

IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL ET DE SES METABOLITES SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA MATURATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE INNE

Saint-Martin Vincent, Guillory Vanaique, Trapp Sascha, Quéré Pascale, Guabiraba Rodrigo

INRA, UMR ISP, Université de Tours, Nouzilly, France
vincent.saint-martin@inrae.fr

RÉSUMÉ

Le microbiote intestinal (MI) est essentiel au maintien de l'homéostasie intestinale, à la maturation du système immunitaire et à la résistance aux agents pathogènes. Le MI favorise et détermine de nombreux aspects du développement du système immunitaire inné via la production de métabolites, comme les acides gras à chaîne courte (AGCC). De nouvelles données expérimentales chez la souris soulignent l'existence d'un dialogue entre le MI et les poumons, appelé « axe intestin-poumon », qui s'avère crucial dans l'immunité des muqueuses. Plusieurs composants et métabolites dérivés du MI, tels que les AGCC, se sont révélés des médiateurs essentiels qui régulent le fonctionnement du système immunitaire inné périphérique. Néanmoins, l'axe intestin-poumon est un concept qui reste inexploré chez le poulet, chez qui les agents pathogènes responsables des maladies aviaires les plus importantes sur le plan économique ciblent les tractus respiratoire et digestif. Afin de démontrer cette hypothèse nous avons exploré les effets d'un AGCC (butyrate) sur un modèle cellulaire original de cellule épithéliale de poumon de poulet. Nos résultats mettent en évidence une forte augmentation de l'expression d'OASL, un gène clé de l'immunité antivirale, par le butyrate à une concentration physiologique. Ce même métabolite potentialise la réponse immunitaire médiée par les interférons de type I (IFN-I) et par un agoniste TLR3. En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'impact plus global de l'absence de microbiote sur le système immunitaire de l'animal. Pour cela, nous avons prélevé différents organes le long de l'axe intestin-poumon sur des poulets conventionnels (microbiote « normal ») et axéniques (sans microbiote). Nos premières données indiquent qu'il n'existe pas de différence entre le nombre et le phénotype des leucocytes de rates d'animaux conventionnels ou axéniques. Ces travaux ouvriront la porte à des nouvelles pratiques d'élevage et au développement de probiotiques dont le rôle serait de favoriser un développement précoce et favorable du microbiote et du système immunitaire.

ABSTRACT

Understanding the contribution of the gut microbiota and its metabolites to the development and functioning of the innate peripheral immune system

The gut microbiota (GM) plays a critical role in the maintenance of intestinal homeostasis, immune system maturation and resistance to pathogens. The GM favors and calibrate many aspects of the innate immune system's maturation and functioning through the production of metabolites such as Short Chain Fatty Acids (SCFA). In mice, recent data highlight the existence of a dialog between the GM and the respiratory tract, referred to as the « gut-lung axis », which proves to be crucial to mucosal immunity. Various components and metabolites derived from the GM, such as SCFA, are essential mediators that regulate peripheral innate immune system functions. However, the gut-lung axis remains an unexplored concept in the chicken, where the most important avian diseases are caused by pathogens targeting both respiratory and digestive tracts. In order to test this hypothesis, we explored the effect of butyrate using an original model of chicken lung epithelial cell line. We have highlighted that this metabolite, in physiological concentrations, highly increases the expression of OASL, a gene strongly involved in antiviral immunity. This metabolite also potentiates the immune responses associated with type I interferons (IFN-I) and TLR3 agonist stimulation. In parallel, we explored the global impact of the absence of microbiota on the immune system of the animal. In order to do that, we collected various samples along the gut lung axis on conventional (« normal » microbiota) and germ-free (microbiota-free) chickens. Our data show that there is no difference in leucocytes number or phenotypes in the spleen of conventional compared to germ-free chickens Altogether, these results will open the door to new husbandry practices and will help developing probiotics to which the main role will be to favor an early development of the microbiota and the immune system.

INTRODUCTION

D'ici à 2050, la population mondiale devrait atteindre 9 milliards d'habitants et ainsi conduire à une multiplication par deux de la demande en protéines animales. Approvisionner la population tout en respectant l'équilibre entre le bien-être animal, la qualité des produits et la sécurité pour les consommateurs est une priorité pour les Nations Unies (Martin, 2021). Les méthodes modernes d'élevage avicole favorisent la sélection de traits génétiques liés à une meilleure performance du produit (croissance plus rapide, meilleur rendement de ponte). Cependant, cette sélection peut se faire au détriment d'autres caractéristiques essentielles pour l'animal, comme l'installation correcte de son microbiote intestinal. Le microbiote intestinal (MI) est un carrefour qui intègre des signaux provenant de l'environnement, de la génétique ou du système immunitaire et qui modèle le métabolisme et la compétence immunitaire de son hôte (Broom and Kogut, 2018). La rupture de l'équilibre entre l'hôte et son microbiote conduit *in fine* à l'apparition de maladies (inflammatoires, auto immunes ou infectieuses). L'ensemble de ces fonctions se fait via la production de métabolites par les bactéries commensales du tractus intestinal. Il a été démontré par exemple que le taux de myélopoïèse est corrélé à la quantité de métabolites, notamment des Acides Gras à Courtes Chaines (AGCC), retrouvé dans ce tissu (Thaiss et al., 2016). Ces mêmes molécules vont également avoir un impact sur les cellules résidentes dans l'intestin et d'autres organes périphériques, tels que les macrophages (Chang et al., 2014). De façon plus générale concernant le système immunitaire, il a récemment été démontré l'existence d'un dialogue à deux sens entre l'intestin et ses métabolites et les différents organes périphériques. C'est ainsi qu'est né le concept « d'axe intestin-poumon » qui explique que les AGCC produits au niveau intestinal ont un impact direct sur les cellules immunitaires présentes dans les poumons et qu'un défaut d'équilibre du microbiote intestinal entraînera fatalement une plus grande susceptibilité pour les maladies respiratoires (Dang and Marsland, 2019). Toutes ces observations ont été réalisées chez les mammifères mais aucune étude ne concerne les animaux d'élevage, tel que le poulet. Dans ce contexte global, notre objectif principal est donc d'apporter de nouvelles informations quant à l'existence d'un axe intestin-poumon fonctionnel chez le poulet.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Culture des cellules épithéliales pulmonaires

Les cellules épithéliales pulmonaires aviaires immortalisées (cLEC 213) sont cultivées en DMEM-

F12 contenant 2 mM de L-glutamine, 15 mM d'HEPES, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 100 U/ml de streptomycine et 100 µg/ml pénicilline (Esnault et al., 2011).

1.2. Tests des effets du butyrate *in vitro*

Afin de mettre en évidence de potentiels effets du butyrate sur l'épithélium respiratoire, 4.10^5 cellules sont ensemencées en plaque 12 puits pendant 24h à 41°C. Le lendemain, le milieu est retiré et remplacé par une solution de butyrate (3mM) préalablement préparée. Les cellules sont ainsi pré-incubées sur toute la nuit (16h) puis stimulées par un agoniste de TLR3 (Poly I:C) ou un IFN de type I (IFN α) pendant 6h.

1.3. PCR quantitative

Après lyse des cellules et extraction des ARNs totaux à l'aide du RNA Plus Extraction kit (suivant les recommandations du fournisseur), la quantité d'acides nucléiques de chaque échantillon est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop). Ensuite, une étape de transcription inverse réalisée sur 500ng d'ARN permet d'obtenir des ADNc correspondants. La PCR quantitative permet l'amplification ciblée de différents gènes grâce à l'utilisation des paires d'amorces suivantes :

OASL : CTTCGGAGTCAGCATCACCA/
TCCTGAATCACCTGCCCCAG
HPRT1 : TGGTGGGGATGACCTCTCAA/
GGCCGATATCCCACACTTCG
MX1 : ACGTCCCAGACCTGACACTA/
TTTAGTGAGGACCCCAAGCG
CXCL12 : CTGCGGTGCCAGTGCATTAG/
AGCACACCTCTCTTCCATCC
IFNB : TCCTGCAACCATCTTCGTCA/
CACGTCTTGTGTGGGCAAG

Afin de révéler la présence d'ADNc amplifié, le mix de PCR contient du SYBR green qui fluoresce lorsqu'il s'intercale non spécifiquement entre 2 bases. Chaque échantillon est déposé en duplicata sur la plaque 96 puits. Les résultats sont obtenus sous forme de Ct puis l'expression relative de chaque gène est calculée par rapport à notre gène de ménage (HPRT) grâce à la méthode des $-\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001).

1.5. Impact du microbiote chez une lignée de poule pondeuse (White Leghorn)

Pour pouvoir répondre à cette problématique, nous avons eu recours à la lignée consanguine de poule pondeuse Leghorn blanche élevée en condition conventionnelles (holoxénique) ou exempte de tout microbiote (axénique) à la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (INRAE PFIE, Nouzilly). A trois âges différents (7, 14 et 21 jours), 7 animaux conventionnels et 7 animaux axéniques sont sacrifiés et leurs organes sont récupérés puis congelés en azote

liquide. Les rates, poumons, foies, iléums, caeca et 80°C. L'impact du microbiote sur le système immunitaire périphérique est en premier lieu observé par l'immunophénotypage des différentes populations de splénocytes retrouvées dans nos 2 conditions. Afin d'isoler les splénocytes, les rates sont tout d'abord broyées dans un tamis cellulaire de 40 µm puis déposés délicatement sur un coussin d'Histopaque. Après centrifugation douce, les cellules d'intérêt sont concentrées sous forme d'un disque trouble que l'on peut récupérer à l'aide d'une pipette. La dernière étape consiste à laver les cellules dans un grand volume de PBS stérile puis de centrifuger rapidement. Le culot obtenu est ensuite repris en milieu de culture cellulaire RPMI. La quantité et la viabilité des splénocytes est mesurée grâce à un lecteur de plaque automatique (Tecan Spark), après coloration au bleu trypan. Ces cellules sont ensuite marquées grâce à différents cocktails d'anticorps. Les cibles choisies permettent de mettre en évidence les différentes populations de lymphocytes par la détection de leur marqueur de surface (CD4 ou CD8α). Les cellules marquées sont ensuite passées au cytomètre en flux (BD Calibur) puis les résultats sont analysés grâce au logiciel FlowJo.

1.6. RNAseq

Les profils transcriptomiques des caeca de poulet à 21 jours d'âge ont été obtenus par méthode RNAseq. Les ARN totaux ont été extraits grâce au même protocole qu'au paragraphe 1.2. La qualité des échantillons a ensuite été estimée en utilisant le kit RNA Nano 6000 Assay (Agilent Technologies, CA, USA) sur le système Bioanalyser 2100. La librairie a été préparée à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit pour Illumina®. Les données brutes ont été analysées via le logiciel TrimGalore puis les gènes différentiellement exprimés calculés via le logiciel DESeq (v1.30.0) (Love et al., 2014).

1.7. Analyses statistiques

Un test One-way ANOVA paramétrique, suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé afin de réaliser une étude statistique (logiciel GraphPad Prism 7.0). Une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les différences entre les groupes sont représentées par des astérisques : *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ et ****: $p \leq 0,0001$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La première partie de l'étude concerne donc l'étude *in vitro* des effets immunostimulants des principaux AGCC du microbiote intestinal (acétate, butyrate et

sérums sont ainsi récupérés et conservés à -propionate). Afin de mettre en évidence ces effets, notre stratégie a été de les tester sur plusieurs lignées cellulaires aviaires originales. Nous avons donc commencé par étudier la réponse d'une lignée de macrophages aviaires immortalisés nommée HD11. Ces résultats ne sont pas présentés ici puisqu'aucun effet n'a pu être observé. En revanche, une incubation de notre lignée épithéliale pulmonaire avec du butyrate entraîne une augmentation dans l'expression de différents gènes liés à l'immunité innée. C'est notamment le cas pour *OASL*, qui code pour une protéine à fonctions antivirales, dont l'expression est 18 fois plus importante lorsque les cellules sont incubées 16h avec 3mM de butyrate. Cet effet est moins puissant à une dose de 0,3mM et disparaît lorsque la concentration diminue encore. Inversement, ce phénomène est accentué par une dose plus forte (10 mM) (figure 1A). A des degrés plus faibles, d'autres gènes voient également leur expression augmentée en présence de 3mM de butyrate, comme *CXCLi2*, qui code l'IL-8, une des principales chimiokines à activité pro-inflammatoire. En outre, le butyrate peut également potentialiser les effets de certains immunostimulateurs comme le Poly I:C (agoniste de TLR3, un récepteur reconnaissant des virus) ou l'IFNα (interféron de type I, possédant une forte activité antivirale) (figure 1B). Ceci est particulièrement visible pour des gènes comme *CXCLi2*, dont l'expression est multipliée par 12 entre une stimulation seule par le Poly I:C et une pré incubation avec le butyrate suivie par la même stimulation. C'est aussi le cas, dans une moindre mesure, pour *OASL*, pour lequel l'expression est multipliée par 3,5. La protéine OASL est un membre très bien caractérisé de la famille des Interferon Stimulated Genes (ISGs). Son mécanisme d'action repose sur sa capacité à se lier avec l'ARN viral double brin afin d'activer la RNaseL aboutissant ainsi à la dégradation du matériel génétique (Choi et al., 2015). Dans ce contexte, il s'agira maintenant de comprendre comment le butyrate entrainerait la surexpression d'*OASL*, grâce à une étude approfondie des différentes voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes via l'immunomarquage. En parallèle, nous aimerions également savoir si cette surexpression a un impact sur l'activité antivirale des cellules infectées par une souche d'Influenza aviaire à potentiel zoonotique H7N1. La seconde partie de ce travail cherche à mieux comprendre le rôle systémique du microbiote intestinal chez le poulet. Il repose sur la comparaison entre des organes collectés tout le long de l'axe intestin-poumon provenant d'animaux conventionnels ou de notre lignée axénique âgés de 7, 14 et 21 jours. Dans un premier temps nous nous sommes attachés à caractériser les populations composant les splénocytes, la rate étant l'un des principaux organes lymphoïdes secondaires. En termes de quantité et de

viabilité cellulaire, aucune différence n'est à noter entre les deux conditions, pour les 3 âges testés (figure 2A). Nos résultats d'immunophénotypage prouvent qu'il n'y a également pas de changement dans les proportions de cellules immunitaires qui composent l'arête. Nous pouvons par exemple citer les lymphocytes T, dont le marquage des récepteurs de surface (CD4 et CD8 α) révèle des quantités similaires (figure 2B). Il est néanmoins intéressant de noter que la quantité de cellules T CD8 est croissante entre J7 et J21. En parallèle de cette expérimentation, nous avons également cherché à obtenir les profils transcriptomiques des caeca de nos poulets conventionnels et axéniques par la méthode de RNAseq. Après que les données ont été nettoyées et analysées grâce aux outils bio-informatiques, nous avons pu mettre en évidence que plusieurs gènes étaient fortement sous exprimés chez les animaux sans microbiote. C'est notamment le cas du gène codant le récepteur soluble de l'IL22, *IL22RA2* ou de

celui codant la métalloprotéase matricielle 1, *MMP1* (figure 3). Il est intéressant de noter que ces deux protéines sont généralement impliquées dans des mécanismes de maintien de la barrière épithéliale et de cicatrisation (Yu et al., 2016). Dans une moindre mesure, on retrouve d'autres gènes sous exprimés et liés à l'immunité antivirale comme *OASL* ou *SOCS3*. Afin de poursuivre cette étude du rôle du microbiote intestinal sur l'immunité systémique, nous devons maintenant procéder aux mêmes travaux mais en s'intéressant cette fois-ci aux prélèvements de poumons et de rate. De cette façon, nous aurons une idée plus précise du fonctionnement de l'axe intestin-poumon chez le poulet, qui n'est, à l'heure actuelle, pas encore été décrit. A terme, l'objectif serait de permettre la mise au point de différents compléments alimentaires, tels que des postbiotiques (ex : butyrate) ou des probiotiques. Plus généralement, ces travaux vont aider à mieux définir ce qu'est un microbiote « bénéfique » chez le poulet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Broom, L.J., Kogut, M.H., 2018. T. Vet. Immunol. Immunopathol. 204, 44–51.
 Choi, U.Y., Kang, J.-S., Hwang, Y.S., Kim, Y.-J., 2015. Exp. Mol. Med. 47, e144–e144.
 Dang, A.T., Marsland, B.J., 2019. Mucosal Immunol. 12, 843–850.
 Esnault, E., Bonsergent, C., Larcher, T., Bed'hom, B., Vautherot, J.-F., Delaleu, B., Guigand, L., Soubieux, D., Marc, D., Quéré, P., 2011. Virus Res. 159, 32–42.
 Livak K.J., Schmittgen, D., 2001. Methods. 402–408
 Love, M., Huber, W., Anders, S., 2014. Genome Biol. 550
 Martin, n.d. Goal 2: Zero Hunger. U. N. Sustain. Dev.
 Yu, R., Ding, Y., Zhu, L., Qu, Y., Zhang, C., Liu, L., Chen, L., 2016. s. Arch. Oral Biol. 72, 14–20

Figure 1 : Taux d'expression de différents gènes liés à l'immunité innée suite à une incubation avec du butyrate pendant 16h, mesuré par PCR quantitative. En A) l'effet du butyrate à plusieurs concentrations sur l'expression de *OASL* et l'effet du butyrate à 3mM sur différents gènes cibles ayant un rôle anti viral ou pro inflammatoire. N=3. En B) l'effet du butyrate à 3mM lorsque les cellules sont ensuite stimulées par du Poly I:C (10 μ g/mL) ou de l'IFN α (50ng/mL) N=2

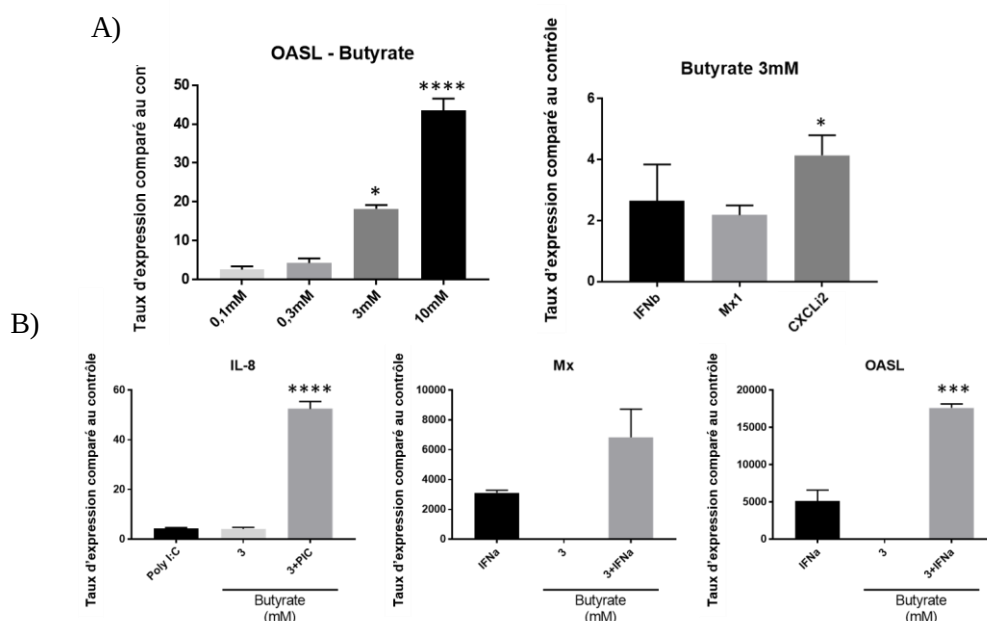


Figure 2 : Comparaison qualitative et quantitative des splénocytes entre les poulets conventionnels et axéniques à J7, J14 et J21. En A) le nombre et la viabilité des cellules obtenus grâce au lecteur de plaque Spark® Cyto. En B) la proportion de lymphocytes CD8α ou CD4 positifs obtenus après marquage par des anticorps spécifiques puis révélés par cytométrie en flux (BD Calibur)

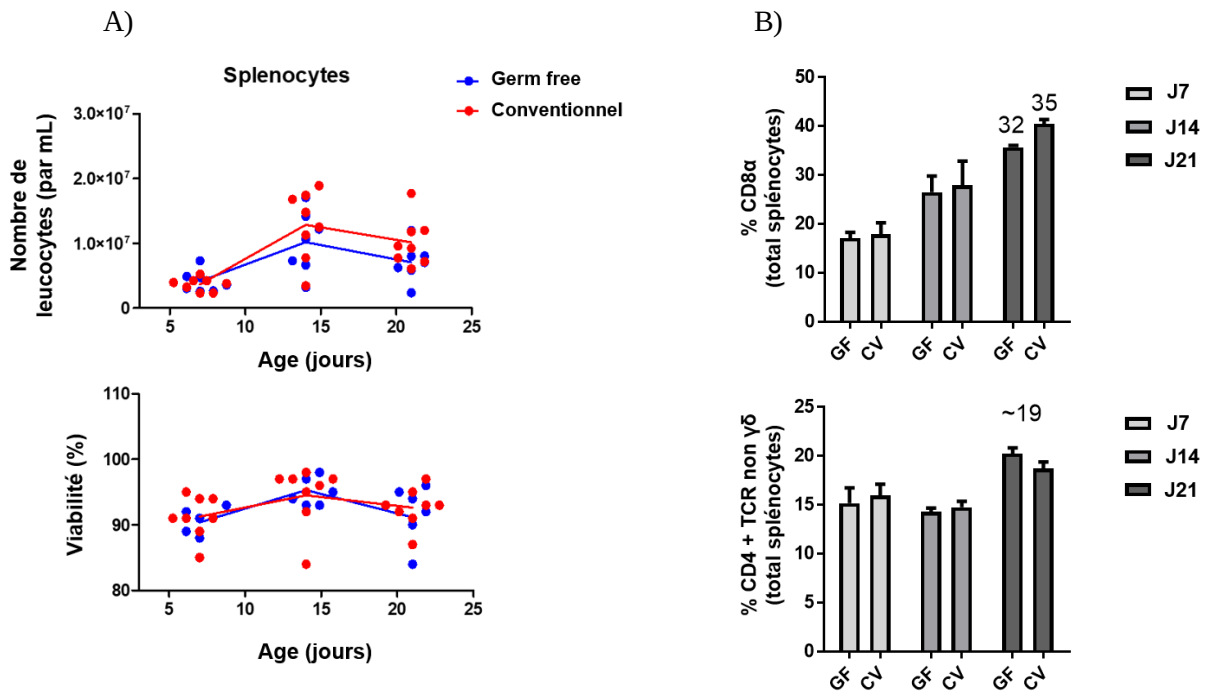


Figure 3 : Profil transcriptomique obtenu à partir d'ARN totaux extraits des caecae de poulets axéniques comparé aux poulets conventionnels. En rouge les gènes les plus sous exprimés et en vert ceux sur-exprimés

