

INHIBITION DU DEVELOPPEMENT D'*EIMERIA TENELLA* ET DE *TOXOPLASMA GONDII* DANS LES FIBROBLASTES ET LES MACROPHAGES DE POULETS ACTIVES PAR DES SURNAGEANTS CONTENANT DE L'IFN- γ

Quéré Pascale¹, Dimier- Poisson Isabelle², Naciri Muriel¹, Bout Daniel²

¹INRA, Station de Pathologie aviaire et de Parasitologie, 37380 Nouzilly.

² UFR des Sciences Pharmaceutiques, Equipe associée INRA, Laboratoire d' Immunologie Parasitaire.
31 avenue Monge, 37200 Tours

Résumé

Les *Eimeria* sont des parasites protozoaires, obligatoirement intracellulaires, qui infectent l'épithélium intestinal. Bien que les mécanismes de protection contre les coccidioses aviaires soient encore mal connus, il est désormais établi que l'immunité à médiation cellulaire joue un rôle prédominant dans la défense de l'hôte contre le parasite. En particulier, comme pour les protozooses des mammifères, l'IFN- γ pourrait être une des molécules effectrices spécifiques responsable de cette protection. L'IFN- γ recombinant aviaire n'étant pas disponible, des surnageants de culture de splénocytes activés par de la Concanavaline A ou d'une lignée lymphoïde transformée par le virus de la Réticuloendothéliose ont été utilisés comme source d'IFN- γ . Après traitement de macrophages de moelle osseuse et de fibroblastes embryonnaires de poulet avec ces surnageants, une inhibition du développement intracellulaire d' *E. tenella* ou de *T. gondii* est observée, et ceci de façon dose-dépendante. En conclusion, l'IFN- γ par son effet inducteur d'une activité microbiostatique sur certaines cellules, pourrait jouer un rôle essentiel dans la limitation de l'invasion parasitaire dans le cas de la coccidiose aviaire.

Introduction

Les coccidioses aviaires sont dues à des protozoaires du genre *Eimeria*, qui se développent dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. Elles sont responsables d'importantes pertes économiques en élevage industriel. Les méthodes de lutte reposant sur la chimioprévention systématique, n'apportent plus actuellement toute satisfaction, ce qui accroît l'intérêt de la mise au point de vaccins en particulier recombinants. La connaissance des mécanismes de défense immunitaires mis en place lors de l'infection par *Eimeria* s'avère donc être indispensable. Elle reste encore très fragmentaire. Toutefois, un certain nombre de travaux souligne le rôle prédominant de l'immunité à médiation cellulaire dans les mécanismes de protection (Rose, 1982; Lillehoj, 1987). Plus précisément au niveau du lieu de multiplication local intestinal, plusieurs études ont évoqué une participation des cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta^+$ ou CD8⁺ dans la première ligne de défense contre diverses *Eimeria* aviaires (Lillehoj, 1989; Trout et Lillehoj, 1995; Rothwell et al., 1995).

Presque rien n'est connu sur les cytokines impliquées dans la lutte contre la multiplication des *Eimeria* aviaires. Mais d'après la littérature sur d'autres protozoaires comme *Toxoplasma gondii* (Susuki et Orenalla, 1988; Dimier et Bout, 1993), l'IFN- γ pourrait jouer un rôle prédominant. Le gène de l'IFN- γ de poulet a été identifié (Digby et Lowenthal, 1995). La protéine recombinante n'est toutefois pas

disponible. Les surnageants de splénocytes stimulés par la Concanavaline A ou de lymphocytes transformés par le virus de la réticuloendothéliose contiennent une activité de type IFN- γ (Kaspers et al., 1994; Lowenthal et al. 1994). L'objectif de notre étude a été de déterminer l'effet *in vitro* de l'activation par ces surnageants de macrophages ou de fibroblastes de poulet, sur la multiplication de protozoaires, *E. tenella* et *T. gondii*.

1. Matériel et méthodes

1.1. Parasites

La souche d' *E. tenella* utilisée est la souche sauvage PAPt36, isolée au laboratoire des Maladies à Protozoaires et celle de *T. gondii* est la souche sauvage virulente RH (Sabin, 1941).

1.2. Surnageants de culture contenant de l'IFN- γ

Les splénocytes de poulets PA12 (Leghorn blanche) (10⁷ cellules par ml) sont stimulés par la Concanavaline A (10 μ g par ml) pendant 48h (Sn Con A). Les cellules de la lignée lymphoblastoïde transformée par le virus de la Réticuloendothéliose (10⁵ par ml) sont cultivées pendant 72h (Sn REV). Le milieu de culture est du RPMI (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau décomplémenté.

1.3. Cultures cellulaires

Les macrophages sont obtenus à partir de la moelle osseuse de poulets PA12 âgés de 12 jours par adhérence sur plastique. Les fibroblastes embryonnaires sont préparés à partir d'oeufs embryonnés de 10 jours.

1.4. Test de multiplication parasitaire et d'inhibition

La prolifération parasitaire est évaluée par l'incorporation d'Uracile tritié. Les macrophages ou les fibroblastes sont mis à incuber pendant 24 à 48h dans des plaques de culture 96 puits ($2.5 \cdot 10^4$ cellules par puits). Puis un prétraitement par les surnageants Con A ou REV à diverses dilutions, est effectué pendant 24h. Les sporozoïtes d'*E. tenella* ou les tachyzoïtes de *T. gondii* sont ensuite ajoutés ($5 \cdot 10^4$ par puits) et deux heures plus tard, $0.5 \mu\text{Ci}$ d'Uracile tritié (Amersham, activité spécifique 50 Ci par nmole). Les cultures sont prélevées sur filtre de fibre de verre 48h après, et la radioactivité incorporée est déterminée par un compteur à scintillation liquide (LKB).

1.5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne (SEM) des coups par minutes de 3 mesures. L'analyse statistique des différences entre moyennes se fait par le test t de Student.

2. Résultats et discussion

La présence d'une activité de type IFN-g dans les surnageants Con A et REV a été vérifiée par 4 tests, qui, pris isolément, ne sont pas spécifiques, mais dont la combinaison permet d'identifier celle-ci. Le test d'inhibition de la multiplication du virus de la Stomatite vésiculeuse permet une identification d'une activité de type IFN, sans pouvoir distinguer l'IFN-g de l'IFN-a/b. Nos surnageants ont un effet inhibiteur jusqu'à la dilution 1/32. Le test d'induction de la production d'oxyde nitrique par les macrophages signe avec une forte présomption la présence d'IFN-g. L'IFN-a/b n'étant pas actif. Le surnageant Con A est positif jusqu'à la dilution 1/32 et le surnageant REV jusqu'à la dilution 1/128. Les deux surnageants induisent l'augmentation des antigènes de classe II à la surface des macrophages, ce qui peut être le fait d'autres lymphokines comme l'IL2, et l'apparition de ces mêmes antigènes à la surface des fibroblastes, action assez spécifique de l'IFN-g. Enfin le test d'induction d'une activité cytotasique active sur les cellules de lignée transformées par le virus de la maladie de Marek et médiée par les macrophages, n'est pas exclusif de l'IFN-g. Les deux surnageants induisent une inhibition jusqu'à la dilution 1/16. Donc la positivité de ces 4 tests est fortement en faveur de

la présence d'IFN- γ dans les surnageants Con A et REV, mais n'exclut pas la présence d'autres cytokines comme l'IFN-a/b et l'IL2.

Les résultats de multiplication d'*E. tenella* sur macrophages et fibroblastes embryonnaires (Fig.1) montrent une forte incorporation d'Uracile tritié après 48h de culture, ce qui signe une multiplication rapide et marquée du parasite. La préincubation des macrophages et fibroblastes avec les surnageants Con A et REV réduit considérablement cette incorporation. La dilution minimale effective est de 1/512 pour le surnageant REV et de 1/256 pour le surnageant Con A. Les surnageants purs n'ont pas d'effet toxique visible sur les cultures. Les résultats de multiplication de *T. gondii* (Fig.2) s'avèrent être similaires pour le surnageant Con A. Par contre un effet biphasique est observé pour le surnageant REV, dont l'action inhibitrice est visible des dilutions 1/4 à 1/32 pour les fibroblastes, et des dilutions 1/8 à 1/32 pour les macrophages. Il est improbable que l'effet inhibiteur soit dû à un effet direct de l'IFN-g, puisque les cellules sont lavées avant l'addition du parasite.

En conclusion, nos expériences montrent que des macrophages et des fibroblastes de poulet, stimulés par des surnageants contenant une activité IFN-g, possèdent une capacité microbiostatique, puisqu'ils inhibent la multiplication d'*E. tenella*, spécifique du poulet, mais aussi de *T. gondii*. Donc, ceci suggère que, dans la coccidiose aviaire (Kogut et Lange, 1989) comme dans d'autres protozooses de mammifères (Susuki et Orenalla, 1988; Dimier et Bout, 1993), l'IFN-g pourrait être un médiateur majeur de la résistance au niveau local intestinal. D'autres études sont nécessaires pour déterminer la signification *in vivo* de ce phénomène.

Références

- Digby M.R., Lowenthal J.W., 1995. J. Interferon Cytokine Res., 15, 939-945
Dimier I., Bout D., 1993. Eur. J. Immunol., 23, 981
Kaspers B., Lillehoj H.S., Jenkins M.C., Pharr G.T., 1994. Vet. Immunol. Immunopathol., 44, 71-94
Kogut M.H., Lange, 1989. J. Parasitol., 75, 317-320
Lillehoj H.S., 1987. Infect. Immun., 55, 1616-1621
Lillehoj H.S., 1989. Infect. Immun., 57, 1879-1884
Lowenthal J.W., York J.J., Digby M.R., 1994. in: Advances in avian immunological research. (Davidson T.F., Bumstead N., Kaiser P.) Carfax, pp 179-186
Rose M.E., 1982. in: The biology of the coccidia (Long P.L. edit.) University Park Press, Baltimore, pp 330-371
Rothwell L., Graminski R.A., Rose M.E., Kaiser P., 1995. Parasite Immunol., 17, 525-533
Susuki Y., Orenalla M., 1988. Science, 240, 516-517
Trout J.M., Lillehoj H.S., 1995. J. Parasitol., 79, 790-792

FIGURE 1 : Inhibition de l'incorporation d'uracile tritié par *Eimeria tenella* dans les cultures de macrophages de moelle osseuse ■ ou de fibroblastes embryonnaires ▨ activés par les surnageants REV ou ConA à différentes dilutions. Les résultats sont exprimés par la moyenne (SEM) de 3 mesures. Ils sont représentatifs d'au-moins trois expériences indépendantes.

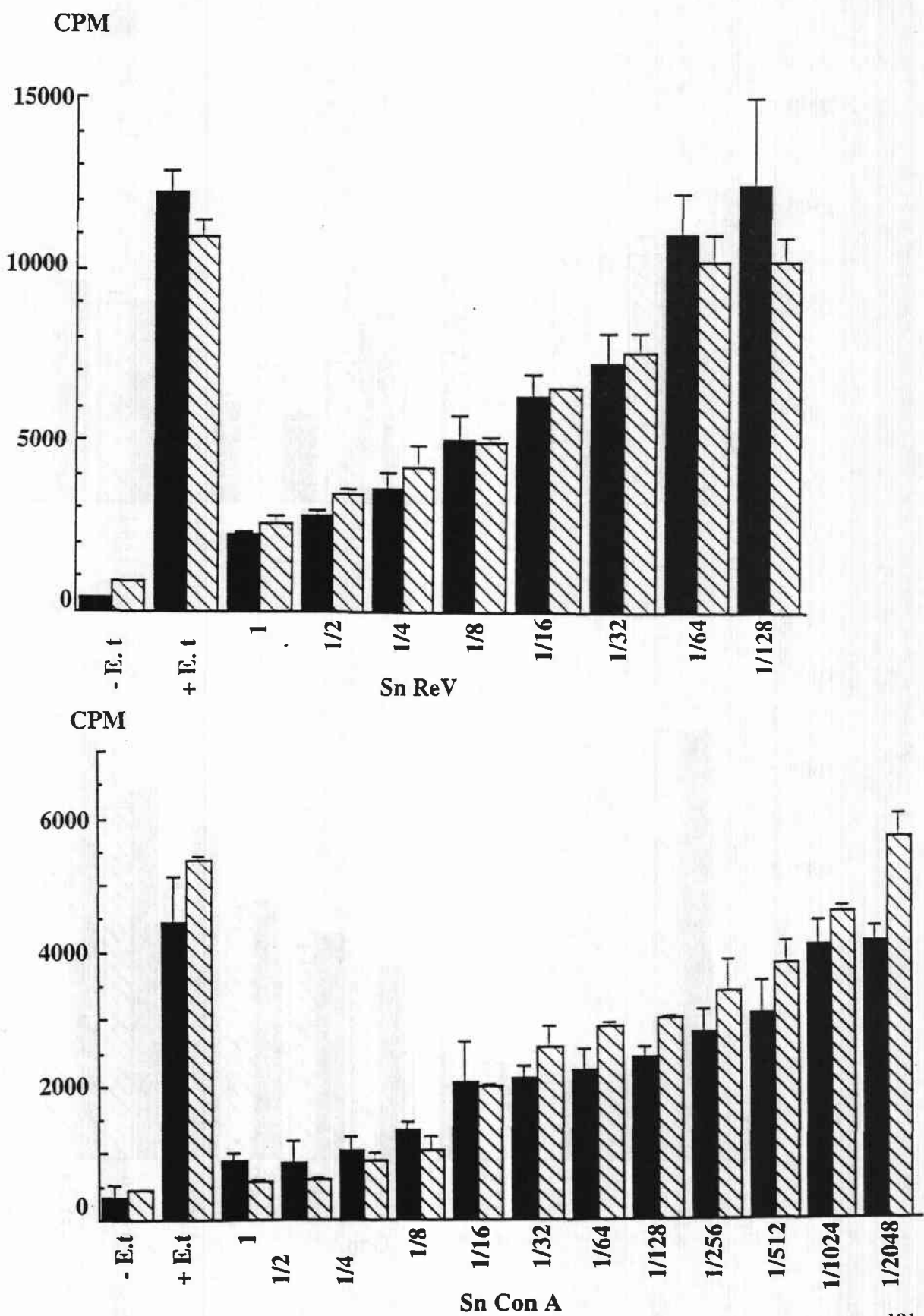


FIGURE 2 : Inhibition de l'incorporation d'uracile tritié par *Toxoplasma gondii* dans les cultures de macrophages de moelle osseuse ■ ou de fibroblastes embryonnaires ▨ activés par les surnageants REV ou ConA à différentes dilutions. Les résultats sont exprimés par la moyenne (SEM) de 3 mesures. Ils sont représentatifs d'au-moins trois expériences indépendantes.

