

LE MICROBIOTE REGULE LA REPLICATION VIRALE ET LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE CHEZ DES CANARDS INFECTES PAR UN VIRUS INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENE H5N9

Bessière Pierre¹, Figueroa Thomas¹, Coggon Amelia¹, Souvestre Marie¹, Robertet Luc¹, Delverdier Maxence¹ et Romain Volmer¹

(1) INRA-ENVIT, UMR IHAP, 31076 Toulouse, France

p.bessiere@envt.fr

RÉSUMÉ

Alors que les poulets sont des hôtes réputés très sensibles pour les virus influenza aviaires, les canards développent rarement des signes cliniques suite à l'infection, même s'il s'agit d'un virus Influenza aviaire hautement pathogène. Le but de notre étude a été d'évaluer le rôle du microbiote intestinal (l'ensemble des micro-organismes présents dans l'intestin) dans le contrôle de la réplication des virus Influenza aviaires et de la réponse immunitaire innée chez le canard.

Nous avons analysé la réplication virale et la réponse immunitaire suite à une infection par un virus Influenza aviaire hautement pathogène H5N9 en comparant deux groupes de canards : un dont le microbiote intestinal a été significativement déplété par un traitement antibiotique à large spectre et un qui n'a pas reçu de traitement.

Des cultures bactériennes de fientes et une PCR quantitative ciblant le gène bactérien de l'ARN 16S ont montré une sévère déplétion du microbiote intestinal suite au traitement antibiotique. L'analyse de la réplication virale a montré que les animaux traités aux antibiotiques avaient une excrétion virale cloacale significativement plus élevée à 3 et 5 jours post-infection. A l'inverse, aucune différence n'a été décelée pour l'excrétion trachéale.

Les animaux infectés présentaient, par rapport aux animaux non infectés, une réponse interféron de type 1 dans le poumon. Cette réponse, modérée, était significativement plus élevée chez les animaux traités aux antibiotiques. Dans l'intestin, les animaux traités aux antibiotiques présentaient une diminution significative de l'expression des gènes stimulés par les interférons, possiblement à l'origine d'une augmentation de la réplication virale au niveau intestinal chez ces animaux.

Nos résultats montrent que le microbiote intestinal peut moduler la réponse antivirale innée chez le canard et la réplication virale. Des analyses en cours cherchent à déterminer si la déplétion du microbiote intestinal pourrait rendre les canards plus sensibles à l'infection par d'autres virus influenza aviaires hautement pathogènes.

ABSTRACT

While chickens are highly sensitive to the infection with avian Influenza A viruses, ducks seldom show clinical signs, even when infected with a highly pathogenic avian Influenza virus (HPAIV). The aim of this study was to determine if the gut microbiota (the community of microorganisms that live in the intestine) could contribute to the control of highly pathogenic avian Influenza virus replication and to the innate immune response in ducks.

Viral replication and innate immune response following infection with an H5N9 HPAIV were analysed in two groups of ducks: one with a depleted gut microbiota due to an antibiotic treatment, and a control group. Stool cultures and real-time PCR from stool targeting the 16s ribosomal RNA gene showed a significant reduction of the bacteria populations in the antibiotics-treated animals. In antibiotics-treated animals, cloacal virus shedding was higher at days 3 and 5 post infection, but there was no difference in the tracheal shedding.

Regarding the innate immune response, the infection led to a type I interferon response in the lung, which was higher in antibiotics-treated animals. The gut immune response was lower in the antibiotics-treated animals, which could explain the higher virus shedding.

Our results show that the gut microbiota can regulate virus replication and the innate immune response in ducks. Ongoing analyses will determine if the depletion of the microbiota could render ducks more sensitive to other HPAIV infection.

INTRODUCTION

La France a été frappée pendant deux années successives par des épidémies à virus influenza aviaire hautement pathogène (VIAHP), entraînant des pertes économiques majeures dans la filière avicole et causant un risque potentiel pour la santé humaine (Briand et al., 2017). Les oiseaux aquatiques sont considérés comme étant le réservoir des virus influenza aviaires faiblement pathogènes (VIAFP), à partir desquels les VIAHP peuvent émerger. Les canards portent, de manière généralement asymptomatique, les VIAFP dans leur tube digestif, l'infection n'entraînant qu'une faible réponse immunitaire, voire pas de réponse du tout. En revanche, les poulets sont extrêmement sensibles à la maladie : l'infection par un VIAFP entraîne une réponse immunitaire tardive et intense, et une mortalité pouvant être importante (Alexander et al., 1986; Burggraaf et al., 2014).

Plusieurs études ont démontré l'implication du microbiote dans le fonctionnement du système immunitaire et la régulation des infections virales, notamment pour les virus influenza. Le microbiote aurait un rôle protecteur reposant sur plusieurs aspects : par exemple, un effet de barrière physique (Yang et al., 2014), ou encore, un rôle de stimulateur à bas bruit du système immunitaire, permettant à ce dernier de réagir de manière précoce en cas d'infection (Abt et al., 2012; Iwasaki and Pillai, 2014).

Nous avons donc investigué le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la régulation d'une infection par un virus influenza aviaire hautement pathogène chez le canard.

MATERIEL ET METHODES

Elevage des animaux et déplétion du microbiote

Des canards Pékin ont été élevés jusqu'à l'âge de deux semaines en animalerie confinée de niveau 2, puis placés en isolateur dans une animalerie confinée de niveau 3. Ils ont été répartis en quatre groupes : non infectés et non traités aux antibiotiques (NI/NT, 6 animaux) ; non infectés et traités aux antibiotiques (NI/ABX, 6 animaux) ; infectés et non traités aux antibiotiques (I/NT, 12 animaux) ; infectés et traités aux antibiotiques (I/ABX, 12 animaux).

Le traitement antibiotique et antifongique suivant a alors été entrepris pendant deux semaines, puis poursuivi pendant la période d'infection, via l'eau de boisson : vancomycine (225 mg/L), néomycine (860 mg/L), métronidazole (560 mg/L), amphotéricine-B (6 mg/L), ampicilline (10 g/L) et colistine (2 g/L).

Infection des animaux et prélèvements

Après vérification du statut sérologique négatif des animaux vis-à-vis des virus influenza, grâce à un test ELISA, les canards des groupes I/NT et I/ABX ont été infectés par voies oculaire et naso-trachéale avec $3,6 \cdot 10^6$ EID₅₀ de virus hautement pathogène A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9), un VIAHP de lignée européenne.

Des écouvillons cloacaux et trachéaux ont été réalisés aux jours 1, 3, 5 et 7 post infection. Des autopsies ont également été réalisées aux jours 3 et 7 pour les animaux infectés, et jour 4 pour les animaux non infectés, avec prélèvement d'intestin (intestin grêle caecum et côlon), de poumon, de trachée, de rate et de cerveau, dans du formol 10% ou dans du TRIzol reagent (Invitrogen). Des fientes ont été prélevées avant d'entreprendre le traitement antibiotique et la veille de l'infection.

Cultures de fientes en milieu liquide

Pour chaque animal, 0,5 g de fientes ont été prélevées, diluées dans 100 µL de PBS stérile, puis centrifugées 5 min à 500 g. Les surnageants ont ensuite été dilués en série au 1/10^{ème} dans du milieu de culture riche (bouillon cœur-cerveau) et ensemencés en plaque 96 puits. La dilution la plus forte ayant permis une pousse bactérienne était notée au bout de 24h d'incubation à 37 °C et le nombre de bactéries aérobies cultivables par gramme était alors estimé (Simon et al., 2016).

Extractions d'ARN, d'ADN et PCR quantitative en temps réel

L'extraction d'ADN à partir des fientes a été réalisée avec le kit PureLink Microbiome DNA purification (ThermoFischer) en suivant les indications du fabricant. L'extraction de l'ARN viral à partir des écouvillons cloacaux et trachéaux a été réalisée avec le kit QIAamp Viral RNA (Qiagen) selon le protocole du fabricant. L'extraction d'ARN à partir des échantillons d'organes dans du TRIzol reagent (Invitrogen) a été réalisée avec le kit NuclioSpin RNA (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant.

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN extraits des organes a été réalisée par rétrotranscription de 500 ng d'ARN en utilisant un mélange d'oligo(dT)₁₈ et de d'hexamères aléatoires, en suivant le protocole du fabricant (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen).

Les PCR quantitatives (qPCR) à partir des ADNc issus des tissus ont été réalisées avec le kit QuantiFast SYBR Green PCR (Qiagen) dans un volume final de 5 µL, en suivant les instructions du fabricant. Les PCR quantitatives avec rétrotranscription (RT-qPCR) à partir des ARN issus des écouvillons trachéaux et cloacaux ont été réalisées avec le kit QuantiNova SYBR Green OneStep (Qiagen) dans un volume final

de 10 µL en suivant les instructions du fabricant. Enfin, les qPCR à partir des ADN bactériens issus des fientes ont été réalisées à l'aide du kit QuantiFast SYBR Green (Qiagen), dans un volume final de 20 µL, en suivant les instructions du fabricant. Les résultats de ces dernières ont été normalisés par rapport à quatre gènes de ménage (RPL4, SDHA, RPL30 et RPS13).

Histopathologie, immuno-histochimie et fluorescence *in-situ*

Un examen post-mortem a été réalisé sur tous les animaux. Les prélèvements de trachée, poumons, iléon, caecum, côlon et cerveau, conservés dans du formol 10%, ont été inclus en paraffine, sectionnés avec une épaisseur de coupe de 4 µm, puis colorés avec de l'hémalum-éosine.

Un immuno-marquage a été réalisé sur les échantillons de poumon avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la nucléoprotéine des virus influenza A (Argene).

De la fluorescence *in situ* a été réalisée sur les échantillons d'iléon avec une sonde ciblant l'ARN ribosomique bactérien 16S, comme décrit par Elderman et al., 2017.

Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism v5.01, en utilisant le test Mann Withney (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type.

RESULTATS

Suivi clinique des animaux

Les animaux n'ont pas présenté de symptôme tout au long de la période d'infection. Le traitement aux antibiotiques n'a pas eu de répercussion sur l'état général des animaux : notamment, aucun trouble digestif n'a été observé.

Déplétion du microbiote par les antibiotiques

L'efficacité du traitement antibiotique sur la déplétion du microbiote intestinal a été vérifiée la veille de l'infection, après 15 jours de traitement. Tous les animaux traités aux antibiotiques ont montré une très forte diminution de la charge bactérienne, cette dernière ayant été déterminée par une qPCR ciblant le gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S (figure 1A) et par dilutions successives de fientes en milieu liquide (figure 1B).

Une vérification supplémentaire a été réalisée *a posteriori* en réalisant de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur des coupes d'iléon en utilisant une sonde dirigée contre le gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S et couplée à un fluorochrome.

Aucune bactérie n'a été visualisée sur les coupes d'intestin correspondant aux animaux traités aux antibiotiques, tandis qu'une fluorescence spécifique était visible chez les animaux non traités (figure 2).

Excrétion virale

L'excrétion virale a été déterminée par RT-qPCR sur les ARN obtenus à partir des écouvillons trachéaux et cloacaux (figure 3). Une plus forte excrétion cloacale aux jours 3 et 5 post-infection (jpi) a été mise en évidence chez les animaux traités aux antibiotiques, particulièrement à 3jpi avec un facteur 100 entre les deux groupes. L'excrétion trachéale des animaux traités n'était pas significativement différente de celle des animaux non traités.

Des qPCR ont également été réalisées sur les ADNc obtenus à partir des prélèvements de rate et de cerveau. La présence de virus a été mise en évidence dans ces organes, comme attendu pour un VIAHP (données non présentées).

Réponse immunitaire innée anti-virale

Dans le poumon, l'infection par le virus H5N9 hautement pathogène a donné lieu à une augmentation de l'expression des interférons de type 1 et des gènes stimulés par les interférons (GSI), comme IFIT-5. L'expression de ces derniers était significativement augmentée à 7jpi chez les animaux traités aux antibiotiques (figures 4A et 4B).

En revanche, dans l'intestin, l'infection n'a pas donné lieu à une augmentation de la production d'interféron de type 1, dans un groupe comme dans l'autre. Cependant, l'expression des GSI était significativement diminuée chez les animaux traités aux antibiotiques à 3jpi (figures 4C et 4D).

Histopathologie, immuno-histo-chimie

Les lésions histopathologiques ont été observées dans la trachée et les bronches, avec des lésions subaiguës de trachéite et de bronchite diffuses à multifocales. Les lésions de trachéite étaient caractérisées par exemple par une perte de la ciliature, de la nécrose focale avec exfoliation de l'épithélium superficiel, ou encore, la présence de cellules inflammatoires. Celles de bronchite étaient caractérisées par une hyperplasie épithéliale régénérative et également par une infiltration par des cellules inflammatoires. Aucune différence dans la nature et l'intensité des lésions n'a été notée entre les groupes I/NT et I/ABX (données non présentées).

Le marquage par immuno-histo-chimie a révélé une quantité plus importante de virus dans les intestins des animaux traités aux antibiotiques, comparée aux animaux non traités. Le marquage a également montré une grande quantité de virus dans les poumons et les

trachées des animaux, sans qu'il n'y ait de différence entre les groupes (données non présentées).

DISCUSSION

Nous avons montré que, chez les animaux infectés par le virus influenza aviaire H5N9 hautement pathogène et traités préalablement aux antibiotiques, la réponse immunitaire innée était modérément augmentée dans les poumons, tandis qu'elle était diminuée dans l'intestin, quand bien même la réplication virale y était plus importante.

Des études s'intéressant à la régulation de l'infection par un virus influenza A en l'absence ou en la présence d'un microbiote ont montré la présence d'une réponse immunitaire diminuée et d'une réplication virale augmentée dans les poumons chez la souris (Abt et al., 2012) et dans l'intestin et le poumon chez le poulet (Yitbarek et al., 2018). Nos résultats montrent pour la première fois l'existence chez le canard d'une réponse immunitaire innée sur-réglée dans l'appareil respiratoire sans différence sur la réplication virale, et une réponse diminuée malgré une réplication virale augmentée dans l'intestin, suite à la déplétion du microbiote intestinal.

Notre principale hypothèse est que la déplétion du microbiote intestinal se traduit par une diminution de la réponse immunitaire innée anti-virale et que la perte du contrôle de la réplication virale qui en résulte mène ainsi à une augmentation de l'excrétion virale. Le microbiote intestinal pourrait maintenir une activité à bas bruit du système immunitaire, permettant à ce dernier de réagir de façon efficace et précoce lors d'une infection (Abt et al., 2012). Une étude a également montré l'implication du microbiote intestinal dans la régulation de la production d'anticorps, celle-ci débutant dans les premiers stades de l'infection (Kim and Kim, 2017).

Nous sommes actuellement en train d'investiguer les raisons ayant entraîné l'augmentation de la réponse immunitaire dans les poumons

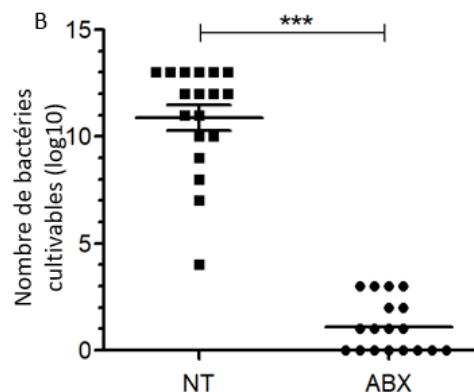
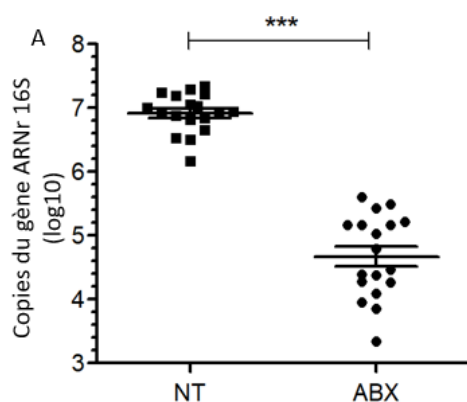


Figure 1 : Déplétion du microbiote intestinal par un traitement antibiotique à large spectre. NT : non traités. ABX : traités aux antibiotiques. A : qPCR ciblant la région V4-V5 de l'ARN ribosomique 16S bactérien. B : Nombre de bactéries aérobies cultivables par gramme de fiente.

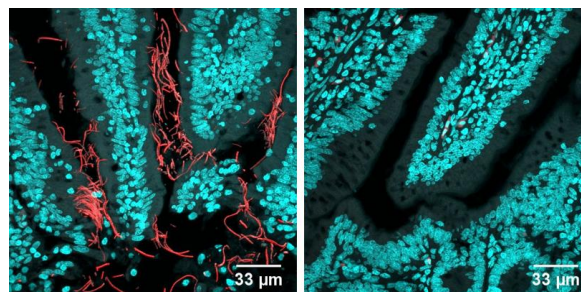


Figure 2 : Hybridation *in situ* en fluorescence ciblant le gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S. Les bactéries apparaissent en rouge chez l'animal non traité aux antibiotiques (gauche) et ne sont pas visualisées chez l'animal traité aux antibiotiques (droite).

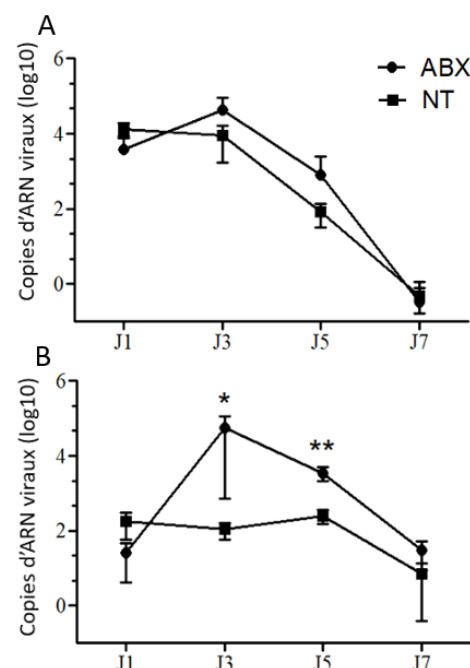


Figure 3 : Excrétion virale. A : Excrétion trachéale. B : Excrétion clocale.

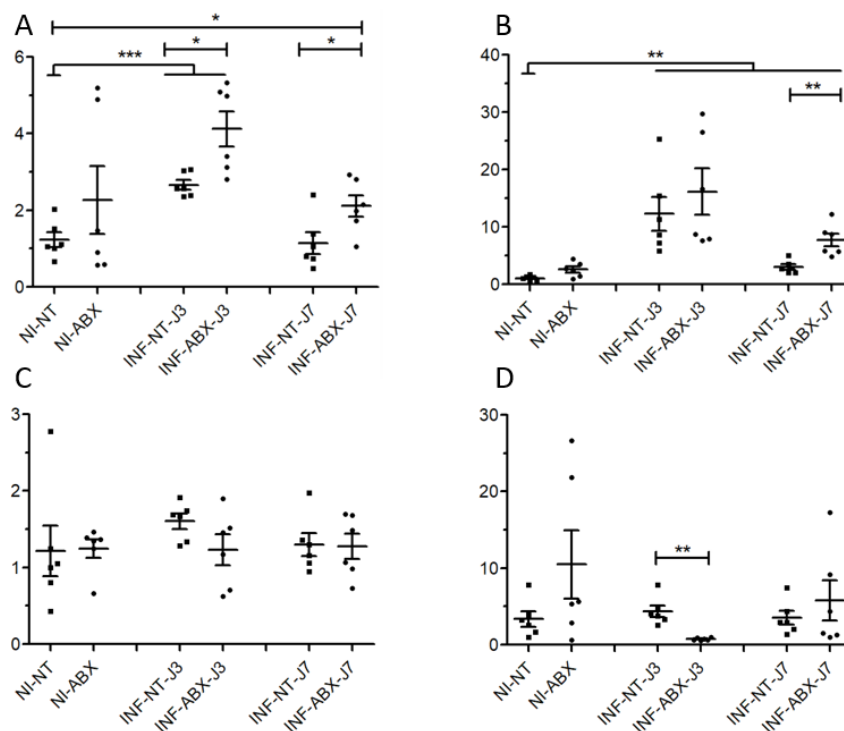


Figure 4 : Réponse immunitaire innée antivirale. A : interféron alpha dans le poumon. B : IFIT-5 dans le poumon. C : interféron alpha dans l'iléon. D : IFIT-5 dans l'iléon. Des résultats similaires ont été obtenus avec les GSI suivants : Mx1, ADAR1, OAS-L.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), la Chaire de biosécurité aviaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation et CIFO) et la région Occitanie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., Wherry, E.J., Artis, D., 2012. *Immunity* 37, 158–170.
- Alexander, D.J., Parsons, G., Manvell, R.J., 1986. *Avian Pathology* 15, 647–662.
- Briand, F.-X., Schmitz, A., Ogor, K., Le Prioux, A., Guillou-Cloarec, C., Guillemoto, C., Allée, C., Le Bras, M.-O., Hirschaud, E., Quenault, H., Touzain, F., Cherbonnel-Pansart, M., Lemaitre, E., Courtillon, C., Gares, H., Daniel, P., Fediaevsky, A., Massin, P., Blanchard, Y., Eterradossi, N., van der Werf, S., Jestin, V., Niqueux, E., 2017. *Eurosurveillance* 22.
- Burggraaf, S., Karpala, A.J., Bingham, J., Lowther, S., Selleck, P., Kimpton, W., Bean, A.G.D., 2014. *Virus Research* 185, 23–31.
- Elderman, M., Sovran, B., Hugenholtz, F., Graversen, K., Huijskes, M., Houtsma, E., Belzer, C., Boekschoten, M., de Vos, P., Dekker, J., Wells, J., Faas, M., 2017. *PLOS ONE* 12, e0184274.
- Iwasaki, A., Pillai, P.S., 2014. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 315–328.
- Kim, M., Kim, C.H., 2017. *Gut Microbes* 8, 392–399.
- Simon, K., Verwoolde, M.B., Zhang, J., Smidt, H., de Vries Reilingh, G., Kemp, B., Lammers, A., 2016. *Poult Sci* 95, 1543–1554.
- Yang, X., Steukers, L., Forier, K., Xiong, R., Braeckmans, K., Reeth, K.V., Nauwynck, H., 2014. *PLOS ONE* 9, e110026.
- Yitbarek, A., Alkie, T., Taha-Abdelaziz, K., Astill, J., Rodriguez-Lecompte, J.C., Parkinson, J., Nagy, é., Sharif, S., 2018. *Beneficial Microbes* 1–12.