Ces résultats montrent que la prise d'antibiotiques a modifié le microbiote des quatre lignées jusqu'à 20 jours, ou 40 jours après le traitement. Cette expérience confirme l'effet de la prise d'antibiotiques et de la lignée génétique sur le niveau de réponse vaccinale et la composition du microbiote dans les lignées étudiées. Le rôle du microbiote intestinal dans la variation de la réponse vaccinale reste à approfondir.

ABSTRACT

Combined effects of genetics and gut microbiota on vaccine response in laying hens.

Most vaccines vary in their effectiveness. Genetic variations in the host and in the gut microbiota are two of the likely reasons. Our main objective was to study their combined effects on vaccine response. This study was based on 4 lines of laying hens: 2 experimental lines differing in their vaccine response levels, and 2 genetically distant commercial lines. A strong disruption of the gut microbiota was induced by a cocktail of antibiotics given at two different times (from 1 to 3 days of age; or during 3 days before vaccination). Vaccine response was monitored by hemagglutination inhibition assays and the composition of the cecal microbiota was assessed by analysis of amplified 16S rRNA gene sequences. The four lines showed different levels of vaccine response 15, 19 and 21 days after vaccination. We logically observed a higher response of the line genetically selected for this trait, intermediate for the unselected control line and low for the two commercial lines. The effects of antibiotics on the vaccine response varied by line, with different dynamics over time. For example, one commercial line showed a weaker response than the others in the group that received antibiotics just before vaccination. Finally, antibiotic intake has an effect on the composition of the caecal gut microbiota at day 43 (end of the experiment) for each line. The microbiota of treated animals is less rich and diverse, with a microbiota composed of a few dominant ASV (Amplicon Sequence Variants) of extremely high abundance. Moreover, we identified by a PERMANOVA analysis a group effect in almost all cases. These results show that antibiotics altered the microbiota of the four lines up to 20 days, or 40 days after treatment. This experiment confirms the effect of both antibiotics' intake and genetic lineage on the level of vaccine response and on the caecal microbiota composition. The role of caecal microbiota in the variation of the vaccine response levels observed remains to be further explored

INTRODUCTION

La vaccination est une des stratégies les plus efficaces pour la prévention des maladies infectieuses dans les élevages avicoles. Cependant, la plupart des vaccins présentent une efficacité variable. Les variations génétiques de l'hôte et celles du microbiote intestinal sont deux des probables facteurs de variation de cette efficacité (Ciabattini et al., 2019 ; Zimmerman et al., 2018). Nous avons démontré le rôle de la génétique de l'hôte dans les variations de réponse vaccinale en réalisant avec succès la sélection génétique de poules pondeuses White Leghorn présentant une plus forte réponse vaccinale contre le virus de la maladie de Newcastle (Pinard - van der Laan, 2002) : la lignée ND3, sélectionnée depuis maintenant plus de 25 ans ; et la lignée non sélectionnée nommée « Témoin » ou « TEM ». Par ailleurs, le microbiote intestinal, chez la poule comme chez tous les animaux d'élevage, interagit étroitement avec l'immunité de l'hôte (Broom et al., 2018), si bien que l'on peut faire l'hypothèse qu'il pourrait avoir un effet sur la réponse vaccinale. Le rôle du microbiote intestinal dans la réponse vaccinale est moins connu, mais quelques études démontrent son influence (Valdez et al., 2014 ; Borey et al., 2021).

La présente étude a pour objectif l'étude de l'effet à la fois du fonds génétique, et du microbiote intestinal sur la réponse vaccinale. Nous avons comparé les réponses de 4 lignées de poules pondeuses : les 2 lignées expérimentales **ND3** et **TEM** et 2 lignées commerciales éloignées génétiquement l'une de l'autre, de la société Novogen, l'une issue d'une lignée Rhode Island (**RIR**) et l'autre d'une lignée White Leghorn (**LEG**).

Afin d'étudier l'impact de la composition du microbiote intestinal sur la réponse vaccinale, nous avons modifié sa composition via l'ingestion d'un cocktail d'antibiotiques avant la vaccination.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

L'étude inclut 204 animaux des 4 lignées ND3, TEM, RIR et LEG. Tous les animaux ont éclos au sein du même couvoir de l'unité PEAT (Nouzilly) puis ont été distribués en 13 lots différents (Figure 1).

Le microbiote intestinal a été perturbé par un cocktail d'antibiotiques composé de 3 antibiotiques de différentes familles avec différents modes d'action afin de créer une perturbation globale du microbiote (l'amoxicilline, la streptomycine et le métronidazole). Pour chaque lignée, les animaux ont donc été répartis en :

- un groupe de 24 individus vaccinés et non traités aux antibiotiques (Groupe **WA**),

- un groupe de 12 animaux vaccinés et traités aux antibiotiques de J1 à J3 (Groupe **A1**),
- un groupe de 12 animaux vaccinés et traités aux antibiotiques les trois jours précédant la vaccination au virus de Newcastle (NDV) (Groupe **A19**).

Les animaux ont été vaccinés à 3 semaines (J22) contre la maladie de Newcastle (Nobilis Bi Ma5-Clone 30) par goutte dans l'œil.

En plus de ces 12 groupes, un groupe de 12 animaux de la lignée TEM n'a été ni vacciné ni traité pour servir de groupe contrôle (Groupe **CTR**). Cette répartition des animaux est représentée schématiquement dans la figure 1.

Les animaux ont été élevés en cages de 12 poules, et mis à mort à J42 par électronarcose puis dislocation cervicale. Les animaux ont été pesés avant la vaccination (J22) et avant la mise à mort (J42). Des prises de sang ont été effectuées à J36, J40 et J42. Le microbiote caecal a été collecté sur chaque animal post-mortem. Les animaux ont été élevés et sacrifiés conformément à la réglementation (autorisation APAFIS#29749-2021021018217492).

1.2. Composition du microbiote intestinal

Le contenu caecal récupéré à J42 a été congelé immédiatement dans l'azote liquide. Les ADN de ces échantillons ont été extraits par la plateforme @bridge (INRAE Jouy-en-Josas). Le séquençage a été réalisé par un séquenceur Illumina Miseq 2*250 pb, à partir d'amplicons de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S obtenus avec les primers Forward : ACGGRAGGCAGCAG et Reverse : TACCAGGGTATCTAATCCT.

Les séquences ont été analysées grâce au package R Dada2. La table d'ASV (Amplicon Sequence Variant) obtenue a été analysée avec les packages phyloseq et Deseq2.

1.2. Suivi de la réponse à la vaccination

La réponse vaccinale a été mesurée par un test d'inhibition de l'héماغglutination (IHA) qui mesure les anticorps contre les paramyxovirus aviaires de type 1 [APMV1 virus de la maladie de Newcastle]. Le résultat est exprimé par un titre IHA correspondant à un nombre compris entre 0 et 12 : 0 correspondant à une absence totale d'héماغglutination et 1 à 12 (X) correspondant à la dilution $1 \div (2^X)$ la plus faible pour laquelle nous avons observé une héماغglutination.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Evolution du poids

La figure 2 représente la prise de poids entre J22 et J42. Toutes les lignées différaient significativement des autres pour leur poids. La lignée RIR a montré une croissance plus rapide que les trois autres (multiplication de 2.6 du poids vs 2.3). Les traitements antibiotiques n'ont entraîné aucune surmortalité dans les 4 lignées, et aucun problème sanitaire n'a été

observé. Cependant, les traitements ont eu un effet sur la croissance des animaux, différent entre les lignées. Ainsi pour la lignée RIR, le groupe A1 a eu une croissance tendanciellement plus importante que A19 ($p_{\text{adj}} < 0.1$). Pour la lignée TEM, le groupe A19 a eu une croissance significativement plus rapide que A1, WA et CTR ($p_{\text{adj}} < 0.05$).

2.2. Réponse Vaccinale

La figure 3 représente le niveau de réponse vaccinale déterminé par IHA à J42 pour chaque groupe et chaque lignée. ND3 présente la réponse la plus élevée, ce qui est attendu puisque que cette lignée a été sélectionnée sur ce paramètre. La lignée TEM présente un niveau de réponse intermédiaire, tandis que les deux lignées commerciales ont des niveaux de réponse plus faibles que les deux lignées expérimentales, et équivalents entre eux. Cette répartition des lignées s'est avérée similaire aux trois dates prises en compte (J36, J40 et J42 ; données non montrées).

La comparaison des groupes d'animaux pour chaque lignée montre un effet de la prise d'antibiotiques sur la réponse vaccinale, variant en fonction de la lignée. Seule la lignée LEG montre un effet significatif de la prise d'antibiotique sur le niveau de réponse vaccinale, dans les deux lots traités. Le groupe A19 présente une réponse vaccinale plus faible que les deux autres groupes. Cette différence entre groupes, légère à J36, s'accroît au fil du temps avec un pic de réponse vaccinale 3 semaines après injection. Pour la lignée RIR, aucune différence significative entre les 3 groupes n'est observée, quelle que soit la date, probablement du fait d'une forte variabilité du groupe A1. Les niveaux de réponse des lignées ND3 et TEM sont stables entre les groupes. La variabilité de la réponse est très faible et diminue avec le temps. La lignée ND3 a été sélectionnée depuis plusieurs dizaines de générations pour une forte réponse vaccinale, ce qui pourrait rendre une perturbation de cette caractéristique plus difficile.

2.3. Microbiote Intestinal

Nous avons obtenu un total de 12,37 millions de séquences brutes au total, soit une moyenne de 49 700 séquences par échantillon. En sortie de Dada2, la table de taxonomie des 204 individus comportait 5 854 649 séquences, avec en moyennes 28 283 séquences par échantillon, et 9 609 ASV au total. Six individus présentant trop peu de séquences ont été éliminés des analyses (moins de 8 500 séquences). Ces 6 individus étaient répartis dans différentes lignées et groupes : 1 RIR A19, 1 LEG A1, 2 LEG A19, 1 TEM WA, 1 TEM CTR. Nous avons normalisé le jeu de données à 15 928 séquences par individu.

Les microbiotes caeaux des 4 lignées sont très largement dominés par le Phylum *Firmicutes* (entre 95 et 99% des séquences), suivi de *Bacteroidota* (entre 0.1 et 3.3%), *Actinobacteriota* (entre 0.19 et 0.38%),

Proteobacteria (entre 0.1 et 0.43%), ce qui est conforme à ce qui est observé dans la littérature. On observe également quelques séquences du phylum *Desulfobacterota*. La famille la plus représentée est *Ruminococcaceae* (Entre 46 et 66%), suivie de *Lachnospiraceae* (Entre 8 et 14 %), *Oscillospiraceae* (Entre 4.5 et 7 %), *Rikenellaceae* (Entre 0.1 et 3.3%).

L'analyse de différents critères d'alpha diversité (Richness, Chao1, Shannon et Simpson) décrivant les microbiotes des quatre lignées (Figure 4) montre l'existence de différences de structure du microbiote entre lignées. Ainsi, il n'y a aucune différence significative entre les lignées pour les critères Richness ou Chao1, ce qui signifie que les microbiotes de ces lignées possèdent un nombre équivalent d'espèces bactériennes. En revanche, les indices de Shannon et de Simpson montrent des différences importantes entre lignées. Ils sont plus élevés dans la lignée RIR comparativement à ND3 et LEG, et moins élevés dans la lignée ND3 comparativement aux lignées RIR et TEM. Cela signifie que la lignée ND3 possède un microbiote avec une abondance par ASV la plus homogène alors que la lignée RIR possède la plus déséquilibrée.

Nous avons également comparé les lignées et les groupes pour 4 indices décrivant la bêta-diversité des microbiotes : Bray-Curtis, Jaccard, Unifrac et Weighted Unifrac (Figure 5). Nous observons pour les 4 indices un effet lignée, un effet groupe ainsi qu'une interaction lignée x groupe significatifs. Ceci confirme l'impact important de la lignée, donc du fonds génétique, sur la composition du microbiote caecal. Par ailleurs nous montrons ainsi que notre modèle de perturbation du microbiote par le traitement antibiotique (effet groupe) est efficace pour toutes les lignées étudiées et pourra être employé pour d'autres études.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude nous a permis de valider notre modèle de perturbation du microbiote par un traitement antibiotique. Ce dernier a en effet induit une perturbation du microbiote relativement durable sans générer de problème sanitaire. La première application de ce modèle nous a permis de mettre en évidence un lien possible, mais qui reste à confirmer, entre la composition du microbiote caecal et la réponse vaccinale chez au moins une lignée de poule pondeuse (LEG), puisque la perturbation de la composition du microbiote causée par l'ingestion d'antibiotiques est associée avec un changement du niveau de réponse vaccinale. Nous observons enfin que l'ampleur et la dynamique d'évolution de la réponse vaccinale semblent différer selon la lignée génétique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borey, M., Blanc, F., Lemonnier, G., Leplat, J.-J., Jarret, D., Rossignol, M.-N., ...Rogel-Gaillard, C. (2021). Links between fecal microbiota and the response to vaccination against influenza A virus in pigs. *npj Vaccines*, 6.
- Broom, L. J., & Kogut, M. H. (2018). The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 204, 44–51.
- Ciabattini, A., Olivieri, R., Lazzeri, E., & Medaglini, D. (2019). Role of the Microbiota in the Modulation of Vaccine Immune Responses. *Front. Microbiol.*,
- Pinard – van der Laan, M.-H. (2002). Immune modulation: the genetic approach. *Vet. Immunol. Immunopathol.*
- Valdez, Y., Brown, E. M., & Finlay, B. B. (2014). Influence of the microbiota on vaccine effectiveness. *Trends Immunol.*, 25113637.
- Zimmermann, P., & Curtis, N. (2018). The influence of the intestinal microbiome on vaccine responses. *Vaccine*, 36(30), 4433-4439.

Figure 1. Schéma de répartition des groupes

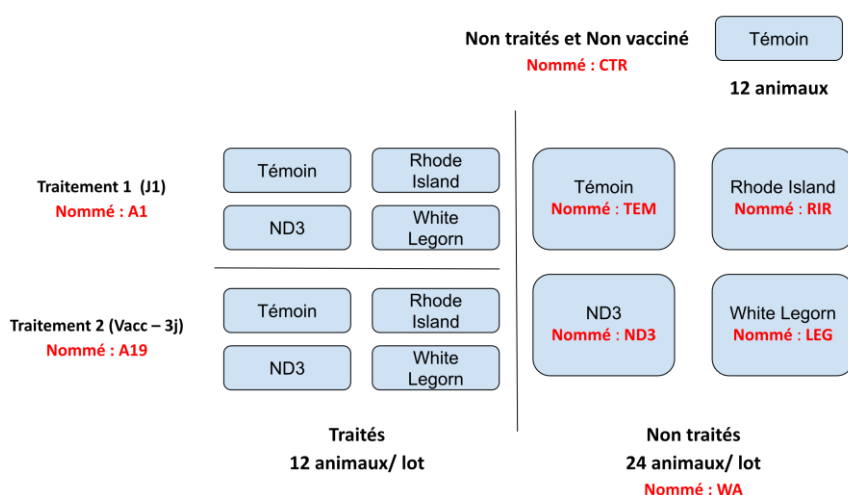


Figure 2. Comparaison des prises de poids (rapport D42 ÷ D22) des différents groupes pour chaque lignée (ns = $p > 0.05$; * = $p < 0.05$)

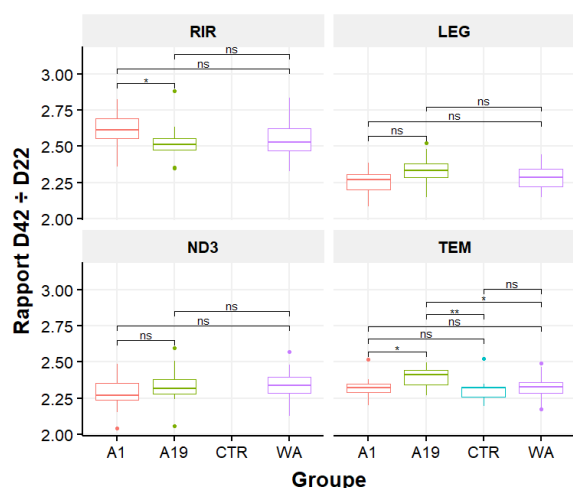


Figure 3. Comparaison des niveaux de réponse vaccinale des différents groupes pour chaque lignée. (ns = $p > 0.05$; * = $p < 0.05$)

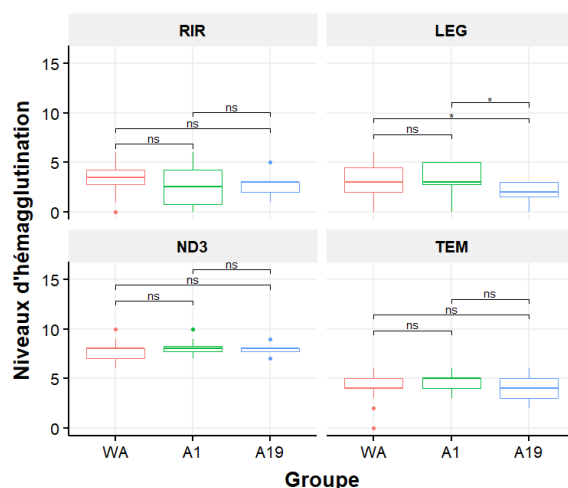


Figure 4. Diversité alpha des 4 lignées (tous groupes confondus) (ns = $p > 0.05$; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

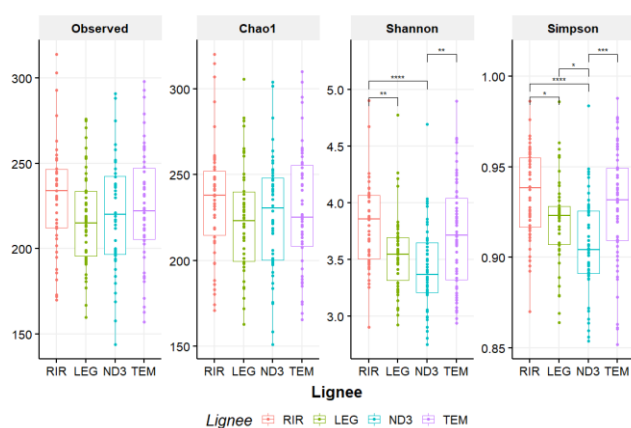


Figure 5. Diversité beta

