



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Eve MARTIN**

Etude de l'immunité intestinale de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et perspectives de modulation par des additifs alimentaires : approches cellulaires et moléculaires

Soutenance réalisée le 23.10.2013

Membres du jury :

Rapporteurs : David DUBAYLE	Maître de Conférences, Laboratoire de Neurophysique et Physiologie, Université Paris Descartes
Danielle TROUTAUD	Professeur, EA3842 Homéostasie Cellulaire & Pathologies, Université de Limoges
Examineurs : Gilbert WEBER	Corporate Scientist, Recherche et Développement en Nutrition et Santé Animale, DSM Nutritional Products, Bâle
Oliver NUSSE	Professeur, INSERM UMR-S757 Signalisation Calcique et Interactions Cellulaires dans le Foie, Université Paris Sud (président du jury)
Jean-Pol FRIPPIAT	Professeur, EA7300 Stress, Immunité, Pathogènes, Université de Lorraine (directeur de thèse)
Christine LEGRAND-FROSSI	Maître de Conférences, EA7300 Stress, Immunité, Pathogènes, Université de Lorraine (co-directrice de thèse)
Viviane VERLHAC TRICHET	Principal Scientist, Nutrition et Santé du poisson, DSM Nutritional Products, Village-Neuf (co-directrice de thèse)

**EA7300 Stress, Immunité, Pathogènes, Université de Lorraine, 9 Avenue de la forêt de Haye,
54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France**

Je dédie cette thèse à mes grands-parents adorés et à ma fille chérie Alice.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier mes directeurs et co-directeurs de thèse, Jean-Pol Fripiat, Christine Legrand-Frossi et Viviane Verlhac Trichet, pour m'avoir accompagnée et guidée durant cette thèse. Je les remercie pour leur soutien et leurs conseils durant ces années. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Merci Jean-Pol d'avoir partagé avec moi vos connaissances en biologie moléculaire et pour vos conseils et vos analyses toujours justes concernant mon travail. Merci Christine pour votre disponibilité et votre bienveillance à mon égard ainsi que pour votre soutien lors de la rédaction de mon manuscrit. Merci Viviane pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir toujours poussée à donner le meilleur et pour m'avoir permis d'en arriver là où j'en suis.

J'adresse mes sincères remerciements à David Dubayle et Danielle Troutaud pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi qu'à Gilbert Weber et Oliver Nüsse pour avoir accepté d'être membres de ce jury. Je souhaite également remercier DSM Nutritional Products et en particulier Anna-Maria Klünter pour m'avoir parrainé pour la réalisation de cette thèse CIFRE et pour m'avoir ensuite offert un poste permanent au sein du CRNA.

Je souhaite adresser tous mes remerciements aux membres du groupe aquaculture Emilie Duval, Denis Constant, Fabrice Spenlehauer, Ester Santigosa, Floriane Dec, Pierre Burget, Johann Humber, Gilbert Guidemann ainsi qu'aux amis de passage Jordane et Alicia pour l'aide qu'ils m'ont apporté lors de la réalisation de mes différentes expériences ainsi que pour leur amitié. Merci d'avoir su apporter chaque jour un peu de légèreté et de gaieté à ce travail et de m'avoir prêté une oreille compatissante lorsque j'en avais besoin. Je remercie également Matthieu Bascove, Nathan Guéguinou et Véronique Schenten ainsi que tous les membres de l'équipe de M. Fripiat qui m'ont aidé lors de mes visites au sein du laboratoire universitaire. Merci d'avoir pris le temps de m'initier aux techniques de biologie moléculaire et d'avoir su rendre mes séjours nancéens inoubliables. J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres du CRNA, particulièrement Angéline, Sabrina, Stéphane et Yann, et à tous ceux qui gravitent ou ont gravité à cet étage et qui m'ont soutenue de près ou de loin.

Un grand merci à tous mes amis que je ne nommerais pas mais qui se reconnaîtront, qui m'ont soutenue fidèlement tout au long de cette aventure et avec qui j'ai partagé du bon temps qui m'a permis de prendre du recul lors des moments difficiles.

Enfin, je voudrais remercier ma famille et particulièrement ma mère Patricia et ma sœur Guylène. Merci maman de croire en moi depuis plus de 30 ans et d'avoir toujours été là pour moi. Merci Guylène pour ton affection et ton soutien sans faille. J'espère que vous serez fières de moi.

Et surtout je remercie mon mari Henry, mon plus grand fan sans qui je ne serais pas la même. On se souviendra de ces années de thèse durant lesquelles on a trouvé le temps de se marier et d'avoir un joli bébé. Merci de faire partie de ma vie et de la rendre exceptionnelle.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	vi
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	x
ABREVIATIONS.....	xiv
ETUDE COMPARATIVE DES TISSUS LYMPHOIDES ASSOCIES A LA MUQUEUSE INTESTINALE DU PORC, DU POULET ET DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (<i>Onchorynchus mykiss</i>) ET DE LEURS FONCTIONS	1
I. Description comparative des structures intestinales des trois espèces.....	1
1.1 L'anatomie intestinale	2
1.2 La paroi intestinale	4
II. Système immunitaire lié à la muqueuse intestinale : organisation et composition .	8
2.1 Description générale	8
2.2 Répartition des structures lymphoïdes le long de la muqueuse intestinale	9
2.3 Tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT)	10
2.3.1 Les plaques de Peyer	10
2.3.2 La bourse de Fabricius, les amygdales cecales et le diverticule de Meckels	11
2.3.3 Les follicules isolés	12
2.3.4 L'épithélium intestinal.....	13
2.3.5 La lamina propria	15
III. Fonctions cellulaires et moléculaires de la réponse immune.....	16
3.1 La réponse immune non spécifique	17
3.1.1 Les fonctions des phagocytes	17
3.1.2 Les cytokines inflammatoires.....	18
3.1.3 Le réponse cytotoxique naturelle non spécifique.....	21
3.2 La réponse immune spécifique	22
3.2.1 Les lymphocytes T et les voies Th1/Th2.....	22
3.2.2 Les lymphocyte B et la réponse anticorps IgA+.....	24

3.2.3 La réponse proliférative des lymphocytes in vitro	27
PROJET DE RECHERCHE	29
I. Choix de l'espèce.....	29
II. Contexte et enjeux économiques liés à cette étude	29
2.1 La vitamine C	30
2.2 Les B 1,3/1,6 glucans.....	30
2.3 Les nucléotides	31
III. Objectifs de la thèse	34
3.1 Etude comparative des fonctions immunes intestinales et non muqueuses de la truite arc-en-ciel.....	34
3.2 Modulation de la réponse immune intestinale par des additifs alimentaires.....	35
3.3 Mise en place de la plateforme de PCR en temps réel et étude de la réponse immune intestinale	35
MATERIELS ET METHODES.....	37
I. Paramètres expérimentaux	37
1.1 Animaux et conditions d'élevage	37
1.2 Aliment et nourrissage	37
1.3 Protocole expérimental des essais de modulation de la réponse immune par les nucléotides.....	38
II. Prélèvement des tissus	39
III. Isolement cellulaire	39
3.1 Préparation des tissus intestinaux : séparation des cellules du tissu.....	39
3.2 Préparation du rein antérieur : broyage et filtration du tissu	40
3.3 Dilution du volume sanguin en vue du gradient de densité.....	40
3.4 Gradient de densité.....	40
IV. Analyse des paramètres cellulaires.....	41
4.1 Phagocytose.....	41

4.2	Flambée respiratoire	42
4.3	Cytotoxicité naturelle.....	44
4.4	Apoptose.....	48
4.5	Prolifération lymphocytaire.....	50
4.5.1	Méthode utilisant le Bromodéoxyuridine	50
4.5.2	Méthode utilisant le CFSE	52
V.	Analyse des paramètres moléculaires	58
5.1	Prélèvement et stockage des échantillons.....	58
5.2	Extraction de l'ARNm et transcription inverse	58
5.3	Synthèse des ADNc à partir des ARNm	60
5.4	PCR temps réel	61
VI.	Optimisation de la PCR en temps réel des gènes d'intérêt	63
VII.	Statistiques	65
	RESULTATS	67
I.	Etude comparative de la réponse immune intestinale et systémique.....	67
1.1	Caractérisation des types cellulaires dans le sang et le rein antérieur	68
1.2	Méthodes de purification et caractérisation des types cellulaires présents dans les suspensions de leucocytes intestinaux	69
1.2.1	Etude des différents types cellulaires obtenus après purification par « digestion » ou « mécanique »	69
1.2.2	Evaluation du pourcentage de leucocytes en apoptose après purification.....	71
1.3	Etude des principales fonctions de l'immunité innée	72
1.3.1	La flambée respiratoire.....	72
1.3.2.	La phagocytose.....	74
1.3.3	Cytotoxicité naturelle.....	75
1.3.4	Mesure de l'expression de cytokines inflammatoires par biologie moléculaire.....	78
1.4	Etude des principales fonctions de l'immunité adaptative.....	80
1.4.1.	Prolifération cellulaire.....	80

1.4.2 Mesure de l'expression de gènes liés aux lymphocytes T et B et à leurs différentes fonctions ..	85
II. Modulation de la réponse intestinale par les nucléotides	89
2.1 Modulation de la réponse immune intestinale de la truite arc-en-ciel par un régime alimentaire supplémenté en nucléotides	89
2.1.1 Effet des nucléotides sur l'expression des cytokines inflammatoires	89
2.1.2 Effets des nucléotides sur la prolifération des lymphocytes intestinaux	90
2.1.3 Effets des nucléotides sur l'expression des marqueurs moléculaires spécifiques des lymphocytes B et T.....	92
2.1.4 Effets des nucléotides sur l'expression de l'immunoglobuline spécifique à la muqueuse intestinale	93
2.2 Modulation de la réponse immune intestinale de la truite arc-en-ciel par un régime alimentaire supplémenté avec une dose plus faible de nucléotides.....	93
2.2.1 Effet des nucléotides sur la phagocytose.....	94
2.2.2 Effet des nucléotides sur la cytotoxicité naturelle	95
2.2.3 Effet des nucléotides sur l'apoptose des lymphocytes en culture <i>in vitro</i>	96
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	97
I. Etude comparative de la réponse immune intestinale et systémique.....	97
II. Modulation de la réponse intestinale par les nucléotides	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115
PUBLICATION.....	133

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schéma descriptif du système gastro-intestinal du porc.....	p2
Figure 2 : Schéma descriptif du système gastro-intestinal du poulet.	p3
Figure 3 : Schéma descriptif simplifié du système gastro-intestinal de la truite arc-en-ciel (<i>Onchorynchus mykiss</i>).	p4
Figure 4 : Schéma descriptif détaillé de la paroi intestinale des mammifères et des oiseaux.	p5
Figure 5 : Schéma descriptif d'une coupe de la muqueuse de l'intestin grêle de mammifère détaillant les villosités et les glandes de Lieberkühn qui la composent.	p7
Figure 6 : Organisation spatiale schématisée des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale des mammifères d'après FORTUN-LAMOTHE et BOUILLER (2004).	p10
Figure 7 : Schéma représentatif de l'organisation cellulaire de l'épithélium intestinal de l'intestin grêle des mammifères.	p13
Figure n°8 : Observation au microscope électronique de monocytes et granulocytes provenant d'une suspension de leucocytes intestinaux de truite arc-en-ciel (grossissement x100 sous immersion, coloration de May-Grünwald / Giemsa).	p17
Figure 9 : Représentation schématisée des interactions survenant entre les cytokines et les cellules lors de la réponse inflammatoire chez la souris.....	p19
Figure 10 : Schéma illustrant l'activation des voies Th1 ou Th2 au niveau intestinal.	p23
Figure 11 : Figure schématisée des différentes étapes allant de la production des IgA par les cellules plasmiques à la sécrétion de celles-ci en vue d'une protection de la muqueuse face aux antigènes du lumen.	p25
Figure 12 : Illustration du système « Nunc® Lab-Tek® II - CC2,™ Chamber Slide™ » utilisé lors des tests de phagocytose.	p41
Figure 13 : Observation au microscope optique (objectif 100x à immersion) d'un macrophage intestinal de truite arc-en-ciel ayant ingéré 3 levures.....	p42
Figure n° 14 : Représentation du diagramme en nuage de points généré par le logiciel CellQuest Pro lors d'un test de cytotoxicité. Les différentes populations de cellules sont réparties sur le diagramme en fonction de leurs fluorescences.....	p46
Figure n° 15 : Photo d'un diagramme en nuage de point généré par CellQuest Pro lors du traitement des résultats de cytotoxicité naturelle obtenu à partir des leucocytes intestinaux d'une truite arc-en-ciel.	p47
Figure n16 : Exemple de droites de régression correspondant aux pourcentages de lyse mesurés aux trois ratios cellules cibles : cellules effectrices en fonction du nombre de cellules effectrices.	p48
Figure 17 : Représentation récapitulative du test d'apoptose utilisant le double marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium.	p50

Figure 18 : Illustration du principe de détection du BrdU incorporé dans les brins d'ADN lors de la réplication cellulaire.	p51
Figure 19 : Illustration du principe de la mesure de la multiplication cellulaire par marquage des cellules au CFSE et lecture au cytomètre de flux.....	p53
Figure 20 : A : Histogramme de fluorescence généré par le logiciel Cellquest Pro lors de l'étude des divisions cellulaires <i>in vitro</i> d'une culture de leucocytes de sang périphérique de truite arc-en-ciel. Le pic de la génération parent n'est plus visible et il est difficile de distinguer exactement combien de pics différents sont présents dans l'histogramme. B : Histogramme de fluorescence généré par le logiciel Cellquest Pro et retravaillé via le logiciel ModFit.	p54
Figure 21: Modèle d'analyse généré par le logiciel Modfit LT™(Verity software house) à partir des résultats enregistrés à J0 par le cytomètre de flux lors d'un test de prolifération utilisant la CFSE.	p56
Figure 22 : Analyse des données de prolifération CFSE à J6 générée par le logiciel Modfit LT™ (Verity software house) utilisant comme base le modèle généré à J0 à partir des mêmes leucocytes intestinaux.	p57
Figure 23 : Programme de PCR utilisé lors des tests de RT-qPCR.	p61
Figure 24 : Courbe de fusion correspondant à l'amplification du gène GAPDH à partir de l'ARN extrait de cellules isolées d'intestins de truite arc-en-ciel.....	p64
Figure 25 : Coloration au May-Grünwald / Giemsa de leucocytes purifiés de sang périphérique (A), de rein antérieur (B).	p68
Figure 26 : Coloration au May-Grünwald / Giemsa de leucocytes purifiés d'intestin.....	p70
Figure 27 : Pourcentage de leucocytes intestinaux en apoptose.	p72
Figure 28 : Reproduction des histogrammes générés à T0 (A) et T60min (B) par le logiciel CellQuest pro® illustrant les pics de fluorescence obtenus lors de la mise en contact de la DHR 123 avec les dérivés oxygénés produits par des phagocytes isolés à partir du rein antérieur de truite arc-en-ciel.	p73
Figure 29 : Activité phagocytaire des leucocytes intestinaux et du rein antérieur.....	p74
Figure 30 : Indice de phagocytose mesuré à partir de la phagocytose de levures par 200 phagocytes obtenus avec l'isolement digestion et mécanique et collés sur lame.	p75
Figure 31 : Cytotoxicité naturelle des leucocytes du rein antérieur et de l'intestin.	p76
Figure 32 : Expression relative du gène codant NKEF dans les suspensions de leucocytes de l'intestin en fonction de l'expression du même transcrit dans les leucocytes du rein antérieur.....	p77
Figure 33 : Pourcentages de lyse obtenus aux ratios 5 :1, 10 :1 et 25 :1 lorsque les cellules cytotoxiques naturelles isolées avec les deux techniques d'isolement sont mises en contact avec les cellules P815. .	p78
Figure 34 : Expression relative des gènes codants les cytokines inflammatoires IL-1 β (A), IL-8 (B) et TNF- α (C) dans les suspensions de leucocytes de l'intestin en fonction de l'expression de ces mêmes gènes dans les leucocytes du rein antérieur.	p79
Figure 35 : Prolifération des leucocytes du sang périphérique et de l'intestin de truite arc-en-ciel en culture <i>in vitro</i> après stimulation par trois mitogènes (PHA-P, LPS et PWM).	p81
Figure 36 : Pourcentages de lymphocytes en apoptose présents dans les cultures <i>in vitro</i> de leucocytes intestinaux et de rein antérieur avec ou sans ajout de camptothécine dans le milieu.....	p82

Figure 37 : Moyennes de fluorescence mesurées par Cellquest Pro au Jour 0 et Jour 6 de culture des leucocytes de sang périphérique (A) ou intestinaux (B) sans stimulation par des mitogènes.	p83
Figure 38 : A : Baisse de fluorescence moyenne observée entre le Jour 0 et le jour 6 lors de la mise en culture de leucocytes purifiés de sang périphérique et d'intestin. B : Indices de prolifération obtenus pour ces mêmes suspensions de leucocytes correspondants au nombre de cellules retrouvées dans les générations filles divisé par le nombre théorique de cellules présentes dans la génération parent.	p84
Figure 39 : Indice de prolifération correspondant au nombre de cellules retrouvées dans les générations filles divisé par le nombre théorique de cellules présentes dans la génération parent mesuré à partir des données de fluorescence enregistrées après 6 jours de culture <i>in vitro</i> par cytométrie de flux.	p85
Figure 40 : Expressions relatives des gènes codant CD3 (marqueur des lymphocytes T, A) et Pax5 (marqueur des lymphocytes B, B) dans les suspensions de leucocytes de l'intestin en fonction des expressions des mêmes gènes dans les leucocytes du rein antérieur de truites.	p86
Figure 41 : Expressions relatives des gènes codant T-bet (A), GATA3 (B), CD8B (C) et CD8 α (D) dans les leucocytes de l'intestin en fonction des mêmes expressions dans les leucocytes du rein antérieur de truites arc-en-ciel.	p87
Figure 42 : Expressions relatives des gènes codant la chaîne lourde d'IgM (A) et d'IgT (B) dans les leucocytes de l'intestin en fonction des mêmes expressions dans les leucocytes du rein antérieur.	p88
Figure 43 : Expression relative des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-1B (A) et IL-8(B) déterminée par PCR en temps réel dans des leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté avec 600 et 3000ppm de nucléotides en fonction de l'expression des mêmes cytokines dans des leucocytes intestinaux issus de poissons contrôles.	p89
Figure 44 : Indices de prolifération mesurés après 6 jours de culture <i>in vitro</i> de leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté ou non de 600 et 3000 ppm de nucléotides.	p90
Figure 45 : Indices de prolifération mesurés après 6 jours de culture <i>in vitro</i> de leucocytes du sang périphérique isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté ou non de 600 et 3000 ppm de nucléotides.	p91
Figure 46 : Expression relative des gènes codant les marqueurs cellulaires des lymphocytes T CD3 (A) et des lymphocytes B Pax-5 (B) déterminée par PCR en temps réel dans des leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté avec 600 et 3000 ppm de nucléotides libres en fonction des mêmes expressions mesurées dans des leucocytes intestinaux issus de poissons contrôles.	p92
Figure 47 : Expression relative des gènes codant la chaîne lourde de l'immunoglobuline IgT dans des leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté avec 600 et 3000ppm de nucléotides en fonction des mêmes expressions mesurées dans des leucocytes issus de poissons contrôles.	p93

Figure 48 : Effet de l'ajout dans l'aliment de 375 et 750 ppm de nucléotides sur l'activité phagocytaire des leucocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel. Les leucocytes ont été incubés pendant 4 h avec des levures (1 leucocyte pour 20 levures) dans la chambre de culture d'une lame de microscope.	p94
Figure 49 : Effet de l'ajout de 375 et 750 ppm de nucléotides dans l'aliment sur l'activité cytotoxique naturelle des leucocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel.	p95
Figures 50 : Effet d'un régime supplémenté avec 375 et 750 ppm de nucléotides sur le pourcentage de lymphocytes intestinaux en apoptose lors d'une culture in vitro.	p96
Tableau 1 : Nomenclature des nucléotides ARN.....	p32
Tableau 2 : Formulation de l'aliment de base.....	p37
Tableau 3 : Composition du premier mélange réactionnel utilisé lors de la transcription inverse des ARN en ADNc.	p60
Tableau 4 : Composition du second mélange réactionnel utilisé lors de la transcription inverse des ARN en ADNc.	p60
Tableau 5 : Influence d'un régime supplémenté avec 375 et 750 ppm de nucléotides sur les pourcentages de lyse obtenus aux trois ratios cellules effectrices : cellules cibles (E:C).....	p95

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AMP : adénosine-5'-monophosphate
APC : allophycocyanine
ARN : acide ribonucléique
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine
CD : cluster de différenciation
CFSE : carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMP : cytidine-5'-monophosphate
Con-A : concanavalin A
CRNA : centre de recherche en nutrition animale
DHR123 : dihydrorhodamine 123
Dio-C18 : perchlorate de 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine
dNTP : appellation courante du mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)
DO : densité optique
DTT : dithiothréitol
FAE : épithélium associé aux follicules
FAO : food and agriculture organization
GALT : tissus lymphoïdes associé à la muqueuse intestinale
GMP : guanosine-5'-monophosphate
IEL : lymphocytes intra-épithéliaux
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IMP : inosine-5'-monophosphate
LDH : lactate déshydrogénase
LPS : lipopolysaccharide
B-Me : **B**-mercaptoethanol
MS222 : acide éthyle ester d'acide 3-aminobenzoïque
MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCC : cellules cytotoxiques naturelles
NK : natural killer
NKEF : natural killer enhancement factor

pb : paire de bases

PHA-P : phytohaemagglutinine P

PI : iodure de propidium

plgR : glycoprotéine transmembranaire exprimée dans la surface basolatérale des cellules épithéliales

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

PWM : mitogène pokeweed

qPCR : réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

RLU : unité relative lumineuse

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SVF : sérum de veau fœtal

SVH : virus de la septicémie hémorragique virale

TA : température ambiante

TCR : récepteur des cellules T

TGF : transforming growth factor

Th : lymphocyte T helper

TMB : tetraméthylebenzidine

TNF : tumor necrosis factor

TReg : cellule T régulatrice

UMP : uridine-5'-monophosphate

ETUDE COMPARATIVE DES TISSUS LYMPHOIDES ASSOCIES A LA MUQUEUSE
INTESTINALE DU PORC, DU POULET ET DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL
(*Onchorynchus mykiss*) ET DE LEURS FONCTIONS

Un des enjeux forts du secteur agronomique est d'améliorer et d'optimiser la nutrition et la santé des animaux d'élevage. Parmi-eux, le porc, le poulet et la truite arc-en-ciel sont trois exemples d'espèces à fort intérêt économique. L'impact de la nutrition sur l'immunité intestinale de ces animaux d'élevage est un domaine encore mal connu et l'approfondissement des connaissances dans ce domaine pourrait permettre de trouver des moyens d'améliorer l'alimentation de ces animaux. En effet, le tractus intestinal est non seulement le site de la digestion et de l'absorption mais aussi la première barrière physique protégeant l'organisme des agressions externes. Mais avant de pouvoir étudier l'impact de la nutrition sur l'immunité intestinale du porc, du poulet et de la truite arc-en-ciel, il est nécessaire de connaître les différents acteurs régissant cette immunité locale, ainsi que leur fonctionnement, chez ces trois espèces. C'est pour cela que cette étude comparative a pour but de définir les différents composants du système immunitaire intestinal présent chez le porc, le poulet et la truite arc-en-ciel. Les fonctions immunitaires des muqueuses de ces trois espèces seront ensuite comparées entre elles, relevant ainsi les principales différences de l'immunité intestinale chez les mammifères, les oiseaux et les poissons au travers de ces trois exemples. Afin de situer les tissus lymphoïdes au niveau de l'intestin, la première partie de ce travail consiste en une description morphologique des structures intestinales des trois espèces partant de la structure intestinale complète pour finir aux différentes couches formant la paroi de l'intestin. Les différents tissus lymphoïdes présents dans ces structures seront ensuite listés et décrits dans une seconde partie et l'aspect fonctionnel sera abordé dans la troisième et dernière partie de l'étude.

I. Description comparative des structures intestinales des trois espèces

D'une manière générale chez toutes les espèces animales, les tissus lymphoïdes contenant les cellules liées à la réponse immune intestinale sont situés dans la muqueuse intestinale. Chez les mammifères et les oiseaux, il semblerait que ces tissus soient plus concentrés dans la muqueuse de l'intestin grêle et plus particulièrement dans celle du jeuno-iléon (Trepel, 1974 ; Befus et al., 1980) alors que la muqueuse du côlon contient moins de structures liées à la l'immunité intestinale. Chez le poisson, qui possède une structure anatomique moins complexe, ces cellules immunitaires se retrouvent de manière diffuse tout au long de la muqueuse intestinale (Hart et al., 1988). Cette première partie descriptive va permettre de mieux situer ces différentes localisations chez le porc, le poulet et la truite arc-en-ciel.

1.1 L'anatomie intestinale

L'intestin est la partie du système digestif qui s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus et qui assure l'assimilation dans le sang des nutriments provenant des aliments.

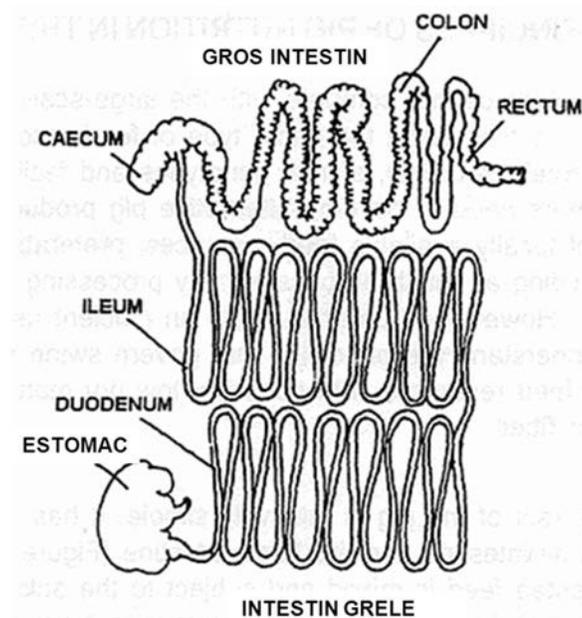


Figure 1 : Schéma descriptif du système gastro-intestinal du porc. L'intestin s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus. L'intestin grêle est composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléum. Le gros intestin est formé principalement du caecum, du côlon et du rectum (Ly, 1979).

Chez la plupart des mammifères, comme par exemple chez le porc, l'intestin est divisé en deux parties appelées l'intestin grêle et le gros intestin (ou côlon). La figure 1 présente un schéma simplifié de la structure gastro-intestinale du porc illustrant les principales parties de ce système.

L'intestin grêle se compose du duodénum, du jéjunum et de l'iléum. Chez le cochon adulte il mesure 16 à 21 mètres de long, le duodénum représente 4-5% de la longueur totale, le jéjunum 88-91% et l'iléum 4-5%. Le jéjunum est donc très long et comprend un grand nombre de boucles. L'iléum se différencie du jéjunum grâce à sa couche musculaire légèrement plus épaisse et sa jonction avec le gros intestin (Lewis et Southern, 2001). Le gros intestin mesure 3.5 à 6 mètres de longueur chez le cochon adulte et est formé du caecum, du côlon, de l'appendice et du rectum. Le caecum représente les premiers 7-8% du gros intestin. Le côlon comprend trois parties désignées comme le côlon ascendant, le côlon transversal et le côlon descendant. La première partie du côlon ascendant est formé de quatre boucles complètes formant une spirale se dirigeant vers le centre du nœud et est nommée le côlon centripète. Une flexion centrale permet aux spirales de se renverser et 3.5 boucles du côlon ascendant sortent du centre du nœud pour donner le côlon centrifuge. Le rectum est enfoncé dans le gras et s'élargit pour former l'*ampulla recti* avant de se terminer par le canal anal (Lewis et

Southern, 2001). Les fonctions essentielles du gros intestin sont l'absorption d'eau transformant les résidus alimentaires liquides de l'intestin grêle en un matériau semi-solide, les fèces, la lubrification des fèces et leur propulsion vers le rectum.

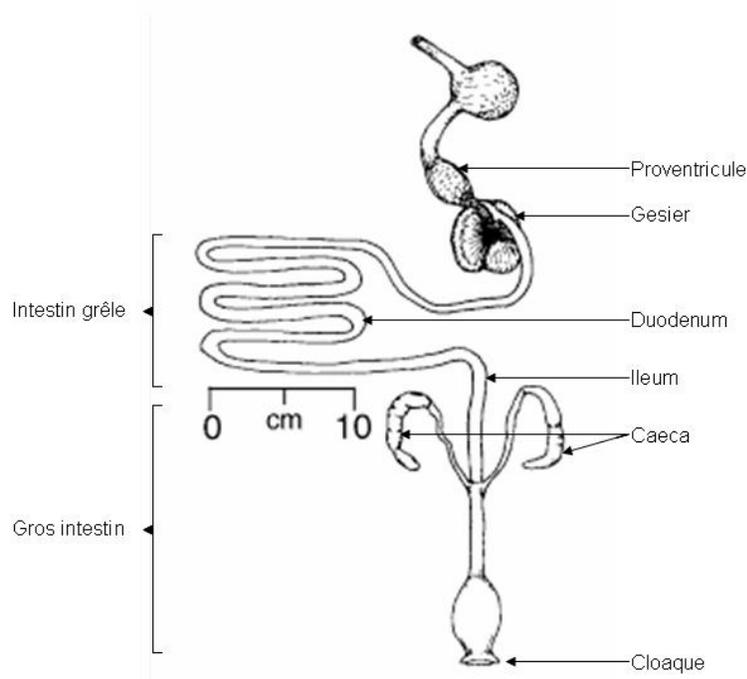


Figure 2 : Schéma descriptif du système gastro-intestinal du poulet. L'intestin s'étend de la sortie du gésier au cloaque. L'intestin grêle est composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléum. Le gros intestin est formé des deux caeca, du côlon et du cloaque (Stevens & Hume 1995).

L'anatomie de l'intestin du poulet, mis à part quelques spécificités, ne diffère pas fondamentalement de celle des mammifères. Comme l'illustre la figure 2, le système intestinal du poulet est également composé de l'intestin grêle et du gros intestin mais par contre les poulets possèdent deux caeca au lieu d'un seul et le rectum est remplacé par le cloaque. Comme chez le porc, l'intestin grêle est composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléum. Le duodénum qui est en forme de boucle et entoure le pancréas, est la première section de l'intestin grêle. Il est suivi du jéjunum et de l'iléum. Les caeca ressemblent à deux sacs fixés à la section entre l'iléum et le gros intestin. Ils sont constitués de trois parties, la partie proximale (ou base), la partie médiane et la partie distale (ou apex). La paroi de la partie proximale est très fine et son lumen restreint, c'est à ce niveau que se situe les amygdales caecales (Getty, 1975). Le gros intestin est très court et se situe entre l'iléon et l'ouverture vers l'extérieur appelée le cloaque.

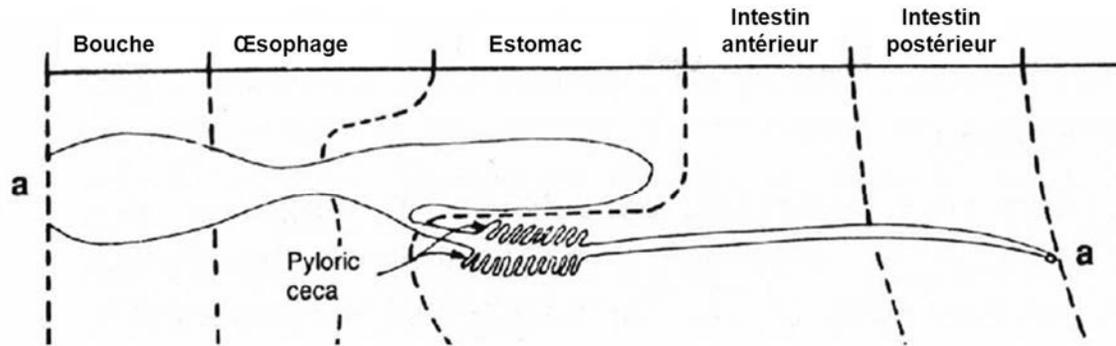


Figure 3 : Schéma descriptif simplifié du système gastro-intestinal de la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*). L'intestin est la partie qui s'étend de la fin de l'estomac à l'anus. L'intestin peut être séparé en trois parties, les caeca pyloriques, l'intestin médian ou proximal et l'intestin postérieur ou distal (Harder, 1975).

L'anatomie des intestins des poissons est beaucoup plus simple que celles des deux autres espèces, mais plus variable d'une espèce à l'autre de poissons en fonction des habitudes alimentaires (herbivore, détritivore, carnivore et omnivore) (Evans, 1998). Il n'existe pas de séparation en intestin grêle, gros intestin et rectum chez les poissons. De plus, la longueur de l'intestin, la présence ou l'absence d'estomac, de caeca pyloriques, de boucles intestinales et de valves peuvent différer d'une espèce à l'autre. De manière générale, les poissons carnivores ont tendance à avoir un intestin court alors que les herbivores en possèdent un plus long (Guillaume et al, 1999). L'espèce que nous étudierons, la truite arc-en-ciel *Onchorynchus mykiss*, est un poisson carnivore appartenant à la famille des Téléostéens, encore appelés poissons osseux, et fait plus précisément partie de la famille des salmonidés. Les salmonidés possèdent un petit intestin formé d'un simple tube et d'un estomac. La figure 3 présente un schéma descriptif simplifié du système gastro-intestinal de la truite arc-en-ciel. L'intestin, qui est la partie allant de la base de l'estomac à l'anus, peut être séparé en trois parties, les caeca pyloriques, l'intestin médian ou proximal et l'intestin postérieur ou distal. La partie de l'intestin faisant la jonction avec l'estomac est entourée d'une centaine de caeca pyloriques. L'intestin médian représente la plus longue portion de l'intestin, il est présent dans l'organisme sous forme d'un enchevêtrement de boucles reliées à l'intestin postérieur par la valvule iléo-caecale. Chez la truite, le début de l'intestin postérieur est marqué par une augmentation du diamètre du tube et par un léger coude au niveau de la valve iléo-caecale, son extrémité postérieure se termine par l'anus.

1.2 La paroi intestinale

Chez les mammifères et les oiseaux, la structure de la paroi intestinale est formée de cinq couches : la muqueuse, la *muscularis mucosae*, la sous-muqueuse, la musculueuse et la séreuse. Par contre chez les poissons, seules trois couches sont présentes car l'absence de *muscularis mucosae* empêche la distinction entre la muqueuse et la sous muqueuse (Guillaume et al, 1999).

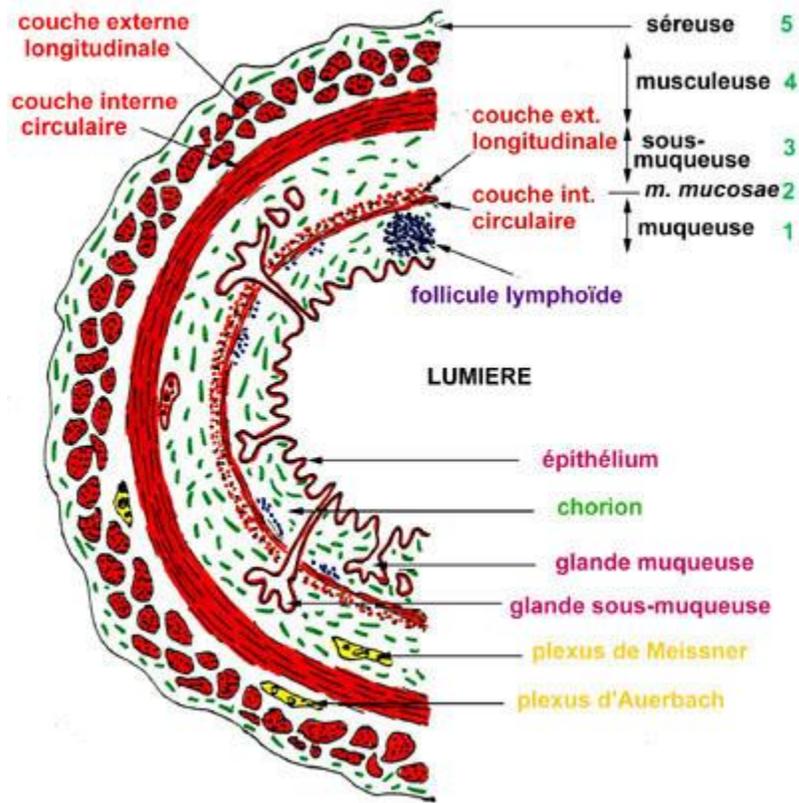


Figure 4 : Schéma descriptif détaillé de la paroi intestinale des mammifères et des oiseaux. En partant de la lumière intestinale en allant vers l'intérieur de l'organisme le schéma illustre les différentes couches formant la paroi : la muqueuse, la *muscularis mucosae*, la sous-muqueuse, la musculieuse et la séreuse, ainsi que les principaux éléments qui composent ces différentes couches. (Schéma emprunté à N. Vacheret, UCB Lyon)

La figure 4 illustre de manière détaillée les différentes couches formant la paroi intestinale des mammifères et des oiseaux. Ces différentes couches sont donc :

La séreuse : elle est formée d'une mince couche conjonctive dans laquelle circulent les vaisseaux et les nerfs qui vont pénétrer dans les couches plus internes de la paroi. Elle possède une bordure externe de cellules pavimenteuses d'origine mésoblastique.

La musculieuse : il s'agit d'une couche épaisse qui comporte un plan interne circulaire et un plan externe longitudinal de fibres musculaires lisses.

La sous-muqueuse : elle est formée d'un tissu conjonctif lâche, vascularisé et innervé, dans lequel sont présentes des glandes exocrines sous-muqueuses qui déversent leur produit de sécrétion par des canaux excréteurs traversant la *muscularis mucosae* et la muqueuse. Comme la *lamina propria* de la muqueuse, la sous-muqueuse contient des éléments lymphoïdes.

La muscularis mucosae : il s'agit d'une couche mince formée de fibres musculaires lisses organisées en deux plans, un plan interne de fibres circulaires azimutales et un plan externe de fibres longitudinales orientées parallèlement à la paroi.

La muqueuse : elle est formée d'un épithélium de revêtement et de la *lamina propria*, encore appelée chorion. La *lamina propria* est vascularisée et innervée, elle contient parfois des glandes exocrines et est infiltrée d'éléments lymphoïdes (cellules isolées, follicules, ...). Elle exerce trois rôles importants : un rôle mécanique, en soutenant l'épithélium et en permettant à ce dernier de glisser sur les structures plus profondes ; un rôle nutritif, car c'est à travers elle que passe les nutriments sanguins à destination des épithéliums de surface et un rôle de défense, car c'est dans la *lamina propria* que résident de nombreuses cellules de défense et que se déroulent les réactions inflammatoires. La muqueuse intestinale est donc la partie de la paroi intestinale qui contient la majorité des éléments lymphoïdes liés au système immunitaire intestinal et cela est vrai pour les porcs, les poulets mais également pour la truite arc-en-ciel. Chez les mammifères, comme chez les oiseaux, des petites différences structurelles sont observées entre la muqueuse de l'intestin grêle et celle du gros intestin et seront décrites dans le prochain paragraphe. Néanmoins il semblerait que chez les mammifères et les oiseaux les tissus lymphoïdes soient plus concentrés dans la muqueuse de l'intestin grêle et plus particulièrement dans celle du jejuno-iléon. C'est donc sur cette partie que nous focaliserons notre étude. Par contre, chez la truite arc-en-ciel, qui ne possède pas ces différents segments intestinaux, les cellules associées au système immunitaire intestinal se retrouvent dispersées tout au long de la muqueuse intestinale. C'est donc l'intégralité de leur intestin que nous étudierons.

Comme nous l'avons dit précédemment, la structure de la muqueuse de l'intestin grêle et celle du gros intestin ne sont pas exactement similaires.

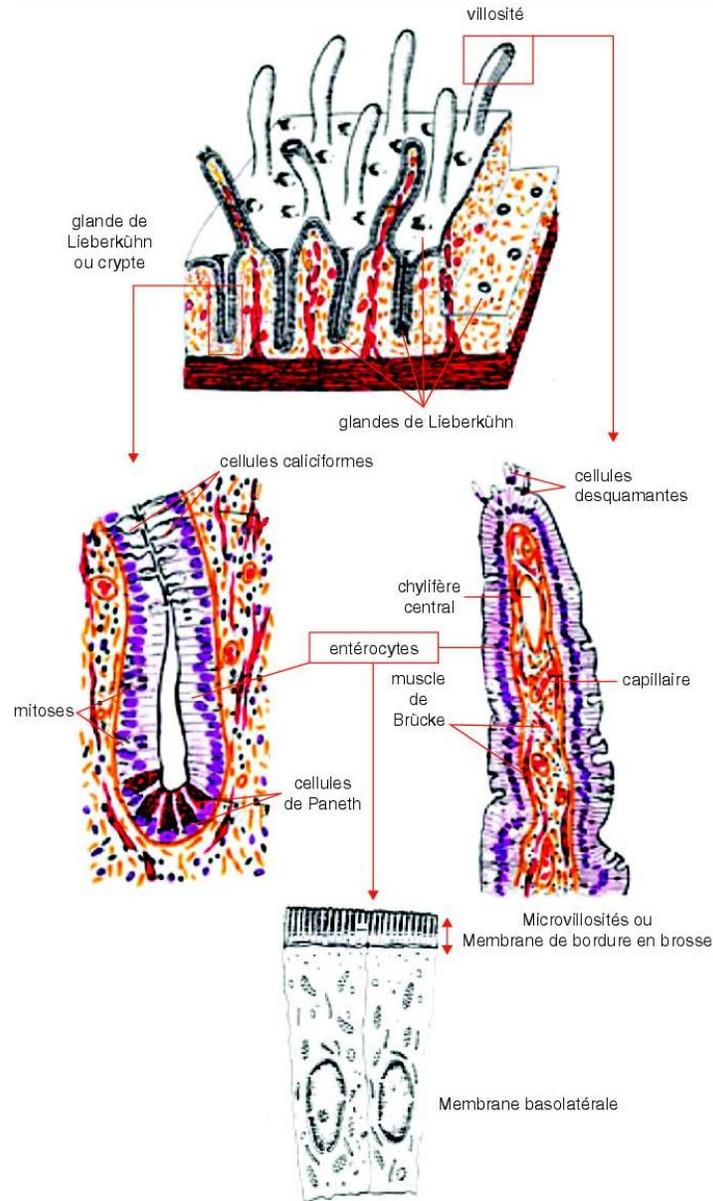


Figure 5 : Schéma descriptif d'une coupe de la muqueuse de l'intestin grêle de mammifère détaillant les villosités et les glandes de Lieberkühn qui la composent. (Lorrot et al. 2005)

Comme décrit sur la figure 5, la structure de la muqueuse de l'intestin grêle se compose de:

- Villosités intestinales qui sont des invaginations en doigt de gant de la muqueuse. Chaque villosité comprend un épithélium de revêtement et un axe conjonctif. L'épithélium est composé d'une couche simple de cellules prismatiques et comprend deux types cellulaires : les entérocytes, cellules les plus nombreuses, hautes et prismatiques avec un noyau ovalaire basal et les cellules caliciformes au pôle apical large, clair et au pôle basal étroit. L'axe conjonctif est formé de tissu conjonctif lâche

(chorion) : il contient un chylifère central, un capillaire lymphatique en cul de sac, des fibres musculaires lisses issues de la couche interne de la *muscularis mucosae* et le muscle de Brücke dont les contractions favorisent le contact de l'épithélium intestinal avec le chyme ainsi que le drainage lymphatique dans le chylifère central.

- Glandes de Lieberkühn, aussi appelées cryptes de Lieberkühn, qui sont des glandes en tube insérées dans la partie profonde du chorion. Elles s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités. L'épithélium glandulaire comporte quatre types de cellules décelables en technique courante : des entérocytes moins hauts que ceux des villosités, des cellules caliciformes, des cellules en mitose et des cellules de Paneth situées au fond des glandes.

Dans le gros intestin du porc et du poulet, les dispositifs augmentant la surface d'échange observés dans l'intestin grêle, ont disparu. On note une absence de villosités intestinales et moins d'entérocytes donc moins de microvillosités. A cet endroit, la muqueuse présente une surface lisse et est réduite à la couche des cryptes de Lieberkühn dans lesquelles le nombre des entérocytes et de cellules endocrines est nettement diminué, le nombre de cellules caliciformes fortement augmenté, alors que les cellules de Paneth ont disparu.

La structure de la muqueuse intestinale des poissons contient des villosités qui sont moins bien individualisées que celles observées chez le porc et le poulet et, de ce fait, ressemblent plus à des plis ou pseudo-villosités (Guillaume et al, 1999).

II. Système immunitaire lié à la muqueuse intestinale : organisation et composition

2.1 Description générale

La muqueuse intestinale est continuellement en contact avec une grande variété d'antigènes incluant de potentiels pathogènes et des antigènes alimentaires présents dans le lumen. La surface considérable de la muqueuse, encore amplifiée par les nombreuses villosités et microvillosités, augmente d'autant le risque qu'un de ces pathogènes pénètre dans l'organisme. Afin de parer à cette éventualité, la muqueuse intestinale, en plus de sa barrière épithéliale, possède un système immunitaire local qui lui est propre nommé système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (GALT). Celui-ci est capable, de tolérer les antigènes alimentaires et de permettre l'absorption des nutriments mais aussi de combattre les antigènes dangereux pour l'organisme. Il existe plusieurs mécanismes immunitaires qui opèrent de concert pour éviter les infections. En première ligne, il y a les barrières physiques comme l'épithélium et le mucus intestinal qui limitent l'adhésion et l'infiltration des pathogènes dans l'organisme. Mais ceux-ci ne sont pas toujours suffisamment efficaces et les agents infectieux peuvent

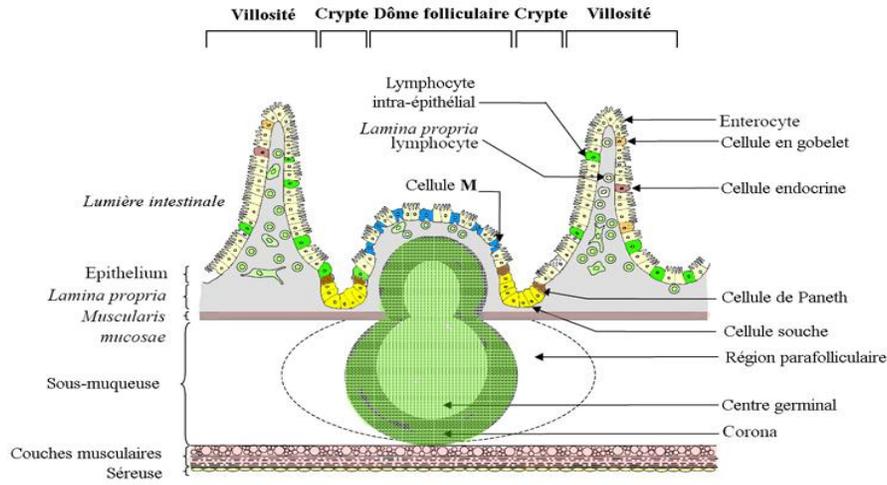
infiltrer les entérocytes. Ces cellules expriment un large spectre de récepteurs de type « Toll-like » qui reconnaissent des molécules caractéristiques des différents types de pathogènes pouvant envahir l'intestin, et ainsi aident à activer la réponse immunitaire intestinale. Cette réponse est ensuite orchestrée par les différentes cellules présentes dans les structures lymphoïdes de la muqueuse intestinale.

2.2 Répartition des structures lymphoïdes le long de la muqueuse intestinale

Chez les mammifères et les oiseaux, les formations lymphoïdes sont plus importantes dans la muqueuse de l'intestin grêle (Trepel, 1974 ; Befus et al., 1980). Se limitant à quelques follicules dans le duodénum, elles s'organisent en vastes plages d'infiltration lymphocytaire : les plaques de Peyer (de 1 à 10 cm de longueur) dans la muqueuse du jéjuno-iléon (particulièrement dans la deuxième moitié de l'iléon). Le côlon possède peu de plaques de Peyer et moins de structures lymphoïdes. Néanmoins, chez le poulet, des follicules ont été observés dans la région du cloaque (Befus et al., 1980) et sont particulièrement importants autour du conduit bursal (Friedman et al., 2003). De plus, dans la région du gros intestin, des amygdales caecales forment un élément fondamental du système immunitaire muqueux aviaire. Il s'agit de larges agrégats lymphoïdes, structurellement similaires aux plaques de Peyer, qui contiennent de multiples follicules et sont recouvertes par un épithélium riche en cellules M (Kitagawa et al., 1998, 2000).

Des études menées sur le système immunitaire intestinal du poisson ont montré que la muqueuse intestinale des vertébrés inférieurs comme le poisson avait des propriétés immunocompétentes (Hart et al., 1988). Cependant, de la même manière que leur intestin est morphologiquement plus simple que celui des mammifères et des oiseaux, leur système immunitaire lié à la muqueuse intestinale n'est pas aussi bien structuré et se présente plutôt sous forme diffuse. Chez les poissons téléostéens, des cellules immunes sont observées tout au long de la muqueuse intestinale.

2.3 Tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT)



Organisation spatiale schématique des tissus lymphoïdes associés à la paroi digestive
 www.cuniculture.info - d'après FORTUN-LAMOTHE et BOUILLER (2004)

Figure 6 : Organisation spatiale schématique des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale des mammifères d'après FORTUN-LAMOTHE et BOUILLER (2004).

2.3.1 Les plaques de Peyer

D'une manière générale chez les mammifères, les plaques de Peyer sont composées de larges follicules riches en lymphocytes B, d'une région inter-folliculaire riche en lymphocytes T, de macrophages et de cellules dendritiques. Ces différentes zones, formant le dôme sub-épithélial, sont recouvertes par une monocouche cellulaire appelée épithélium associé aux follicules (FAE). Cet épithélium particulier est composé de cellules M dérivant des entérocytes et spécialisées dans l'échantillonnage d'antigènes du lumen (Debart et al, 2001), d'entérocytes riches en villi et de lymphocytes (Chu et al, 1979 ; Gebert et al., 1994).

Les cellules dendritiques situées dans les plaques de Peyer sont capables de migrer, d'aller acquérir un antigène à la surface baso-latérale des cellules M et ensuite de se déplacer vers la zone inter-folliculaire riche en cellules T pour procéder à la présentation de cet antigène. Les cellules dendritiques sont également capable de migrer vers des sites distants comme les nodules lymphatiques mésentériques et la *lamina propria* (Wilders et al, 1983 ; Wershil et al., 2008). Sous l'influence de signaux cellulaires émis par les lymphocytes T activés et les cellules dendritiques, ainsi que sous l'influence de la production locale de cytokines (TGF- β , IL-10), les lymphocytes B contenus dans les follicules vont se développer en lymphocytes B IgA+. Ces lymphocytes B IgA+ migreront ensuite vers la *lamina propria* pour finir leur maturation et devenir des cellules productrices d'IgA (Fagarasan & Honjo, 2003 ; Wershil et al., 2008). Le nombre et la localisation des plaques de Peyer de l'intestin grêle varient chez les mammifères mais leurs structures et leurs fonctions sont similaires.

Chez le porc, il y a deux catégories de plaques de Peyer : celles distribuées le long du jéjunum et de l'iléum proximal et celles situées à la jonction iléo-caecale. Les premières, dont le nombre est à peu près de 25-35, sont assez petites et restent présentes durant toute la vie des animaux. Chaque petite plaque du jéjunum contient de multiples follicules de lymphocytes B, séparés par une aire inter-folliculaire peuplée de lymphocytes T. L'unique grosse plaque située vers la jonction iléo-caecale peut atteindre jusqu'à 2.5m de long mais régresse à partir de l'âge de 1 an (Stokes et al, 1994) pour finir par former une série de petites plaques alors comparables en tout point à celles du jéjunum (Binns et Licence, 1985 ; Stokes et Bailey, 2000). Mais durant la première année suivant la naissance, la structure, la migration des lymphocytes et leur production diffèrent dans ces deux types de plaques. Par exemple, les pourcentages de lymphocytes B et de lymphocytes T CD2+ sont équivalents dans les petites plaques alors qu'il y a 10 fois plus de cellules B par rapport au T dans la grande plaque (Pabst et al, 1988). Le gros intestin contient également quelques plaques mais en nombre moins important que dans l'intestin grêle (Binns et Licence, 1985 ; Chu and Liu, 1984).

Plusieurs structures lymphoïdes possédant les caractéristiques des plaques de Peyer mammaliennes sont retrouvées tout au long de l'intestin du poulet (Befus et al., 1980). Elles sont formées d'un dôme d'épithélium spécialisé en cellules M, superposé à des follicules structurés avec des aires de cellules B et T bien définies. Bien qu'elles ne soient pas visibles chez le poussin dès l'éclosion, les plaques de Peyer des poulets deviennent visibles à l'œil nu dès la deuxième semaine (Befus et al., 1980 ; Burns, 1982) et augmentent avec l'âge jusqu'au nombre de cinq avant de diminuer à nouveau. Chez le poulet âgé, seule la plaque de Peyer antérieure à la jonction iléo-caecale reste visible. Elle est la plus proéminente et s'élargit encore après plusieurs infections intestinales.

Les poissons téléostéens ne possèdent pas de tissus lymphoïdes organisés associés à l'intestin comme les plaques de Peyer des mammifères et des oiseaux.

2.3.2 La bourse de Fabricius, les amygdales cecales et le diverticule de Meckels

Le poulet, comme tous les oiseaux, possède des structures lymphoïdes supplémentaires par rapport aux mammifères et aux poissons. La bourse de Fabricius, qui est un organe lymphoïde primaire, est également un tissu lymphoïde inducteur de l'immunité intestinale (Muir et al, 2000). Elle se situe dans le cloaque du poulet (et des oiseaux en général) et forme une excroissance épithéliale de tissu lymphoïde qui, comme la moelle osseuse chez les mammifères, joue un rôle important pour la constitution du système immunitaire lors de la phase embryonnaire puisqu'il est responsable de la maturation des lymphocytes B. Plus tard, les antigènes du lumen peuvent également être pris en

charge par cet organe, bien qu'on ne sache pas encore si l'épithélium associé à la bourse de Fabricius contient des cellules M ou non.

Les poulets possèdent également d'autres tissus lymphoïdes uniques associés à la muqueuse intestinale comme les amygdales caecales et le diverticule de Meckels (un dérivé du sac vitellin). Il s'agit de tissus lymphoïdes secondaires recouvert d'un épithélium associé au follicule contenant des cellules M. Les amygdales caecales se situent dans la paroi de la partie proximale de chaque caeca, elles regroupent la majorité des tissus lymphoïdes des caeca (Getty, 1975). L'épithélium associé au follicule des amygdales caecales contient un grand nombre de lymphocyte T CD8+. Des lymphocytes T CD4+ sont présents dans les amygdales caecales, d'abord entre les follicules, puis leur nombre augmente rapidement après l'éclosion. Cependant après 6 semaines les lymphocytes CD8+ sont plus nombreux que les CD4+. La majorité des lymphocytes T expriment les TCR $\alpha\beta$. Les amygdales caecales contiennent également des centres germinatifs et des lymphocytes IgA+.

2.3.3 Les follicules isolés

Les follicules lymphoïdes isolés, bien que structurellement moins définis, sont semblables aux plaques de Peyer. Chez les oiseaux et les mammifères, ils consistent en un épithélium spécialisé contenant des cellules M qui prélèvent le contenu de la lumière intestinale pour le transporter vers les macrophages et les cellules dendritiques sous-jacentes. A proximité de ces cellules on trouve des aires riches en lymphocytes T et B à des degrés d'organisation divers. Ces follicules sont des sites inducteurs de la réponse immune antigénique spécifique (Hamada et al, 2002 ; Del Cacho et al., 1993 ; Kitagawa et al., 1996, 1998).

Chez le porc, une accumulation irrégulière de nodules lymphoïdes est retrouvée vers l'ouverture iléo-caecale. Les follicules lymphoïdes isolés sont présents dans toutes les parties du gros intestin du porc et en plus grand nombre au niveau de la flexion du côlon (Liebler-Tenorio et Pabst, 2006).

De la même manière, les follicules lymphoïdes isolés des poulets sont présents tout au long du petit et du gros intestin avec une plus forte densité dans la région apicale du caecum.

La truite arc-en-ciel ne possède pas de follicules isolés, mais des agrégats lymphoïdes de moindre organisation ont été observés. L'organisation de ceux-ci, hormis les différences de taille, est similaire pour tous les poissons téléostéens. Ils consistent en des accumulations lymphoïdes non encapsulées qui contiennent des lymphocytes, des cellules cytotoxiques naturelles, des macrophages et de cellules plasmiques (Georgopoulous et Vernier, 1986).

2.3.4 L'épithélium intestinal

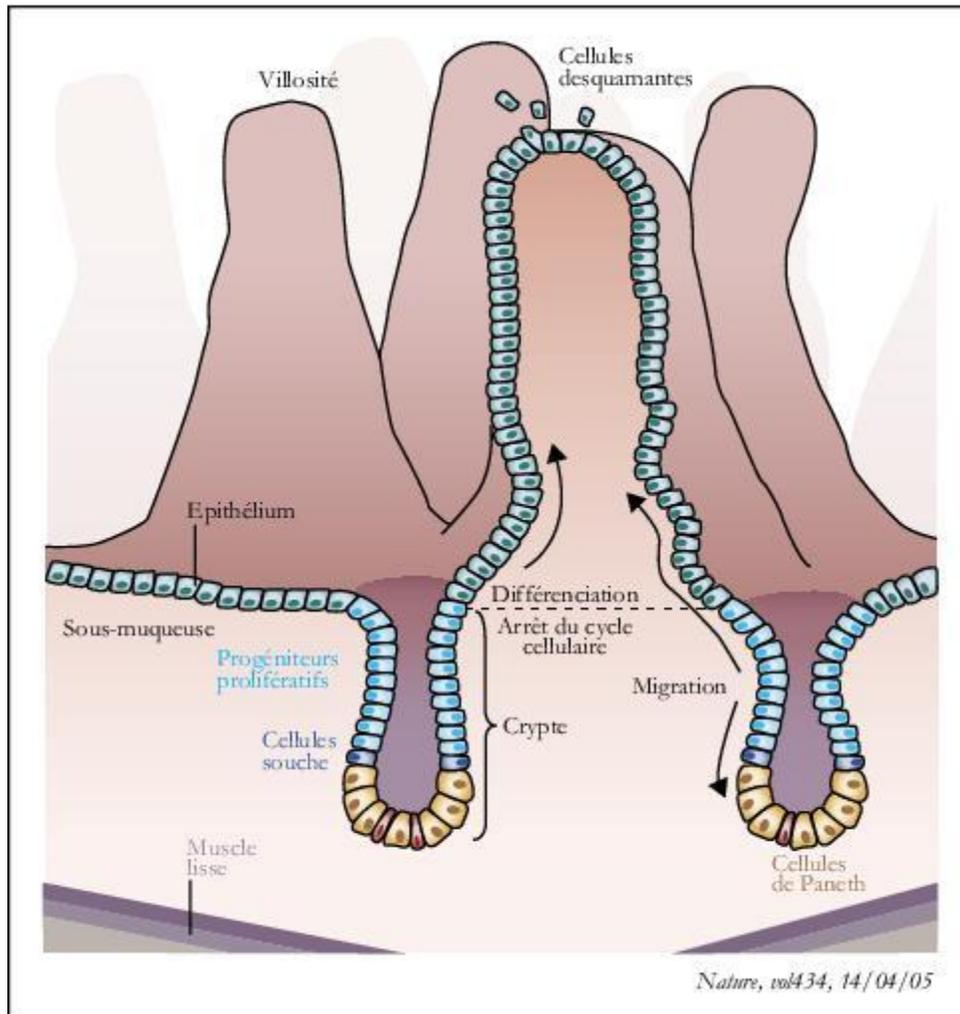


Figure 7 : Schéma représentatif de l'organisation cellulaire de l'épithélium intestinal de l'intestin grêle des mammifères. Celui-ci est organisé en deux compartiments distincts, celui des cryptes qui contient les cellules de Paneth, les cellules souches et les progéniteurs prolifératifs et celui des villi qui contient les cellules différenciées (Reya et Clevers, 2005).

La figure 7 présente la monocouche épithéliale de surface située sous la couche de mucus et qui forme la barrière entre la lumière et la muqueuse intestinale. Cette épithélium de surface est organisé en deux compartiments distincts d'un point de vue morphologique et fonctionnel : la région des cryptes comprenant les cellules de Paneth et les cellules souches, et les villi (intestin grêle) ou replis intestinaux (gros intestin) contenant les cellules épithéliales différenciées. Les jonctions serrées existantes entre les cellules épithéliales adjacentes forment une barrière physique essentielle à la protection contre l'environnement extérieur. Le processus de desquamation continu et de renouvellement de l'épithélium intestinal renforce cette protection. En plus de cette fonction innée importante, les cellules épithéliales sont dotées de fonctions immunologiques incluant la présentation

des antigènes via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et l'aptitude à synthétiser et à sécréter des cytokines inflammatoires et régulatrices. Les cytokines produites par les cellules épithéliales favorisent l'activation des lymphocytes T intra-épithéliaux et des cellules immunes de la *lamina propria* (Lewis et Southern, 2001).

Les fonctions de l'épithélium intestinal sont similaires pour le porc, le poulet et la truite arc-en-ciel, bien que la variété de types cellulaires soit plus restreinte chez cette dernière, par exemple l'épithélium des poissons ne contient pas de cellules M spécialisées. Rombout et al. (1998) ont cependant mis en évidence l'existence d'un système sécrétoire chez les poissons téléostéens. Ils ont démontré que des antigènes solubles ou particulaires pouvaient être absorbés par les cellules épithéliales et transportés vers les macrophages de la muqueuse. Ces cellules épithéliales du second segment de l'intestin postérieur se rapprochent donc des cellules M des mammifères. L'épithélium intestinal des poissons téléostéens contient aussi des macrophages qui peuvent être impliqués dans la présentation d'antigènes (Zapata et al, 1997). Comme ceux présents dans la *lamina propria* et ceux des mammifères, ces macrophages intestinaux sont moins adhérents que ceux retrouvés dans les autres tissus.

En plus des cellules épithéliales, l'épithélium intestinal contient d'autres types cellulaires liés à l'immunité comme par exemple des lymphocytes ou des macrophages. Des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) ainsi que quelques macrophages ont été observés chez le porc, le poulet et la truite arc-en-ciel. Les IELs représentent une population unique de petits et larges lymphocytes dispersés entre les cellules épithéliales sur la membrane basale. Chez les trois espèces, ces lymphocytes sont essentiellement des lymphocytes T (Chu et al, 1979 ; Lillehoj, 1994 ; Picchiatti et al, 1997 ; Bernard et al, 2006). Chez les mammifères ils se différencient de ceux retrouvés dans la partie systémique, en effet la majorité des IEL expriment la protéine de surface CD8 alors que les lymphocytes systémiques se répartissent en une proportion similaire de lymphocytes CD4+ et CD8+. De plus 90% des lymphocytes circulants expriment la forme $\alpha\beta$ du CD8 alors que la majorité des IEL expriment la forme $\alpha\alpha$.

Chez le porc, l'épithélium des villosités est enrichi en lymphocytes T CD8+ (cytotoxiques) en comparaison de celui des cryptes qui contient une quantité similaire de lymphocytes CD8+ et CD4+ (Bianchi et al, 1992 ; Vega-Lopez et al, 1993 ; Olivier et al, 1996).

Les IEL des poulets expriment formes $\gamma\delta$ et/ou $\alpha\beta$ des récepteurs des lymphocytes T (TCR) (Lillehoj, 1994 ; Göbel et al., 2001). Elles expriment surtout la protéine de surface CD8 et une petite population exprime le récepteur $\alpha\beta$ du CD4 (Vervelde and Jeurissen, 1993 ; Lillehoj et al., 2004). La majorité des lymphocytes CD8+ expriment la forme $\alpha\alpha$ du CD8 alors que dans les sites systémiques, comme pour les

mammifères, c'est plutôt la forme $\alpha\beta$ qui est exprimée (Henderson et al., 1999 ; Kogut, 2002 ; Van Immerseel et al., 2002 ; Bar-Shira and Friedman, 2006).

En 2006 une étude de Bernard et al. a mis en évidence que les IEL de la truite arc-en-ciel expriment les transcrits des homologues mammaliens des protéines de surface CD3, CD4, CD8, TCR γ et TCR β , marqueurs caractéristiques des lymphocytes T. Cette observation confirme l'étude de McMillan et Secombes (1997) qui démontrait les propriétés cytotoxiques des IEL de la truite arc-en-ciel vis-à-vis de cellules tumorales de souris.

Quelques soit l'espèce étudiée, toutes les fonctions des IEL ne sont pas encore connues mais plusieurs travaux mettent en évidence le rôle de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans la réponse immune contre certains pathogènes (Cheroutre et al, 2004 ; Chen et al, 2002).

2.3.5 La lamina propria

La *lamina propria* sert de base à la couche épithéliale et se compose d'une large gamme de différents leucocytes. Une population diffuse de lymphocytes B, T, de cellules plasmiques, de macrophages, de « mast cells », de granulocytes et un faible nombre de cellules dendritiques et de neutrophiles aussi bien que des fibroblastes actifs résident dans la *lamina propria*. Après la phase d'induction dans les plaques de Peyer, les lymphocytes B et T matures migrent dans les nodules lymphatiques mésentériques via la circulation lymphatique avant de se loger dans la *lamina propria* (Hokari et al, 2001). De là, les lymphocytes T peuvent directement éliminer les pathogènes et les lymphocytes B et T peuvent participer à la production d'immunoglobulines et de cytokines. La *lamina propria* est également bien vascularisée et densément innervée (Lewis et Southern, 2001). Cette description s'applique aux *lamina propria* du porc et du poulet, avec tout de même quelques spécificités pour chacune des deux espèces.

D'après Vega-Lopez et al (1993), on retrouve plus de macrophages/granulocytes dans la *lamina propria* des cryptes du porc que dans celle des villosités et, de la même manière, il y en a plus dans l'iléum que dans le duodénum. 30% de ces macrophages et granulocytes expriment le récepteur à l'IL-2. Des cellules dendritiques exprimant le CMH de classe II sont retrouvées dans les villosités juste en dessous de la membrane basale et forment une gaine de cellules entre les lymphocytes T CD4+ et CD8+. La *lamina propria* des cryptes abrite une population de lymphocytes T CD4+ et CD8+ similaire à celle des villosités mais par contre possède environ 10 fois plus de lymphocytes B, en majorité IgA+ (Olivier et al, 1996). Stokes et Bailey (2000) ont émis l'hypothèse que la fonction des lymphocytes T de la *lamina propria* serait plutôt de maintenir l'homéostasie intestinale, en créant un environnement (production

d'IL-4 et non d'IL-2) favorisant la tolérance vis à vis des antigènes normalement présents dans le lumen.

Les leucocytes présents dans la *lamina propria* du poulet sont composés de 80% de lymphocytes, 20% de macrophages et moins de 1% de leucocytes polymorphonucléaires (Befus et al, 1980). Au contraire des populations d'IEL, les lymphocytes T de la *lamina propria* du poulet contiennent une petite proportion de lymphocytes T exprimant la forme $\gamma\delta$ du TCR (env.10%) et beaucoup de lymphocytes T exprimant la forme $\alpha\beta$. De la même façon, ces cellules expriment majoritairement le récepteur CD4 et plus faiblement le CD8. La *lamina propria* du poulet contient également une population de cellules tueuses naturelles ou « natural killer » (NK) mais en proportion relativement faible par rapport aux lymphocytes T. Comme chez le porc, la majorité des lymphocytes B présents dans la *lamina propria* du poulet sont des lymphocytes B IgA+ (Lebacqz-Verheyden et al., 1972 ; Bienenstock et al., 1973 ; Mockett, 1986).

Chez la truite arc-en-ciel comme pour d'autres poissons téléostéens la plupart des différents types de cellules immunes sont présents dans la *lamina propria* (McMillan et Secombes, 1997). Hébert et al (2002) ont illustré grâce à une étude histologique la composition cellulaire des différents segments intestinaux du poisson chat, *Ictalurus punctatus*, comprenant des lymphocytes B et T, des cellules cytotoxiques naturelles, des macrophages et des granulocytes. Cette étude, ainsi que d'autres réalisées sur la carpe, ont montré que ces cellules sont dispersées tout au long de l'intestin mais semblent toutefois en plus forte concentration au niveau de la *lamina propria* du segment médian de l'intestin. La majorité des lymphocytes de la *lamina propria* sont des lymphocytes B ou des cellules plasmiques (Rombout et al, 1993 ; Fournier-Betz et al, 2000). Concernant la truite arc-en-ciel, il n'y a pour l'instant aucune étude équivalente ciblant uniquement les cellules de la *lamina propria*, il donc est difficile de dresser une caractérisation précise des cellules et plus particulièrement des types de lymphocytes présents spécifiquement dans ce compartiment.

III. Fonctions cellulaires et moléculaires de la réponse immune

La réponse immune intestinale peut être divisée en deux, l'immunité non spécifique et l'immunité spécifique qui coopèrent pour atteindre un niveau de protection optimal contre les antigènes alimentaires et les infections par des pathogènes. Les défenses non spécifiques sont principalement formées par les cellules cytotoxiques naturelles, les granulocytes et macrophages et leurs produits sécrétés comme les dérivés oxygénés et les cytokines. Elles se mettent en place immédiatement après la phase d'infection et jouent un rôle important en limitant l'établissement et la propagation de l'infection. Les macrophages et les granulocytes vont jouer un rôle de cellules effectrices pour les cellules de la réponse spécifique soit en exprimant des motifs antigéniques à leur surface, soit en

produisant des cytokines. La réponse spécifique se compose de la réponse humorale (production d'anticorps par les lymphocytes B et les plasmocytes) et de la réponse cellulaire (lymphocytes T « helper » et cytotoxiques).

3.1 La réponse immune non spécifique

3.1.1 Les fonctions des phagocytes

Les phagocytes mononucléaires ou monocytes dérivent des cellules souches de la moelle osseuse et ont pour fonction la capture des particules, leur ingestion et leur destruction. Les monocytes migrent du sang dans les tissus où ils se différencient en macrophages tissulaires particulièrement efficaces dans la présentation des antigènes aux cellules T. Les polymorphonucléaires neutrophiles dérivent également des cellules souches hématopoïétiques et représentent la majorité des leucocytes sanguins. Comme les monocytes, les neutrophiles migrent dans les tissus, en particulier dans les foyers inflammatoires. A la différence des macrophages, les neutrophiles ont une vie brève et meurent après avoir exercé leurs activités de phagocytose et de lyse.

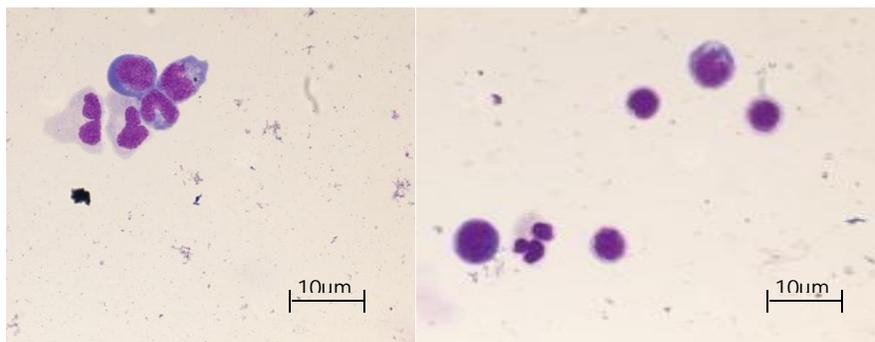


Figure n°8 : Observation au microscope optique de monocytes et granulocytes provenant d'une suspension de leucocytes intestinaux de truite arc-en-ciel (grossissement x100 sous immersion, coloration de May-Grünwald / Giemsa).

Du fait de la difficulté d'isoler ces cellules au niveau intestinal, peu d'études ont été menées sur les fonctions cellulaires des phagocytes intestinaux des cochons et des poulets. En 2000, les résultats de Haverson et al. suggèrent une activité de phagocytose chez des cellules dendritiques immatures de la *lamina propria* du porc. Vervelde et al. ont montré en 1996 que des poulets infectés avec *E. tenella* possèdent plus leucocytes dans leur *lamina propria* par rapport à des poulets sains, et que la majorité de ces leucocytes sont des macrophages et des lymphocytes T. Plus récemment, en 2007 Van Hemert et al. ont mesuré l'activité de phagocytose des macrophages intestinaux des poulets contre des bactéries vivantes mettant ainsi en évidence l'activité biologique de ces cellules chez le poulet. Concernant les macrophages présents dans la muqueuse intestinale de la truite arc-en-ciel, différents

auteurs ont illustré une activité de phagocytose *in vitro* contre des microsphères de latex fluorescentes, des levures ou encore des bactéries vivantes ou inactivées marquées en radioactivité (Davidson and al, 1991; Clerton et al, 2001; Balcazar et al, 2006). En 2001, Clerton et al. ont mesuré la flambée respiratoire produites pas les leucocytes intestinaux après stimulation de ces cellules avec du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) mais cette réponse reste très faible par rapport à celle enregistrée avec les leucocytes systémiques de la même espèce.

3.1.2 Les cytokines inflammatoires

De nombreuses cytokines sont retrouvées au sein des foyers inflammatoires. Deux d'entre elles, l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le « tumor necrosis factor alpha » (TNF- α), jouent un rôle majeur dans l'orchestration de l'inflammation. Sous leur action, de nombreuses cellules produisent des médiateurs lipidiques, des enzymes protéolytiques et des radicaux libres, autant de facteurs directement responsables des effets délétères observés sur les pathogènes. Des cytokines, telles que l'interféron- γ (IFN γ), l'IL-3 ou le « granulocyte-macrophage colony stimulating factor » amplifient la réponse inflammatoire en augmentant les productions d'IL-1 β et de TNF- α par les macrophages. Ces derniers sont également à l'origine de la production d'autres cytokines, dites « chimiokines », comme l'IL-8 et le « macrophage chemoattractant protein-1 » qui, par leurs propriétés chimiotactiques, participent au recrutement des leucocytes au sein du foyer inflammatoire. L'IL-6, très abondante lors des processus inflammatoires, induit la production par les hépatocytes des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Il en est de même de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IL-11, du « leukemia inhibitory factor » ou du « transforming growth factor- β » (TGF- β). Ce dernier possède en outre certaines activités anti-inflammatoires et peut, tout comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, inhiber les productions d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α . Dans une moindre mesure, l'interféron- α (IFN- α) possède également cette potentialité. Ces cytokines anti-inflammatoires sont également capables de réprimer certaines des activités pro-inflammatoires de l'IL-1 β et du TNF- α comme, par exemple, l'induction du facteur tissulaire favorisant le processus de la coagulation. En outre, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF β ont la capacité d'induire la production de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 qui s'oppose aux activités induites par l'IL-1. Les inhibiteurs naturels du TNF- α sont essentiellement les formes solubles des récepteurs du TNF- α dont la libération est accrue au cours de l'inflammation. Les glucocorticoïdes ont également la potentialité de limiter la production des cytokines pro-inflammatoires (Cavaillon, 1995). Les glucocorticoïdes peuvent être produits à la suite d'une cascade d'événements enclenchée par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 impliquant l'axe neuroendocrinien. Ainsi, la notion du « réseau des cytokines », schématisé dans la figure 9, illustre parfaitement la participation de ces médiateurs au cours des mécanismes inflammatoires.

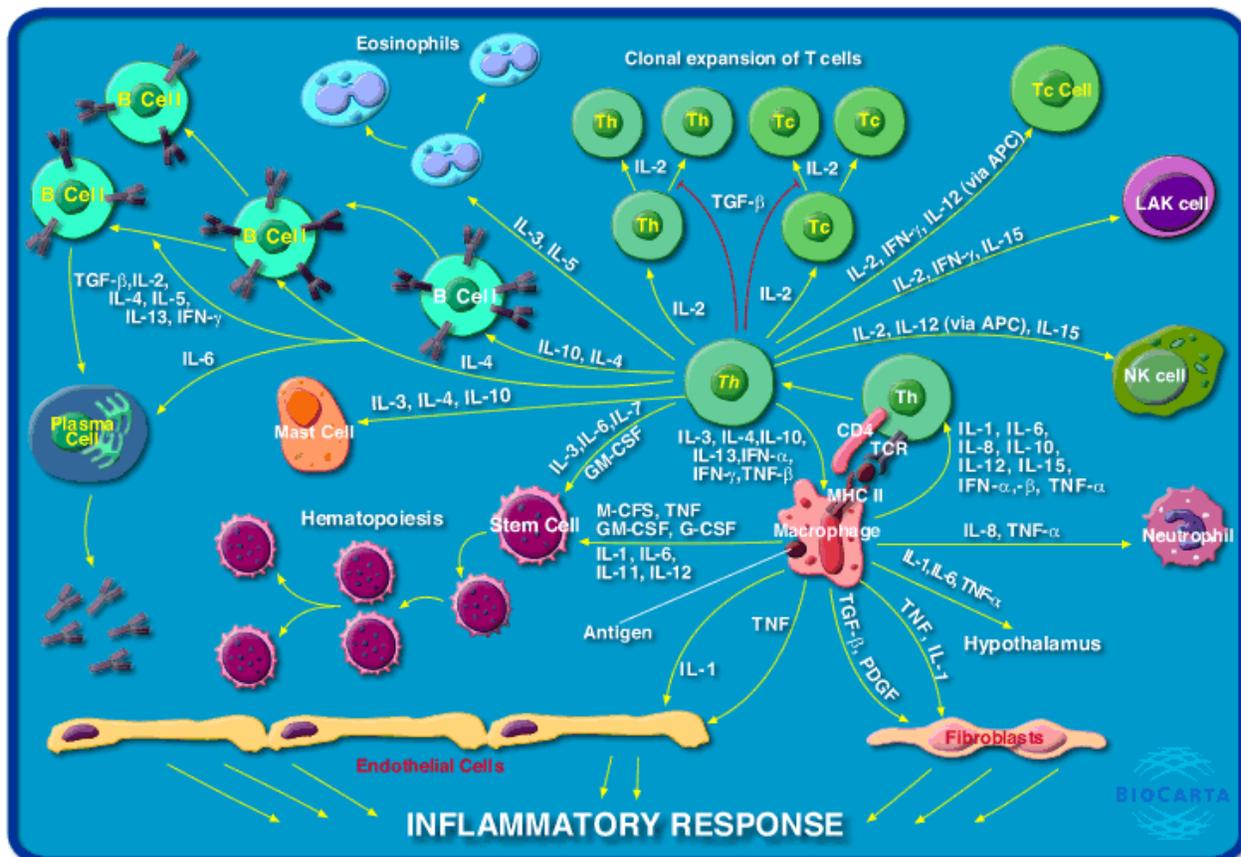


Figure 9 : Représentation schématique des interactions survenant entre les cytokines et les cellules lors de la réponse inflammatoire chez la souris. Schéma réalisé par Shih Michael (PhD) pour le site internet Biocarta.

Plusieurs cytokines liées à l'inflammation ont été depuis longtemps clonées chez le porc, dont le $TNF-\alpha$ (Pauli et al., 1989 ; Choi et al., 1991 ; Kuhnert et al., 1991), l' $IL-1\beta$ (Huether et al., 1993) et l' $IL-8$ (Goodman et al., 1992 ; Lin et al., 1994). Les actions de ces cytokines au niveau systémique sont équivalentes à celles observées chez l'humain et ont été décrites par de nombreux auteurs dont Murtaugh qui a résumé en 1994 les principaux travaux effectués sur ces cytokines chez le porc. La production de ces trois cytokines a été aussi étudiée au niveau intestinal. Hyland et al. (2006 a et b) ont décrit une augmentation de l'expression de l' $IL-1\beta$ et de l' $IL-8$ dans les plaques de Peyer distales de l'iléum et du jéjunum après une infection par *Salmonella enterica* alors que le niveau d'expression de $TNF-\alpha$ ne change pas.

Un orthologue de $IL-1\beta$ des mammifères aux propriétés similaires a été mis en évidence chez le poulet (Hayari et al., 1982 ; Weining et al., 1998). La chemokine $IL-8$ a été découverte chez le poulet en 1987 par Bedard et al. et son homologie avec l' $IL-8$ mammalienne a été confirmée par Kaiser et al. en 1999. De plus, plusieurs études ont démontré que les macrophages de poulets étaient capables de sécréter un facteur ayant une activité comparable à celle du $TNF-\alpha$ des mammifères (Byrnes et al., 1993 ; Zhang et al., 1995a ; Zhang et al., 1995b). D'autres travaux ont également illustré une augmentation de

la production du facteur de modulation du TNF- α chez le poulet en même temps qu'une augmentation de la production de cytokines inflammatoires et qu'une prédominance de la réponse non spécifique après une exposition aux espèces bactériennes *Emericia*, *Salmonella* et *Clostridium perfringens* qui pourrait suggérer l'initiation d'une réponse de type TNF- α chez le poulet. (Carvajal et al., 2008 ; Hong et al., 2006 ; Kim et al., 2008 ; Park et al., 2008, Lu et al. 2009). Mais jusqu'à présent l'homologue du TNF- α n'a encore été cloné chez le poulet. Au niveau intestinal, il a été démontré que le niveau d'expression d'IL-8 et d'IL-1 β augmentait après une infection avec *Salmonella* (Whithanage et al., 2004) et dans les IEL après une infection par *Emericia maxima* (Hong et al. 2006). De la même façon, l'expression de l'IL-8 et de l'homologue du facteur d'induction de TNF- α augmentent dans l'ileum de poulets infectés par *Clostridium perfringens* (Lu et al., 2009). Ces résultats semblent donc confirmer que, comme pour les mammifères, IL-1 β , IL-8 et l'homologue du facteur d'induction de TNF- α ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse inflammatoire du poulet au niveau intestinal.

Plusieurs cytokines ont été identifiées par biologie moléculaire chez les poissons téléostéens au cours des dernières années : l'IL-1 β , le TNF- α , l'IFN, le TGF- β , l'IL-8, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-21 ainsi que la première cytokine non mammalienne : l'IL-11, mise en évidence chez la truite arc-en-ciel. Comme pour les mammifères, IL-1 β , IL-8 et TNF- α sont des cytokines inflammatoires généralement induites dans les phases précoces de la réponse immune (Secombes et al, 2001). Secombes et al. (1999) ont montré que la stimulation des leucocytes *in vitro* de la truite arc-en-ciel avec les mitogènes PHA (phytohemagglutinin lectin) ou LPS (lipopolysaccharide), deux mitogènes stimulant respectivement la prolifération des lymphocytes T et B, augmente l'expression de l'IL-1 β . Plus tard en 2001, Qin et al. ont montré, également chez la truite arc-en-ciel, qu'une protéine de type TNF- α aurait le potentiel d'induire l'apoptose, la migration des neutrophiles ainsi que la flambée respiratoire des macrophages. Malgré cela, encore peu de chose sont connues sur l'expression des cytokines dans l'intestin des poissons. Mulder et al. (2007) ont mis en évidence par PCR en temps réel la surexpression des gènes codant pour l'IL-1 β , le TNF- α 2, l'IFN- γ et l'IL-8 dans l'intestin proximal de la truite lors d'une infection par la bactérie gram- *Aeromonas salmonicida*. Cette découverte a été ensuite confirmée par l'étude de Komatsu et al. en 2009 qui ont également démontré, via la même technique, que l'IL-1 β , TNF- α 2, IL-8, mais également IL-10, IL-11, IL-15, IL-16, IL-18 et TGF- β sont produits par les cellules de l'épithélium intestinal de la truite infectée par *A. salmonicida*. De plus, la plupart de ces cytokines possèdent un haut degré d'homologie avec leurs orthologues mammaliennes (Secombes et al, 2001) ce qui peut suggérer une similarité également d'un point de vue fonctionnel (Du-Hyung et al., 2006).

3.1.3 Le réponse cytotoxique naturelle non spécifique

La cytotoxicité naturelle est un terme appliqué aux cellules immunitaires qui sont capables, sans reconnaissance spécifique préalable, de tuer différents pathogènes ou des cellules transformées ou infectées. Les lignées de cellules immunitaires qui ont cette fonctionnalité sont les cellules tueuses naturelles ou NK chez les mammifères et les oiseaux et les cellules cytotoxiques naturelles (NCC) chez les poissons. Au niveau systémique, les propriétés cytotoxiques des NCC sont comparables à celles des cellules NK des mammifères et sont sans doute leur précurseur dans l'évolution (Yoder, 2004). Les NCC, à l'opposé des NK, ne contiennent pas de granules intra-cytoplasmiques de grande taille et sont morphologiquement plus petites.

Chez le porc, l'étude de Wilson et Bourne réalisée en 1986a semblent indiquer que les IEL ne contiennent pas de population cellulaire exprimant des caractéristiques des NK. Effectivement ils n'ont obtenu aucun pourcentage de lyse naturelle avec leur essai au chrome 51 sur 16h utilisant la lignée humaine K562 en cellules cibles. Par contre ils ont détecté une forte réponse lorsque la réponse cytotoxique était enregistrée en présence de PHA-P, il semble donc probable que cette cytotoxicité soit due aux lymphocytes T cytotoxiques chez le porc.

Au contraire, une activité cytotoxique naturelle a été observée chez le poulet. Lillehoj et Chai ont démontré pour la première fois en 1988 que les IELs de poulet contenaient une population de lymphocytes ayant les propriétés cytotoxiques vis à vis de lignées cellulaires tumorales de poulet similaires aux NK. Il semblerait aussi que l'activité de ces cellules soit supérieure dans le jejunum et l'ileum par rapport au ceacum. L'ensemble de leurs conclusions suggèrent donc fortement que ces cellules sont des NK.

Chez la truite arc-en-ciel, à l'instar de ce qui est observé chez les mammifères et oiseaux, il demeure difficile d'associer l'activité de NCC des leucocytes de poissons à une population cellulaire d'origine précise. Certaines études ont mis en évidence au niveau intestinal la fonction cytotoxique naturelle non spécifique chez la truite arc-en-ciel. McMillan et Secombes (1997) ont mesuré une réponse cytotoxique non spécifique des IEL de la truite arc-en-ciel contre la lignée cellulaire EL4 de souris. De la même manière Zhang et al. (2001) ont démontré que la truite arc-en-ciel exprime le gène NKEF qui est en fait un facteur qui renforce l'action des cellules tueuses naturelles chez les mammifères.

3.2 La réponse immune spécifique

3.2.1 Les lymphocytes T et les voies Th1/Th2

Les lymphocytes T sont composés de plusieurs populations cellulaires ayant des fonctions différentes. Ces cellules se différencient dans le thymus en 2 types distincts : les lymphocytes T helper ou auxiliaires exprimant le marqueur CD4 et les lymphocytes T cytotoxiques exprimant le marqueur CD8 à leur surface. Ces cellules reconnaissent leur antigène grâce à un récepteur spécifique, le TCR, associé à une molécule CD3 impliquée dans la transduction du signal. Les lymphocytes T helper (Th) ont pour rôle d'orienter la réponse immunitaire en l'adaptant à la nature de l'agent pathogène afin de la rendre plus efficace. Cette orientation se fait par le biais de la sécrétion de cytokines qui activeront les cellules effectrices les plus adaptées à la défense de l'organisme. Chez les mammifères, 4 principales sous populations différentes de lymphocytes Th ont été caractérisées: les Th1, Th2, Th17 et Trégradeurs (Treg). Après avoir été activées par les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes Th régulent les réponses immunes via la synthèse de cytokines qui sont propres à chaque sous population. Comme le résume la figure 10, l'activation des lymphocytes Th1 conduit à la production de cytokines 'pro-inflammatoires' comme l'IL-2 et l'IFN- γ (Cavaillon 2001), qui induiront des réponses cellulaires mettant en jeu les macrophages et les lymphocytes cytotoxiques et la production de certains isotypes d'anticorps. Au cours d'une infection virale par exemple, les lymphocytes cytotoxiques, activés par certaines cytokines produites par les lymphocytes Th1, vont acquérir une compétence cytolytique qui leurs permettra de tuer les cellules infectées. L'activation des lymphocytes Th2 conduit à la sécrétion de cytokines 'anti-inflammatoires' comme l'II-4, l'II-5, l'II-10, l'II-13 et induiront des réponses humorales, avec maturation centrale de lymphocytes B sécrétant des anticorps IgG, IgA, ou IgE.

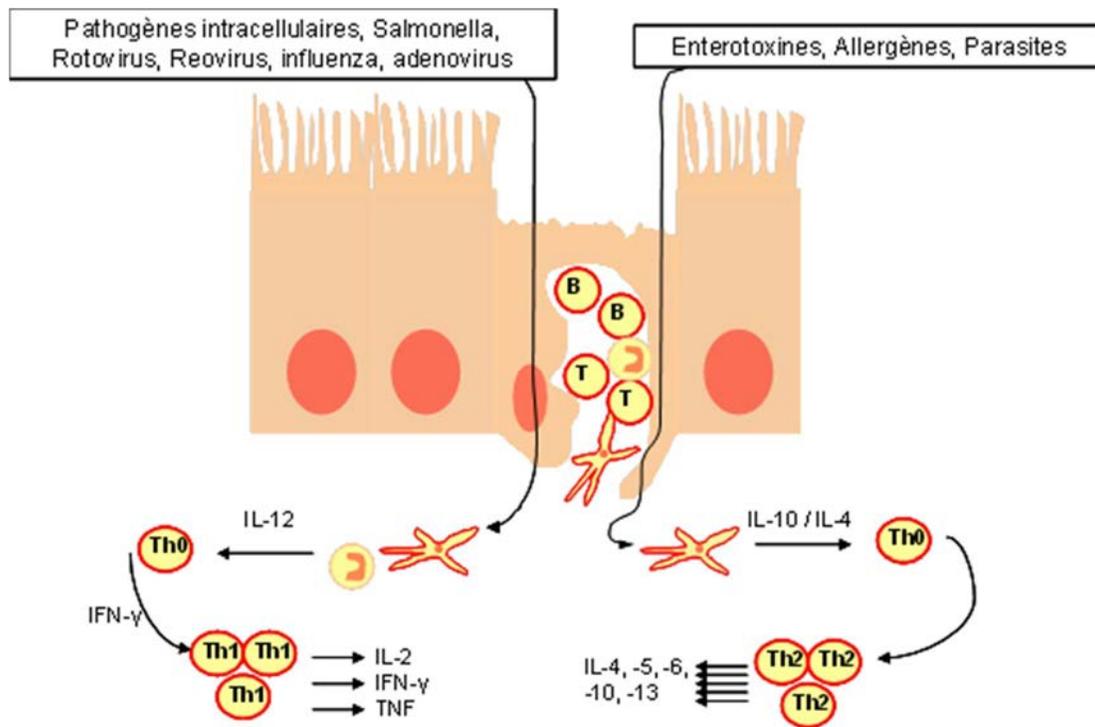


Figure 10 : Schéma illustrant l'activation des voies Th1 ou Th2 au niveau intestinal. En fonction de la provenance de l'antigène exprimé à la surface des CPA, les cellules T inactivées vont se tourner soit vers la voie Th1 ou soit vers la voie Th2. La voie Th1 et la production des cytokines pro-inflammatoires induiront des réponses cellulaires alors que la voie Th2 conduit à la sécrétion de cytokines 'anti-inflammatoires' et à des réponses humorales. (Source personnelle)

Les cellules Th17 jouent un rôle essentiel dans la protection contre certains pathogènes extracellulaires non correctement éliminés par les types Th1 et Th2. Enfin, les lymphocytes T régulateurs produisent de forte quantité de cytokine IL10 dont le rôle essentiel est de diminuer l'activation des cellules effectrices et donc de réguler la réponse immunitaire.

Chez le porc, la mise en place de la réponse Th1 ou Th2 dans les tissus intestinaux semble dépendre du type d'antigène pénétrant la muqueuse (Bailey, 2009). Des études de PCR en temps réel réalisées sur plusieurs gènes liés à la réponse immune montrent par exemple une sur-régulation des gènes liés aux Th1 (T-bet inclus) dans les tissus intestinaux lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* et des gènes liés aux Th2 lors d'une infection par *Trichuris suis* (Dawson et al., 2005 ; Kringel et al., 2006). Peu d'études ont pour l'instant été réalisées concernant les sous-populations Th17 et Treg décrites chez la souris (Bailey, 2009), néanmoins l'IL-17 a été clonée chez le porc et semble s'exprimer fortement dans les tissus muqueux, ce qui suggère la présence d'une fonction de type TH17 chez cet animal (Katoh et al. 2004).

Des réponses de type Th1 et Th2 ont également été mise en évidence chez le poulet. Il a été démontré que le niveau d'expression des cytokines Th1 augmentait dans les IEL de poulet après une première infection par *Eimeria maxima*. Dans une moindre mesure, le niveau d'expression des cytokines Th2 augmente également après la première infection alors que lors d'une seconde infection par *E. maxima* seule la cytokine, de type Th2, voit son expression augmenter (Hong et al. 2006). Ces résultats suggèrent une prédominance de la réponse Th1 lors d'une première infection par ce parasite. Crhanova et al. (2011) ont également démontré qu'une infection par *Salmonella enterica* induisait une production d'IL-17 chez les poulets âgés de 16 jours ce qui suggère l'existence d'une réponse de type Th17 chez cet animal. De la même manière Shanmugasundaram et Selvaraj (2011) ont démontré des propriétés des cellules Treg chez les cellules CD4+CD25+ du poulet.

A ce jour très peu d'études ont été réalisées chez la truite arc-en-ciel. Il a néanmoins été démontré par le biais de l'augmentation de l'expression de marqueurs spécifiques des lymphocytes T que l'intestin de la truite arc-en-ciel contenait une importante population de lymphocytes T (Bernard et al., 2006 ; Wang et al., 2010 ; Takizawa et al., 2011). La plupart de ceux-ci expriment le marqueur CD8 (Takizawa et al., 2011). De plus, Wang et al. (2010) et Takizawa et al. (2011) ont récemment démontré l'existence des facteurs de transcription T-bet et GATA3 chez la truite arc-en-ciel, suggérant ainsi l'existence de cellules Th1 et Th2 chez ce poisson.

3.2.2 Les lymphocyte B et la réponse anticorps IgA+

Les lymphocytes B expriment à leur surface un récepteur d'antigène, le BCR, qui est une immunoglobuline membranaire. Lorsqu'un antigène se fixe pour la première fois sur son récepteur, l'immunoglobuline membranaire d'une cellule B naïve (qui n'a jamais été en contact avec son antigène) ce lymphocyte va alors, à l'aide des cytokines des lymphocytes Th ayant eux-mêmes reconnu l'antigène, s'activer, se multiplier et se différencier en cellule sécrétrice d'anticorps appelée plasmocyte et en cellule mémoire à longue durée de vie dans l'organisme. En fonction de la nature de l'antigène et de son lieu de pénétration dans l'organisme, les lymphocytes B vont pouvoir changer l'isotype de l'immunoglobuline afin de conférer à cet anticorps les propriétés les plus efficaces pour la défense de l'organisme. L'ensemble de ces réactions se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou encore les plaques de Peyer par exemple. Lorsque l'antigène pénètre par les muqueuses, qui représentent la principale voie d'entrée dans l'organisme, l'isotype d'anticorps le plus approprié est A. L'IgA existe sous deux formes, la forme monomérique présente dans le sérum et la forme dimérique dans les muqueuses. Comme illustré dans la figure 11, l'IgA produite par les plasmocytes dans la muqueuse est un dimère formé de deux molécules d'anticorps unies par une chaîne polypeptidique. Sous cette forme elle traverse la *lamina propria* pour atteindre la partie latéro-basale des cellules épithéliales. C'est à ce niveau qu'elle va se

fixer sur la pièce sécrétoire qui est un récepteur de nature glycoprotéique et de ce fait devenir l'IgA de sécrétion. Sous cette forme elle est endocytée par la cellule épithéliale et ensuite exocytée vers le lumen où elle aura de nombreuses fonctions servant à prévenir le franchissement de la barrière épithéliale par des agents infectieux comme des bactéries ou des virus. Sa résistance très efficace aux enzymes protéolytiques est due à la pièce sécrétoire.

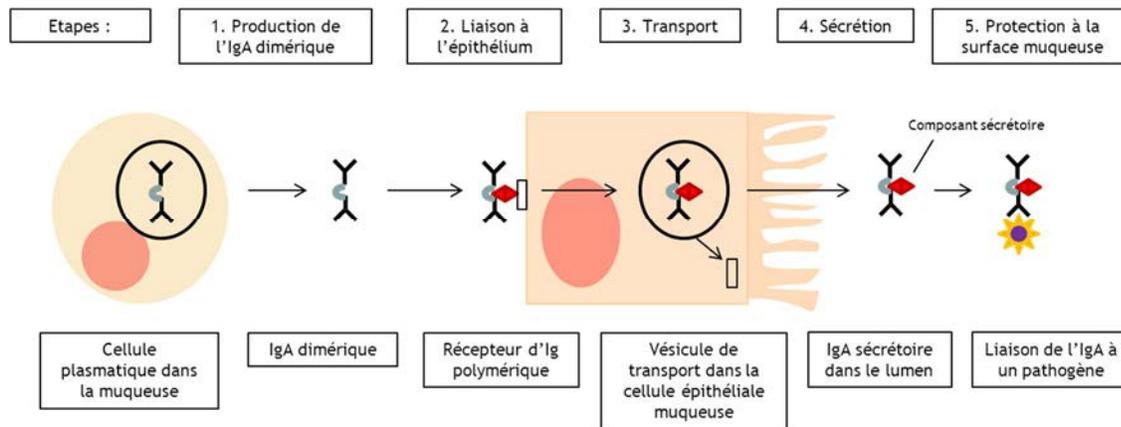


Figure 11 : Figure schématique des différentes étapes allant de la production des IgA par les cellules plasmatiques à la sécrétion de celles-ci en vue d'une protection de la muqueuse face aux antigènes du lumen. (Source personnelle)

La structure et la séquence de l'IgA du porc, à l'exception de la région charnière, sont homologues à celles de l'IgA humaine (Brown et Butler, 1994 ; Brown et al., 1995). Le rôle central des IgA dans la protection de la surface muqueuse repose sur l'existence d'un mécanisme actif permettant le transport des IgA au travers de la barrière épithéliale dans les sécrétions muqueuses. Ce mécanisme de translocation dépend de l'interaction de l'IgA avec une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans la surface basolatérale des cellules épithéliales (pIgR). Cette glycoprotéine a été clonée chez le porc à partir de la librairie d'ADNc du petit intestin (Wintero et al., 1996). L'IgA est également retrouvée dans le sérum et alors que les IgAs servent de première ligne de défense pour limiter l'invasion des pathogènes, les IgA du sérum servent plutôt de seconde ligne de défense en éliminant les pathogènes qui ont réussi à traverser la paroi épithéliale (Otten et Van Egmond, 2004). Les IgAs peuvent former un complexe avec les pathogènes présents localement dans les tissus sous-jacents qui pourront ensuite être pris en charge par les phagocytes, être absorbés par le système vasculaire ou être transportés dans le lumen. Les IgAs peuvent aussi interférer avec la capacité qu'ont les antigènes (virus, bactéries, toxines) à adhérer et à pénétrer la muqueuse. Ce phénomène est appelé exclusion immunitaire et repose sur la nature polymérique de l'IgAs (Brantzaeg et Johansen, 2003 ; Snoeck et al. 2006). Enfin, les IgAs peuvent directement bloquer le site microbien qui régit l'attachement à l'épithélium. Bien que l'isotype A soit le plus abondant dans la muqueuse, les autres isotypes (M, G ou E) sont aussi produits localement dans de petites proportions qui peuvent augmenter lors d'une inflammation ou d'une maladie (Macpherson et al., 1996). Chez le porc, à la différence de ce qui est observé chez d'autres

mammifères, à la fois IgA et IgM sont importantes dans les organes lymphoïdes muqueux surtout chez les jeunes porcs (Snoeck et al., 2006).

Chez le poulet IgA et IgM sont les Igs prédominantes retrouvées dans les sécrétions intestinales. D'un point de vue fonctionnel il semblerait qu'elles soient homologues à celles existantes chez les mammifères et un homologue du composant sécrétoire mammalien a également été décrit chez le poulet (Lillehoj et Trout, 1996 ; Peppard et al., 1983). Il semble donc que les Ig présentes dans le système immunitaire intestinal des poulets aient un rôle similaire à celles des mammifères. Un grand nombre d'études ont en effet démontré la sécrétion d'IgAs dans l'intestin en réponse à la présence d'antigènes incluant *Escherichia coli* (Parry et al., 1977), *Salmonella typhimurium* (Brito et al., 1993 ; Muir et al., 1998), *Campylobacter jejuni* (Noor et al., 1995 ; Widders et al., 1996) et *Eimeria tenella* (Trees et al., 1989 ; Vervelde et al., 1992) à la surface intestinale.

A la différence des mammifères et des oiseaux, les poissons téléostéens sont dépourvus d'IgA ou d'un équivalent fonctionnel et de ce fait l'IgM a été considérée longtemps comme étant le seul anticorps fonctionnel présent à la fois dans la partie systémique et dans la partie muqueuse (Solem et Stenvik, 2006 ; Zapata et Amemiya, 2000). Cependant, en 2005, Hansen et al. en analysant le génome de poissons téléostéens ont découvert un nouvel isotype d'immunoglobuline, l'IgT. Plus tard en 2010, Zhang et al. ont caractérisé cette nouvelle immunoglobuline chez la truite arc-en-ciel. Ils ont ainsi montré qu'elle était plus exprimée dans l'intestin que dans le sérum et que la forme retrouvée dans l'intestin était polymérique. Ils ont également mis en évidence une nouvelle lignée de lymphocytes B exprimant uniquement IgT en surface et ont démontré que cette lignée représentait la majorité des lymphocytes B de la muqueuse intestinale. D'un point de vue fonctionnel, ils ont observé que lors d'une infection avec le parasite *Ceratomyxa shasta* une réponse IgT localisée uniquement dans la muqueuse intestinale de la truite alors que les IgM apparaissaient dans le sérum. Ils ont également démontrés qu'à l'instar des IgA, les IgT recouvraient les bactéries présentes dans le lumen et ainsi prévenaient l'invasion de celles-ci au travers de la paroi intestinale. Il semble donc que les IgA et les IgT, bien qu'étant distantes au niveau phylogénétique, soient similaires d'un point de vue fonctionnel.

3.2.3 La réponse proliférative des lymphocytes *in vitro*

Des lymphocytes sont observés à la fois dans l'épithélium et dans la *lamina propria* de l'intestin. Lorsque les lymphocytes sont activés par l'arrivée d'un antigène, la première phase de la mise en place de la réponse spécifique passe par une prolifération des lymphocytes. Afin de mieux caractériser les fonctions des lymphocytes du GALT, plusieurs études ont consisté à mettre en évidence la réponse de lymphocytes à différents mitogènes *in vitro*.

Chez le porc, l'équipe de Wislon et al. (1986) a mis en évidence que les IEL du petit intestin montraient une réponse proliférative forte lorsqu'ils étaient cultivés en présence des mitogènes PHA-P (phytohaemagglutinine P), Con-A (Concanavoline A) et PWM (mitogène Pokeweed). Comme son nom l'indique, un mitogène est une substance chimique encourageant la prolifération cellulaire en provoquant la mitose de ces cellules. Pour cela ils activent un signal de transduction impliquant la protéine kinase « mitogène activated » (MAPK) qui conduira à la mitose cellulaire. Plusieurs composés sont connus pour leurs effets mitogénique, parmi eux les lectines PHA-P et Con-A sont reconnues comme activateur de la prolifération des lymphocytes T, le lipopolysaccharide (LPS, composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) est connu pour activer les lymphocytes B et le PWM est une substance dérivée de *Phytolacca americana* qui agit comme une lectine et qui est connu pour induire la prolifération des lymphocytes T et B. En 1987, Henri Salmon a également mis en évidence cette réponse proliférative en démontrant que les IELs de porcs répondaient mieux à la PHA-P qu'à la Con A. Ces résultats sont surprenants car des expériences similaires menées chez des mammifères tels que le rat, la souris ou l'humain ont montré que les IELs ne répondent pas du tout aux mitogènes (Greenwood et al, 1983 ; Nauss et al, 1984). Sydora et al. (1993) ont montré que les IEL de la souris ne répondaient pas aux stimulations mitogéniques bien qu'une réponse proliférative semble pouvoir être obtenue lorsque les IELs sont cultivés avec des anticorps monoclonaux anti-TCR (CD3, $\alpha\beta$, $\gamma\delta$). Il semblerait que les cytokines produites par les cellules épithéliales soient nécessaires à la survie et à la prolifération des IELs *in vitro* (Brunner et al., 2001). Concernant les lymphocytes de la *lamina propria*, Bailey et al. (1994) ont montré que ces lymphocytes avaient une réponse proliférative moindre que celle des lymphocytes de la rate en présence de Con-A. Plus récemment, Vijiuk et al. (2002) ont montré que les lymphocytes provenant des plaques de Peyer de l'ileum de porcs âgés de 4 semaines ne répondaient pas aux stimulations mitogéniques (PHA-P, LPS : mitogène des lymphocytes B et PWM) alors que les lymphocytes de la *lamina propria* du jejunum proliféraient en présence de LPS et dans une moindre mesure de PHA-P.

Agrawal et Reynolds ont mis en évidence en 1997 la réponse proliférative des IEL du poulet cultivés *in vitro* avec des mitogènes des lymphocytes T (Con-A et PHA-P), par contre aucune réponse n'a été enregistrée avec le LPS confirmant la forte proportion de lymphocytes T dans les IEL. Cette étude est en opposition avec celle réalisée précédemment par Arnaud-Battandier et al. (1980) qui démontrait

que ni les lymphocytes de la *lamina propria*, ni ceux de l'épithélium du poulet ne répondaient aux stimulations avec des mitogènes de lymphocytes B et T. Cependant Agrawal et Reynolds (1997), avec une méthode colorimétrique utilisant le MTT (substrat d'une enzyme mitochondriale), ont nuancé leurs résultats en admettant que bien qu'obtenant des indices de prolifération similaires entre les IELs et les lymphocytes du sang périphérique, les densités optiques mesurées pour les cultures d'IELs étaient 20 à 50 fois inférieures à celles obtenues avec les lymphocytes du sang périphérique ce qui dénote une plus faible activité cellulaire des IELs.

Jusqu'à aujourd'hui aucune étude *in vitro* n'a été menée concernant la prolifération des lymphocytes intestinaux des poissons et plus particulièrement de la truite arc-en-ciel, il serait donc intéressant de tester cette fonction afin de savoir si les lymphocytes intestinaux de ce poisson répondent de façon similaire ou non à ceux des deux autres espèces citées précédemment

PROJET DE RECHERCHE

I. Choix de l'espèce

L'étude bibliographique comparative nous a permis d'obtenir une vue d'ensemble des connaissances actuelles concernant la réponse immunitaire intestinale des cochons, des poulets et des truites arc-en-ciel. Même si ces connaissances restent incomplètes pour chacune des trois espèces, il ressort tout de même de cette revue que la réponse immunitaire intestinale de la truite arc-en-ciel a été moins étudiée que celle des deux autres espèces. C'est donc sur cette espèce que vont porter nos travaux.

II. Contexte et enjeux économiques liés à cette étude

En plus de l'intérêt fondamental, la meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire lié à la muqueuse intestinale de la truite arc-en-ciel représente une réelle importance économique. En effet, cette espèce fait partie de la famille des salmonidés qui regroupe les espèces de poissons d'élevage les plus commercialisés, comme par exemple le saumon. L'aquaculture est un secteur agro-alimentaire ayant une très forte croissance. En effet, depuis 1970 la production aquacole augmente d'environ 8.9 % par an contre 1.2% pour la pêche et 2.8% pour la production d'animaux terrestres sur la même période (Subasinghe, 2005). Les dernières données FAO (Food and Agriculture Organization) estiment la production aquacole mondiale à 63.6 millions de tonnes en 2011. Cette forte augmentation, due à une intensification de la production aquacole dans les différentes régions du monde, est soumise à des contraintes qui peuvent avoir un impact négatif comme la propagation des maladies dues à une croissance trop rapide des animaux ou à une mauvaise gestion des élevages. Il est rapidement apparu que la priorité pour obtenir de bons rendements et des performances économiques sur le long terme, était de maintenir les poissons en bonne santé (Post, 1987) et pour parvenir à cela, une bonne connaissance des mécanismes du système immunitaire de ces poissons est indispensable.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les facteurs de stress comme les populations à forte densité ou les conditions environnementales non optimales sont des problèmes majeurs en aquaculture, desquels peut résulter une plus forte sensibilité des poissons d'élevage aux maladies. Les mortalités dues au stress et à la propagation rapide des pathogènes dans l'eau engendrent des pertes économiques importantes pour les éleveurs. Une estimation indique qu'environ 10% des poissons meurent de maladies infectieuses et ce avant d'avoir atteint leur taille commerciale (Post, 1987 ; Jones, 2001). Au début du développement de l'aquaculture des salmonidés, les antibiotiques étaient un recours fréquemment utilisé contre les maladies. Cependant leur consommation a été progressivement réduite pour des raisons environnementales d'une part, et d'autre part en raison du développement de résistance des pathogènes. De plus, l'effet curatif de ces substances est minimisé

par le fait que les poissons malades souvent ne mangent plus. La disparition de certaines maladies a été obtenue par la vaccination des poissons qui, associée à de bonnes pratiques d'élevage, a permis de diminuer considérablement le niveau de mortalité. Mais seuls sont disponibles les vaccins qui luttent contre les maladies les plus fréquentes et le développement de nouveaux vaccins est un processus lent et coûteux (Sommerset et al., 2005). L'amélioration des mécanismes de défense devient, par conséquent, une bonne alternative. L'utilisation d'additifs alimentaires visant à augmenter ou stimuler les mécanismes du système immunitaire chez le poisson est un secteur de recherche important. De telles substances sont dites immunostimulantes. Ces immunostimulants font l'objet de beaucoup de recherches car des études montrent qu'une stimulation précoce du système immunitaire peut améliorer les défenses immunes non spécifiques chez le jeune animal (Revilla et al., 2005). Comme nous allons le voir dans les prochains paragraphes, les vitamines antioxydantes, les B 1,3/1,6 glucans ainsi que les nucléotides font partie de ces substances qui influencent la résistance des animaux aux virus, bactéries, champignons et parasites.

2.1 La vitamine C

Cette vitamine, appelée aussi acide ascorbique, module une variété de fonctions biochimiques liées aux fonctions du système immunitaire. C'est un composant ayant de fortes propriétés anti-oxydantes et dont une des fonctions est de protéger les cellules contre les radicaux libres. La concentration de vitamine C dans les phagocytes et les lymphocytes est dix fois plus importante que dans le plasma. Un faible apport de vitamine C diminue l'activité des phagocytes dans des modèles animaux (Bendich, 1990) et une corrélation positive a été démontré entre la concentration cellulaire en vitamine C et l'activité des phagocytes chez la truite arc-en-ciel (Verlhac, 2010). Plusieurs études, résumées dans la revue de Verlhac et Gabaudan (2005), ont illustré l'action positive d'un régime supplémenté en vitamine C sur différentes fonctions immunes des poissons, comme par exemple la phagocytose, la pinocytose, la flambée respiratoire, l'activité du lysozyme ou encore la prolifération des lymphocytes et la réponse anticorps.

2.2 Les B 1,3/1,6 glucans

Ce sont des polysaccharides extraits des parois de cellules de levures. Leur fonction immunostimulante principale est de se lier aux récepteurs spécifiques présents à la surface des macrophages et des autres phagocytes des poissons et d'activer les fonctions de ces cellules telles que les processus de phagocytose et de flambée respiratoire. Chez les vertébrés, le récepteur spécifique aux B 1,3/1,6 glucans exprimé par les phagocytes est appelé Dectin-1 (Brown et al., 2003). Deux fonctions relatives à la fixation d'un B 1,3/1,6 glucan sur ce récepteur ont été identifiées, premièrement la reconnaissance des particules de B 1,3/1,6 glucan par les macrophages qui entraîne leurs activation et deuxièmement

l'association de Dectin-1 et des TLR qui conduit à la mise en place de réponse pro-inflammatoire. Chez les mammifères, les β 1,3/1,6 glucans stimulent également la cytotoxicité cellulaire naturelle. Pour cela, ils se lient au récepteur du complément de type III, considéré comme un récepteur des β glucans, présent à la surface des cellules NK. La liaison des β 1,3/1,6 glucans au récepteur induit notamment la production d'interférons (IFN γ) qui stimulent l'activité des cellules NK (Hashimoto et al., 1997). Dalmo et Bogwald (2008) ont résumé les travaux concernant l'influence d'un ajout de β -glucans sur dans l'aliment sur la santé des poissons. Par exemple, il a été démontré que l'ajout de β 1,3/1,6 glucans dans l'aliment entraîne une augmentation significative de la résistance aux maladies (Verlhac et Viswanath, 2004). Plus récemment des études *in vitro* ont montré que l'ajout de β -glucans dans le milieu de culture augmente la flambée respiratoire des phagocytes du rein antérieur de la truite arc-en-ciel (Verlhac, 2010). De la même manière, une faible dose de β -glucans dans le milieu de culture de leucocytes de rein antérieur de truite arc-en-ciel (0.05mg et 0.5mg/ml) augmente significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoire IL-1 β et TNF- α (Chettri et al., 2011). Pour finir, Lauridsen et Buchmann (2010) ont montré que des truites arc-en-ciel nourries durant une longue période avec un aliment supplémenté en β -glucans sont moins susceptibles d'être infectées par *Ichthyophthirius multifiliis* que des truites nourries classiquement et que l'activité du lysozyme de ces truites augmente de manière significative au cours du temps.

2.3 Les nucléotides

Ce sont des acides désoxyribonucléiques pour l'ADN et ribonucléiques pour l'ARN. Un nucléotide est composé de 3 parties : un groupement phosphate, un glucide à 5 atomes de carbone (désoxyribose pour l'ADN et ribose pour l'ARN) et une base azotée variable en fonction du nucléotide (purine ou pyrimidine). Il existe quatre bases différentes pour l'ADN : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C). Les nucléotides de l'ARN sont les mêmes que pour l'ADN sauf la thymine (T) qui est remplacée par l'uracile (U). Le tableau 1 ci-dessous présente la nomenclature des nucléotides ARN.

Tableau 1 : Nomenclature des nucléotides ARN

BASE	Ribonucléoside-5'-monophosphate
Adénine	Adénosine-5'-monophosphate = AMP
Guanine	Guanosine-5'-monophosphate = GMP
Uracile	Uridine-5'-monophosphate = UMP
Cytosine	Cytidine-5'-monophosphate = CMP
Thymine	Thymine riboside-5'-monophosphate (rare)

Les nucléotides sont des composants essentiels à l'ensemble des processus biologiques. Ils sont particulièrement importants lors de la production de nouvelles cellules car ils fournissent les blocs de construction des acides nucléiques. La plupart des cellules animales synthétisent leurs purines et pyrimidines *de novo* à partir de composés carbonés et azotés simples, plutôt qu'à partir de purines et de pyrimidines préformées. Ces composés sont fournis par des précurseurs, comme le CO₂ ou le tétrahydrofolate pour les composés carbonés, et la glutamine ou l'aspartate pour les composés azotés. Le glucide est obtenu à partir d'un précurseur, le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, provenant de la voie de synthèse des pentoses phosphates. La synthèse *de novo* des purines aboutit, dans un premier temps, à la formation d'inosine-5'-monophosphate (IMP). Ce dernier peut être transformé soit en AMP, soit en GMP. Les nucléotides pyrimidiques sont eux aussi synthétisés *de novo* à partir d'un précurseur-clé, l'UMP. Concernant le GMP, le sel de sodium, disodium guanylate, est un additif alimentaire utilisé comme exhausteur de saveur du fait de son goût particulier dans les aliments (Verlhac et Viswanath, 2004).

Les nucléotides ne sont pas considérés comme des nutriments essentiels pour l'organisme qui, à l'exception des lymphocytes et des cellules épithéliales de l'intestin, est capable de synthétiser *de novo*, essentiellement dans le foie, tous les nucléotides nécessaires à la croissance et à la physiologie du corps. Cependant, des études (Uauy et al, 1994) ont démontré que l'intestin et le système immunitaire dépendent en grande partie d'un apport exogène en nucléotides: la synthèse *de novo* n'est donc pas toujours suffisante pour assurer l'activité métabolique des tissus et des cellules. De plus, les besoins de l'organisme en nucléotides exogènes varient considérablement et peuvent augmenter dans certaines conditions. Par exemple, un tel besoin est attendu lors de la reconstitution de tissus endommagés, d'infections systémiques, de croissance rapide et sous des conditions de stress. Chez la souris, l'absence de nucléotides dans l'alimentation cause une diminution significative de plusieurs mécanismes du système immunitaire spécifique. Des essais *in vitro* et *in vivo* démontrent

qu'un régime privé en nucléotides affecte sévèrement la prolifération des lymphocytes T et non des B. L'intérêt s'est alors porté sur la fonction, l'activation et la maturation des lymphocytes T; il a été clairement établi qu'il y a une augmentation du nombre de lymphocytes T immatures ou nuls dans les organes lymphoïdes des souris nourries avec un régime supplémenté en nucléotides. Ainsi, les nucléotides alimentaires sont des régulateurs de l'hématopoïèse chez la souris (Kulkarni et al, 1994 ; Chandra et Kumari, 1994). Les effets observés en l'absence de nucléotides exogènes peuvent être reversés par l'addition d'ARN ou d'uracile dans l'alimentation de l'animal, suggérant ainsi que les pyrimidines jouent un rôle dans le maintien du système immunitaire. Il a été également démontré qu'une préparation d'ARN de levures augmente, *in vitro*, la production des anticorps en réponse à l'activation antigène dépendante des lymphocytes T. L'action des polynucléotides semble moduler la réponse humorale en interagissant avec les récepteurs membranaires des cellules T helper et des cellules d'autres lignées (macrophages, monocytes). Ainsi, en l'absence d'antigène, on observe une activation non spécifique des lymphocytes Th, conduisant à une augmentation non spécifique des anticorps. Toutefois, l'action des polynucléotides est supprimée en présence d'antigène, facilitant, ainsi, la réponse des anticorps spécifiques (Jyonouchi, 1994). D'autres études ont mis en évidence l'amplification de l'activité des cellules NK et de la fonction des macrophages, ainsi que l'accélération de la prolifération des cellules de la moelle osseuse et des neutrophiles périphériques (Carver, 1994 ; Burrels et al, 2001a). La croissance intestinale est influencée également par les nucléotides : la taille des villosités, la quantité totale de protéines et d'ADN de l'intestin proximal de rats sont plus élevées chez les animaux ayant un régime supplémenté en nucléotides. L'activité enzymatique (maltase, lactase, sucrase) est aussi plus élevée (Uauy et al, 1994).

Li et Gatlin III (2006) ont résumé dans leur travail les recherches effectuées sur l'effet des nucléotides sur l'immunité non spécifique et spécifique des poissons. Ainsi concernant l'immunité innée, les nucléotides exogènes augmentent l'activité du complément par la voie alterne et du lysozyme ainsi que la phagocytose et la production d'anion superoxyde par les phagocytes du rein antérieur de la carpe commune (Sakai et al. 2001). De la même manière, l'ajout de nucléotides dans l'alimentation du barr rayé augmente la production de radicaux oxygéné par les neutrophiles du sang (Li et al. 2004). Toutefois, l'effet des nucléotides sur la flambée respiratoire des cellules de rein antérieur de salmonidés n'a pas pu encore être démontrée (Burrells et al., 2001a). L'ajout de nucléotides dans l'aliment des poissons augmente également l'expression d'IL-1B dans rein antérieur (Low et al. 2003). Concernant l'immunité spécifique, Ramadan et al. (1994) ont en premier observé qu'un régime alimentaire supplémenté en nucléotides a un effet positif à la fois sur la réponse humorale (hausse du titre d'anticorps dans le sérum) et sur la réponse à médiation cellulaire (augmentation de la réponse proliférative après stimulation mitogénique des lymphocytes) du tilapia vacciné contre *Aeromonas hydrophila*. Des phénomènes similaires ont été signalés sur d'autres espèces comme par exemple la truite arc-en-ciel (Burrells et al, 2001b; Leonardi et al, 2003). Leonardi et al. (2003) ont également

rapporté une augmentation de la prolifération des lymphocytes B et T après stimulation mitogénique lorsque les truites arc-en-ciel étaient nourries durant trois mois avec un régime alimentaire supplémenté en nucléotides. Plus récemment, il a été démontré que l'activité du lysozyme, de la voie alterne du complément, la production d'IgM mais également le pourcentage relatif de survie après une infection par *Streptococcus iniae* augmente significativement chez des truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté en nucléotides (Tahmasebi-Kohyani et al. 2011).

III. Objectifs de la thèse

3.1 Etude comparative des fonctions immunes intestinales et non muqueuses de la truite arc-en-ciel

Durant ce travail, nous avons dans un premier temps essayé de mieux caractériser le système immunitaire intestinal de la truite arc-en-ciel afin de compléter les connaissances existantes dans ce domaine. Nous avons décidé d'étudier les principales fonctions liées aux acteurs des réponses non spécifiques et spécifiques du système immunitaire au niveau de l'intestin d'un poisson sain et de les comparer avec les résultats obtenus au niveau non-muqueux dont les données sont mieux caractérisées (sang ou rein antérieur). Concernant les composants de la réponse immunitaire non spécifique, nous nous sommes intéressés à l'activité phagocytaire, l'activité de cytotoxicité naturelle (à la fois par des approches cellulaires mais également moléculaires) et à l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-8). Pour les composants de la réponse spécifique, nous avons étudié les réponses prolifératives des lymphocytes *in vitro* et leur apoptose, en relation avec l'expression des gènes codants les marqueurs CD3, CD8 α , CD8 β , Pax5 ou les activateurs cellulaires GATA3, T-bet, ainsi que les gènes codants les cytokines IL4/13A et la chaîne lourde des IgT et des IgM.

L'intérêt de ce travail, en plus de compléter les connaissances actuelles sur l'immunité intestinale de ces poissons d'élevage, est de développer des outils cellulaires et moléculaires fiables qui faciliteront et standardiseront l'étude rapide et reproductible des principales fonctions de la réponse immunitaire intestinale. Ainsi, dans une seconde étape, il nous sera possible de mesurer cette réponse chez des poissons infectés, mais également d'évaluer la possibilité de moduler cette réponse par le biais d'additifs alimentaires.

3.2 Modulation de la réponse immune intestinale par des additifs alimentaires

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons voulu étudier l'influence des nucléotides libres sur le système immunitaire intestinal de la truite arc-en-ciel saine. Nous avons pour cela nourri pendant plusieurs semaines des truites arc-en-ciel avec un régime supplémenté avec différentes doses de nucléotides libres. Puis, nous avons mesuré certains paramètres de la réponse intestinale non-spécifique (cytotoxicité naturelle, phagocytose, expression des cytokines inflammatoires IL-1B et IL-8) et spécifique (prolifération des lymphocytes, expression des ARNm des marqueurs cellulaires CD3 et Pax-5, expression des ARNm de la chaîne lourde d'IgT) ainsi que l'apoptose des lymphocytes intestinaux en culture.

3.3 Mise en place de la plateforme de PCR en temps réel et étude de la réponse immune intestinale

Ce travail de thèse réalisé dans le cadre d'un partenariat entre l'industrie DSM et l'Université de Lorraine avait également pour but d'acquérir la maîtrise des techniques de biologie moléculaire permettant les quantifications des ARNm des gènes d'intérêt et la mise en place d'une plateforme de biologie moléculaire dans le groupe recherche en Nutrition et Santé des Poissons du centre de recherche en nutrition animale (CRNA) de DSM Nutritional Products France. Le groupe recherche en Nutrition et Santé des Poissons a développé de nombreuses techniques d'étude de la réponse immune systémique cellulaire. Néanmoins jusqu'à présent, du fait du peu d'outils développés pour les poissons, notamment d'anticorps spécifiques de protéines d'intérêt, certains aspects de la réponse immune n'ont pas pu être étudiés au sein du groupe, comme par exemple la sécrétion de cytokines ou l'expression de marqueurs cellulaires. C'est pourquoi il a été décidé d'étudier ces différentes réponses par biologie moléculaire et pour cela d'implanter au sein du groupe une plateforme dédiée à la RT-qPCR ou PCR en temps réel, technique encore non employée jusqu'à présent.

De ce fait d'un point de vue technique, le projet de recherche présenté ici a pour but l'étude de la réponse immune de la truite arc-en-ciel au niveau intestinal. Ce travail demandera donc dans un premier temps le transfert au niveau intestinal de toutes les techniques cellulaires développées au niveau systémique puis le développement de la technique de PCR en temps réel pour l'étude des gènes d'intérêt (IL1-B, TNF- α , IL-8, NKEF, Pax-5, CD3, CD8 α , CD8B, GATA3, T-bet, ILA/13A, IgT et IgM) au niveau systémique et intestinal de la truite arc-en-ciel.

MATERIELS ET METHODES

I. Paramètres expérimentaux

1.1 Animaux et conditions d'élevage

Les poissons étudiés lors des différents tests sont des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvéniles femelles saines, c'est-à-dire n'ayant jamais subi aucune infection. Les poissons sont maintenus dans des bacs de 200 à 500 litres dans les animaleries du CRNA. La température de l'eau est de $14.9^{\circ}\text{C} \pm 0.99$. Le nombre de poisson par bac est déterminé en fonction d'une densité d'élevage déterminée (15kg de poisson.m³ d'eau). Dans le cadre de l'étude comparative des réponses immunes locales et systémiques, chaque paramètre a été étudié à partir d'un lot de truites arc-en-ciel de poids homogènes. En effet pour chaque test cellulaire ou moléculaire, les poissons utilisés sont issus d'une même génération et sont triés pour obtenir des lots ayant un poids initial homogène puis répartis dans les bacs. Les poids moyens des différents groupes de poissons utilisés pour l'ensemble des paramètres mesurés lors de l'étude comparative vont de 60 à 300g.

1.2 Aliment et nourrissage

Le tableau n°2 décrit la formulation de l'aliment utilisé pour nourrir les truites arc-en-ciel.

Tableau 2 : Formulation de l'aliment de base

Ingrédients, %	
Farine de poisson	24.0
Tourteau de soja	20.5
Blé	16.0
Concentré de protéines de soja	10.0
Gluten de blé	10.5
Huiles de poisson	16.8
Ou	
Huile de poisson / colza	8.5 / 8.5
Vitamine & Prémix minéraux	2.2
Vitamine C	100 ppm
Vitamine E	125 ppm
Taux de protéine déclaré (% tel quel)	43.3
Lipides totaux déclarés (% tel quel)	21.0

Les poissons sont nourris quotidiennement à la main en deux repas, un le matin et un l'après-midi. Durant le week-end, les poissons sont nourris sur distributeur. La quantité de nourriture distribuée par jour est déterminée en fonction d'une table de nourrissage et dépend de la température de l'eau et du poids du poisson.

1.3 Protocole expérimental des essais de modulation de la réponse immune par les nucléotides

Dans le cadre de l'étude de l'effet d'un régime supplémenté avec de nucléotides sur la réponse immune intestinale, un protocole expérimental a été mis en place afin de pouvoir garantir l'homogénéité et la reproductibilité des résultats obtenus. Nous avons testé lors de deux essais distincts l'effet d'un régime supplémenté par 600 et 3000ppm (essai 1) puis d'un régime supplémenté de 375 et 750ppm (essai 2) de nucléotides sur certaines fonctions de la réponse immune.

Aliments expérimentaux : La formulation des aliments expérimentaux est décrite dans le tableau n°2 à laquelle est ajoutée la dose de nucléotides à tester, (600ppm et 3000ppm pour le premier essai ; 375ppm et 750ppm pour le second). L'application des nucléotides à l'aliment de base est réalisée pré-extrusion. Lors de chaque essai, un aliment contrôle a été aussi testé représenté par l'aliment de base non supplémenté en nucléotides (tableau n°5).

Nucléotides utilisés : Il s'agit du ROVIMAX™ NX commercialisé par DSM Nutritional Product. Le ROVIMAX™ NX est un extrait de levure (*Kluyveromyces fragilis*) déshydraté et hydrolysé pour l'enrichir en nucléotides 5 prime jusqu'à au moins 40% de nucléotides libres.

Poissons et répartition par bac et par traitement : Des truites arc-en-ciel issues d'une même génération sont triées avant le début de l'expérience pour obtenir un poids initial homogène (50g pour les poissons utilisés lors de l'essai 1 et 140g pour l'essai 2). Deux bacs sont prévus pour chaque traitement et deux bacs sont également prévus pour le contrôle. Les poissons sont répartis au hasard dans les bacs à raison de 40 poissons/bac pour l'essai 1 et 32 poissons /bac pour l'essai 2. La répartition des bacs par traitement est également effectuée au hasard.

Durée de l'alimentation expérimentale : Après 1 semaine d'adaptation sur l'aliment contrôle, les groupes de poissons « tests » sont nourris durant 3 semaines avec les aliments expérimentaux avant le début des prélèvements. L'alimentation expérimentale se poursuit ensuite durant toute la durée des prélèvements.

Nourrissage : Les poissons sont nourris de la même manière que décrit dans le paragraphe 1.2.

II. Prélèvement des tissus

Avant chaque prélèvement, les poissons sont anesthésiés avec du MS 222 (acide éthyle ester d'acide 3-aminobenzoïque) à une concentration finale de 0,8g.l⁻¹. Les prélèvements de sang se font par ponction au niveau de la veine caudale. Avant les prélèvements de tissus, les poissons sont tués par un coup sur le haut du crâne et saignés. Les poissons sont ensuite disséqués pour prélever le rein antérieur ou l'intestin.

Une incision est pratiquée de l'anus à la tête du poisson. Les viscères sont enlevés afin de découvrir le rein qui est collé à la colonne vertébrale. Le rein antérieur est prélevé à l'aide d'une petite cuillère puis placé directement sur la grille de broyage. Pour l'intestin, les viscères sont délicatement déroulées et la partie allant des caeca pyloriques à l'anus est prélevée. Le gras entourant l'intestin est délicatement enlevé et l'intestin est découpé longitudinalement à l'aide d'un scalpel. Les fèces sont éliminées par grattage léger à l'aide d'une spatule en prenant garde de ne pas abimer la muqueuse intestinale. Le tissu est ensuite conservé dans du milieu de culture RPMI 1640 (Sigma, ref.R7638) sur de la glace.

III. Isolement cellulaire

3.1 Préparation des tissus intestinaux : séparation des cellules du tissu

Isolement des cellules intestinales suivant la méthode « par digestion » : Les cellules intestinales sont isolées selon la méthode de Salinas et al. (2007) avec quelques modifications. Une fois prélevés, les intestins sont nettoyés, coupés en petits morceaux (5 x 5 mm) puis incubés 10 minutes à température ambiante sous agitation lente dans 15 ml de RPMI1640, supplémenté avec 0.145 mg/ml de DTT (Sigma, Ref. D5545) et 0.37 mg/ml d'EDTA. Après l'incubation, les tissus sont lavés 3 fois dans du RPMI1640 frais afin d'éliminer la totalité du DTT qui pourrait inhiber l'action de la collagénase. Une fois propres, les tissus sont incubés 60 minutes à température ambiante sous forte agitation dans du RPMI1640, supplémenté avec 0.37mg/ml de Collagenase type II (Sigma, ref. C6885), 0.05mg/ml de Dnase I(Sigma, ref. DN-25), 0,5% de sérum de salmonidés (Interchim, ref. N82800F), 25 unités/ml de Pénicilline et 25 µg/ml de Streptomycine (Sigma, ref. P0781). La suspension cellulaire obtenue au bout de 60 minutes est filtrée sur une membrane nylon de 100µm et les tissus partiellement digérés restant sont délicatement broyés au travers cette membrane (afin de récupérer un maximum de cellules) qui sera ensuite rincée avec du milieu frais. Le volume de la suspension cellulaire ainsi obtenue est ajustée

à 30ml dans du RPMI1640 et cette suspension est ensuite centrifugée 10 minutes à 4°C et 488g. Le surnageant est éliminé et le culot obtenu est remis en suspension dans 5 ml de milieu RPMI1640 frais puis filtré sur 2.5g de laine de nylon. La laine est ensuite rincée avec 5ml de milieu RPMI1640 frais et le filtrat ainsi obtenu est conservé à 4°C jusqu'aux prochaines étapes.

Isolement des cellules intestinales selon la méthode « mécanique » : Les cellules intestinales sont cette fois-ci isolées selon la méthode de Takizawa et al.(2011) Une fois prélevé, l'intestin est rincé dans du RPMI1640 frais puis agité vigoureusement à la main durant 30 secondes à 1 minute (suivant la taille de l'intestin) dans 5 ml de RPMI1640 frais afin d'ôter une grande partie du mucus. L'intestin est ensuite broyé à l'aide d'un Potter en verre sur de la glace. La suspension cellulaire obtenue est filtrée sur une membrane nylon de 200µm et le volume est ensuite ajusté à 40ml avec du RPMI1640 frais. Afin de faciliter le gradient de densité et d'optimiser la quantité de leucocytes récupérées, la suspension cellulaire est séparée en deux parties égales de 20ml. Ces suspensions sont conservées dans la glace jusqu'à leur utilisation.

3.2 Préparation du rein antérieur : broyage et filtration du tissu

Le rein antérieur est broyé au travers d'une grille métallique dans 5 ml de milieu de culture RPMI-1640 afin de séparer mécaniquement les cellules du tissu conjonctif. Le broyat obtenu contient des cellules immunitaires, des globules rouges ainsi que des débris de tissu conjonctif. Ce broyat est filtré sur une membrane nylon de 30 µm qui sera ensuite rincée avec 10 ml de RPMI1640. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont conservées dans de la glace jusqu'à leur utilisation.

3.3 Dilution du volume sanguin en vue du gradient de densité

Afin d'optimiser la quantité de leucocytes obtenus lors du gradient de densité, deux millilitres de sang sont placés en volume équivalent de 1ml dans deux tubes Falcon de 50ml et dilués jusqu'à 15ml avec du RPMI1640. Les suspensions ainsi obtenues sont maintenues dans la glace jusqu'à leur utilisation.

3.4 Gradient de densité

La solution de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, 1.077g/ml Amersham, ref. 17-1440-03) est déposée sous les suspensions cellulaires diluées de rein antérieur, de sang ou d'intestin décrites précédemment. Il s'agit d'une séparation par centrifugation qui permet d'enrichir en leucocytes la population cellulaire grâce à un gradient de densité. Le volume de Ficoll varie de 10ml pour l'intestin à 15ml pour le rein et le sang. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 40 minutes à 1356g. Après la centrifugation, l'interface contenant la suspension enrichie en leucocytes située entre la solution de Ficoll et le milieu cellulaire

est prélevé avec une pipette de 10ml et rincée avec 15 ml de RPMI 1680 (488g, 10 minutes, 4°C). Cette opération de rinçage est répétée une deuxième fois pour le rein antérieur et après chaque centrifugation la suspension cellulaire est filtrée au travers d'une membrane nylon de 30µm. Après la centrifugation le culot cellulaire est re-suspendu dans 1ml de milieu de culture et la concentration en leucocytes est déterminée par un comptage sur cellule de Thoma, avec ajout de bleu Trypan (0.01%) afin de s'assurer de la viabilité des cellules. Les concentrations de ces suspensions cellulaires seront ensuite ajustées en fonction des différentes analyses des paramètres cellulaires ou moléculaires qui seront réalisées par la suite.

IV. Analyse des paramètres cellulaires

4.1 Phagocytose

Pour mesurer la phagocytose les suspensions cellulaires obtenues précédemment, à partir du rein antérieur ou de l'intestin, sont incubées avec des levures, fixées sur lame puis observées en microscopie optique. Pour ce faire, les suspensions de leucocytes sont diluées dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% de sérum de salmonidés, 50 unités de pénicilline et 50µg / ml de streptomycine, 2 mM de L-glutamine (Sigma, réf. G7513) et 5x10⁻⁵M de 2 -mercaptoéthanol (Invitrogen, réf. 31350-010) afin d'obtenir une concentration de 2x10⁷ cellules/ml. En parallèle, les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sont ajustées à une concentration de 2x10⁸ cellules/ml de RPMI1640 et conservées à température ambiante jusqu'à leur utilisation. 500µl de milieu de culture supplémenté, 75 µl des suspensions de leucocytes du rein antérieur ou de l'intestin, 150 µl de suspension cellulaire de levure puis à nouveau 500 µl de milieu de culture supplémenté sont ajoutés dans le compartiment d'une chambre de culture du système « Nunc® Lab-Tek® II - CC2,™ Chamber Slide™ » (Sigma, réf.S6690), illustré dans la figure 12, afin d'obtenir un ratio leucocytes/levures de 1/20.

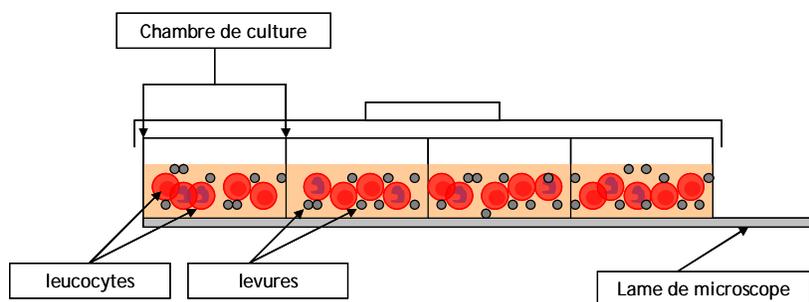


Figure 12 : Illustration du système « Nunc® Lab-Tek® II - CC2,™ Chamber Slide™ » utilisé lors des tests de phagocytose. Ce système est composé de 4 chambre de culture pouvant contenir chacune une suspension de leucocytes et de levures à un ratio de 1/20.

Les lames de culture sont placées dans un incubateur pendant 4h à 22°C et 5% de CO₂. Après l'incubation, le milieu de culture est éliminé et les levures non ingérées par les phagocytes ainsi que les cellules non-adhérentes sont rincées avec du RPMI1640 qui est versé sur les lames, énergiquement pour les cellules du rein et plus doucement pour les cellules de l'intestin car celles-ci adhèrent moins fortement à la lame. Après ce rinçage, il ne reste alors plus que les cellules adhérentes, c'est-à-dire les phagocytes, sur les lames de culture. Les lames sont alors sèches à l'air libre, fixées au méthanol et colorées par la coloration de May-Grünwald/Giemsa. Chaque lame est observée au microscope (objectif 100x à immersion) afin de calculer à partir de 200 phagocytes présents sur la lame le nombre de levures ingérées / phagocytes et le pourcentage de phagocytes ayant ingérés au moins une levure. A partir des données collectées, un indice de phagocytose correspondant au :

$$\frac{(\text{Nombre de phagocytes ayant ingérés au moins une levure} / 200) \times \text{Nombre total de levures ingérées}}{\text{ingérées}}$$

sera également calculé. Comme l'illustre la figure 13, les phagocytes ayant ingérés au moins une levure sont facilement identifiables lors de l'observation microscopique.

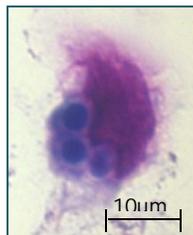


Figure 13 : Observation au microscope optique (objectif 100x à immersion) d'un macrophage intestinal de truite arc-en-ciel ayant ingéré 3 levures.

4.2 Flambée respiratoire

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour mesurer la flambée respiratoire. La première utilise la chimiluminescence. Dans cette méthode, la flambée respiratoire est induite par l'ajout de zymosan opsonisé qui provoque la production de dérivés oxygénés (ROS) par les phagocytes. Cette production est ensuite mesurée en utilisant un substrat spécifique, le luminol, qui réagit avec les dérivés oxygénés en produisant une émission lumineuse quantifiable par luminescence et qui correspond à la production totale de dérivés oxygénés, à la fois extra- et intracellulaires. La seconde méthode utilise la cytométrie de flux. Dans cette seconde approche, c'est le PMA induit la production de ROS et cette production est mise en évidence grâce à la dihydrorhodamine 123 (DHR 123), une sonde qui peut pénétrer dans le cytoplasme et réagir avec les ROS pour produire une molécule fluorescente. Dans

chaque cas, les suspensions cellulaires de l'intestin ou du rein antérieur sont ajustées à 1×10^7 cellules / ml de RPMI1640 non supplémenté.

Méthode utilisant la chimiluminescence : Le protocole utilisé est une modification de celui décrit par Scott & Klesius (1981) et Stave et al. (1983). 100 μ l de chaque suspension cellulaire sont placés dans les puits d'une microplaque blanche mat afin de protéger les échantillons de la lumière et ainsi de préserver au maximum le signal lumineux obtenu lors de la réaction (VWR / Greiner, Réf. 736-0228,). Les réservoirs du luminomètre (Tristar[®] LB941, Berthold Technologies) sont chargés avec du luminol (Sigma, Réf. A8511) et du zymosan opsonisé avec du sérum de poulet (Sigma, Réf. Z4250) afin de permettre l'injection de 50 μ l de luminol et 100 μ l de zymosan dans chaque puits. Tous les réactifs sont dilués dans du tampon réactionnel (7.25g NaCl, 0,23 g CaCl₂.H₂O, 0.38g de KCl, 0,41 g NaH₂PO₄.H₂O, 1g NaHCO₃, 0,23 g MgSO₄.7H₂O, C₆H₁₂O₆ 1g / 1L H₂O, Sigma). Les réactions lumineuses résultantes du contact du luminol avec les dérivés oxygénés (H₂O₂ ; O₂⁻) totaux produits par les phagocytes activés sont enregistrées toutes les minutes pendant 180 min afin de mesurer la cinétique de la réponse en chimiluminescence pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en RLU x 10⁶ par minute (unité lumineuse relative) et correspondent à l'aire sous la courbe (AUC) de la réponse cinétique de chaque échantillon. Cette AUC est calculée pour chaque échantillon par le logiciel d'exploitation des données du luminomètre : Microwin[®]. Cette valeur est ensuite corrigée afin de tenir compte de la proportion de phagocytes présents dans chaque échantillon. Pour cela le pourcentage de phagocytes présents dans chaque suspension cellulaire est déterminé par cytométrie de flux via un profil cellulaire séparant les cellules en fonction de leur taille et de leur complexité. La valeur d'AUC sera ensuite rapportée au pourcentage de phagocytes présents dans la suspension cellulaire qui lui correspond.

Méthode utilisant la cytométrie en flux : Pour cette méthode, 200 μ l de suspension cellulaire sont placés dans un tube MiniSorp (VWR, Réf. 735-0017) avec 80 μ l de dihydrorhodamine 123 (DHR123, 25 μ m, Sigma, Réf. D 1054) et 1680 μ l de milieu RPMI1640 supplémenté avec 2% de sérum de salmonidés, 50 unités/ml de pénicilline, 50 μ g/mL de streptomycine, 2mM de L-glutamine (Sigma, Réf. G7513) et 5×10^{-5} M de 2-mercaptoéthanol (Invitrogen, réf. 31350-010). Les tubes sont protégés de la lumière et incubés pendant 15 min à température ambiante. Chaque échantillon est ensuite divisé en deux volumes égaux : un tube servira de test et le second de témoin. Vingt microlitres de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, 10 μ g/mL, Sigma; Réf. P 8139) sont ajoutés dans le tube test et 20 μ l de milieu RPMI1640 supplémenté dans le tube contrôle. L'ajout de PMA va induire la production de ROS par les phagocytes et l'oxydation de la DHR123 par les H₂O₂ intracellulaires conduit à une émission fluorescente mesurable par cytométrie de flux (Rothe et al. 1988). Les mesures sont réalisées avec un cytomètre de flux (FacsCalibur[®], BD Biosciences) sur 10000 événements. Les paramètres de taille (FSC-H), de complexité (SSC-H) et de fluorescence verte (FL1-H) sont enregistrés. Chaque tube est passé au cytomètre toutes les 30 min pendant 120 min pour suivre la cinétique de la réaction

oxydative. Pour chaque échantillon, la moyenne de fluorescence enregistrée pour les phagocytes du tube contrôle est soustraite à celle des phagocytes du tube test. Ces valeurs sont retranscrites sur une courbe en fonction du temps et les résultats sont exprimés comme l'aire sous la courbe (AUC) pour chaque poisson.

4.3 Cytotoxicité naturelle

L'activité des NCC est mesurée en utilisant la méthode décrite par Chang et al. (1993) avec quelques modifications. Il s'agit d'une méthode utilisant la cytométrie de flux. Elle est basée sur l'émission simultanée de deux signaux fluorescents : le DiO-C18 (perchlorate de 3,3'-dioctadecyloxcarbocyanine), un colorant fluorescent vert lipophile des carbocyanines membranaires et l'iodure de propidium (PI) qui va permettre de différencier les cellules effectrices non marquées, des cellules cibles viables émettant une fluorescence verte (Dio-C18) et des cellules cibles mortes émettant des fluorescences rouge (iodure de propidium) et verte.

Cellules cibles : La lignée cellulaire utilisée comme cellules cibles est la lignée P815 (CIFA NB: TIB-64). Il s'agit d'une lignée non adhérente issue d'un mastocytome de souris. Le milieu de culture est préparé dans des bouteilles stériles de 500ml contenant 225 ml de RPMI1640, 25 ml de sérum de veau foetal (SVF), 5 ml de L-glutamine à 200 mM et 1,25 ml d'antibiotiques afin d'obtenir 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Le milieu est renouvelé en moyenne tous les deux jours et les cellules sont repiquées dans 20 ml de milieu frais à une concentration de 1.10^5 - 1.10^6 cellules/ml. Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture stériles de 50ml (Nunc, réf : 04094127). Elles sont incubées à 37°C et 5% de CO₂ (incubateur Heraeus : BBK 6620). L'ensemble de ces manipulations (préparation, changement du milieu de culture) est réalisé dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (BSB 6A de chez Gélaire).

Marquage des cellules cibles : Le jour de l'essai les cellules cibles sont ajustées à une concentration de 1.10^6 cellules/ml et 5µl de 3,3'-dioctadecyloxcarbocyanine perchlorate, (CellBrite green cytoplasmic membrane-labeling kit, Interchim, réf. JW7330) sont rajoutés par ml de suspension cellulaire. Les cellules sont incubées à 22°C pour permettre l'incorporation du DiO-C18 dans les membranes cellulaires. Après incubation, deux rinçages sont effectués dans du milieu supplémenté par centrifugation à 124g pendant 7min à 22°C.

Le marquage des cellules cibles est réalisé en conditions stériles pour prévenir de toute contamination.

Préparation des cellules effectrices : Durant l'incubation pour le marquage des cellules cibles, les poissons servant au test sont prélevés et les lymphocytes du rein ou de l'intestin sont isolés, comme expliqué précédemment. L'activité cytotoxique est mesurée à trois ratios cellules effectrices (poisson)

/ cellules cibles (P815) : 75 :1, 50 :1, 25 :1 pour les cellules du rein et 25 :1, 10 :1, 5 :1 pour les cellules de l'intestin. Des ratios différents sont utilisés car d'une part, le rendement cellulaire obtenu après l'isolement des cellules de l'intestin n'est pas assez important pour mesurer l'activité cytotoxique à des ratios élevés et d'autre part, l'activité cytotoxique des cellules de rein mesurée à des ratios plus faibles n'est pas assez élevée pour obtenir des résultats fiables. La concentration des cellules effectrices est ensuite ajustée en fonction de ces différents ratios dans du RPMI1640 frais non supplémenté.

Mise en contact des cellules cibles et effectrices : Les cellules cibles marquées au DiO-C18 sont ajustées à 1.10^5 cellules/ml dans leur milieu de culture supplémenté et 200µl de ces suspensions sont placés dans des tubes adaptés à la cytométrie de flux (Nunc, tube Minisorp 75 x 12 mm, 5ml, réf chez VWR: 735-0017). Deux cent microlitres des différentes suspensions de lymphocytes ajustées aux différentes concentrations sont ajoutés aux cellules cibles pour obtenir les ratios cellules effectrices : cellules cibles citées précédemment. Les tubes contenant les cellules effectrices et cibles sont centrifugés 2 minutes à 488g et à 22°C afin de favoriser le contact entre les deux populations cellulaire, puis incubés à 22°C pendant 2h. Lors de la période de mise en contact des cellules cibles et des leucocytes de truite, le milieu de culture utilisé est supplémenté en sérum de veau foetal et non en sérum de truite. En effet, celui-ci s'avère être toxique pour les cellules cibles (essais réalisés antérieurement au laboratoire). Le milieu utilisé lors de cette période d'incubation sera donc supplémenté avec du SVF (5%), qui convient mieux aux cellules de mammifères sans inhiber l'activité des cellules de poissons.

A la fin de la période d'incubation, 130µl d'iodure de propidium (40µl/ml, Sigma, réf. P4864), sont ajoutés dans chaque échantillon qui est alors incubé durant 15 minutes pour laisser à l'iodure de propidium le temps de pénétrer dans les cellules. L'iodure de propidium est utilisé comme marqueur des cellules mortes car il se fixe aux noyaux des cellules et, de ce fait, seules les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, pourront être marquées.

Préparation des échantillons témoins de lyses minimale et maximale : Six tubes témoins d'échantillons sont préparés en parallèle. Un premier tube contient des cellules cibles non marquées pour tester l'auto-fluorescence des cellules cibles (200µl de cellules + 200µl de RPMI). Un second tube contient uniquement des cellules cibles marquées servant de contrôle positif. La lyse minimale ou spontanée des cellules cibles est testée dans un troisième tube par ajout d'iodure de propidium (PI*) à des cellules cibles marquées au DIO-C18 (200µl de cellules cibles + 200µl de milieu de culture RPMI). Des cellules cibles marquées et tuées avec 0.3mg/ml de saponine (Fluka, réf : 84510) sont placées dans un quatrième tube afin de déterminer la lyse maximale des cellules cibles, qui nous servira pour le calcul du pourcentage de lyse. La saponine est un détergent qui va lyser artificiellement les cellules

cibles en détruisant l'intégrité de leurs membranes cytoplasmiques. De l'iodure de propidium est également ajouté pour distinguer la fluorescence des cellules cibles mortes.

Un contrôle des cellules effectrices se fait dans le cinquième tube contenant des cellules non marquées et dans le sixième tube contenant des cellules marquées avec de l'iodure de propidium, afin d'estimer la viabilité et le bruit de fond des cellules effectrices dans la région des cellules cibles mortes.

Lecture au cytomètre de flux : Après incubation, les échantillons sont homogénéisés sur vortex, puis passés au cytomètre de flux (FACScan, Becton Dickinson) préalablement paramétré de façon à obtenir une discrimination optimale de la population de cellules cibles. Les données sont collectées sous la forme de diagrammes en nuage de points des deux paramètres de dispersion : SSC (granularité) et FSC (taille) et des deux paramètres de fluorescence : une fluorescence verte (DiO-C18, FL1) et une fluorescence rouge (PI, FL3) et d'histogrammes de fluorescence. Chaque analyse est réalisée sur 10000 cellules cibles.

La figure 14 illustre le diagramme en nuage de points. Le signal des cellules cibles vivantes (DiO-C18+, PI-) est retrouvé dans le quadrant en bas à droite alors que celui des cellules cibles mortes (DiO+, PI+) se visualise dans le quadrant droit du haut. Le signal correspondant aux cellules effectrices vivantes (DiO-, PI-) se retrouve dans le quadrant du bas à gauche et celui des cellules effectrices mortes (DiO-, PI+) dans le quadrant gauche du haut. Le paramètre d'exclusion de la taille des cellules est réglé de manière à éliminer les débris de l'analyse.

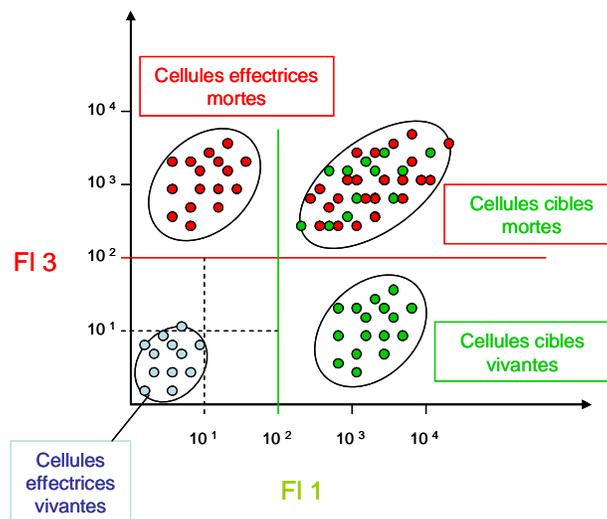


Figure n°14 : Représentation du diagramme en nuage de points généré par le logiciel CellQuest Pro lors d'un test de cytotoxicité. Les différentes populations de cellules sont réparties sur le diagramme en fonction de leurs fluorescences. Ainsi on pourra différencier facilement les cellules cibles mortes (fluorescence rouge et verte) des cellules cibles vivantes (fluorescence verte) et ainsi calculer le pourcentage de lyse.

Les résultats obtenus sont transférés sur un logiciel d'analyse (BD CellQuest Pro, Becton Dickinson Biosciences). A partir de ces données brutes, de nouveaux diagrammes en nuage de points ou en densité sont réalisés. Les quatre populations cellulaires apparaissent nettement et sont séparées dans les différents quadrants (Figure 15). Le logiciel nous indique alors le nombre de cellules présentes dans chaque quadrant, la moyenne de fluorescence verte, de fluorescence rouge ainsi que le nombre total de cellules dans le diagramme complet. Le nombre de cellules émettant une fluorescence rouge + verte, c'est-à-dire les cellules ou « événements » retrouvés dans le quadrant en haut à droite de la figure 15 représente la quantité de cellules cibles lysées par les cellules immunitaires durant la période de mise en contact.

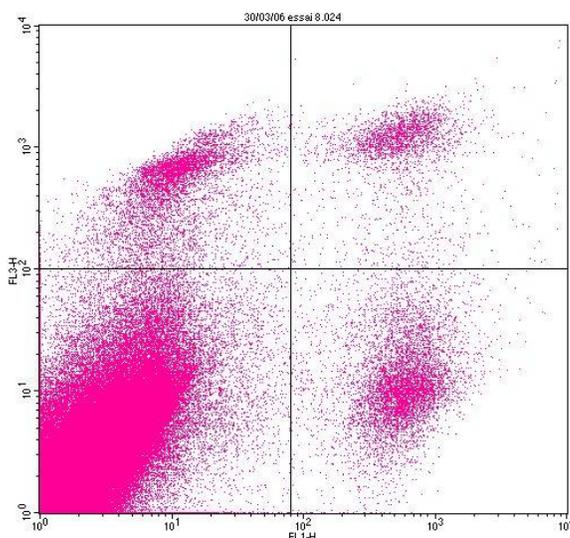


Figure n° 15 : Photo d'un diagramme en nuage de point généré par CellQuest Pro lors du traitement des résultats de cytotoxicité naturelle obtenu à partir des leucocytes intestinaux d'une truite arc-en-ciel. Comme illustré dans la figure XX on distingue facilement les quatre différentes populations de cellules.

Expression des résultats :

- **Activité cytotoxique naturelle mesurée en pourcentage de lyse:** Le pourcentage de lyse reflète l'activité cytotoxique des cellules immunes, leur capacité à lyser les éléments étrangers. Dans la littérature différentes méthodes de calculs ont été décrites.

Piriou et al. (2000) utilisent le calcul suivant :

$$((\% \text{ de cellules cibles lysées de l'essai} - \text{lyse minimale}) / (\text{lyse maximale} - \text{lyse minimale})) * 100$$

- **Activité cytotoxique naturelle mesurée en unités lytiques** : l'activité cytotoxique naturelle de chaque poisson est exprimée en unité lytique. Celles-ci sont mesurées selon la méthode décrite par Bryant et al. (1992) qui consiste à déduire cette valeur de la régression linéaire obtenue lorsque que l'on crée une courbe utilisant les pourcentages de lyse obtenus aux trois ratios cellules effectrice : cellules cibles en fonction du nombre de cellules effectrices. A partir de l'équation de cette droite, il est possible de calculer les unités lytiques qui représentent le nombre de cellules effectrices requises pour obtenir un pourcentage de lyse donné. Dans nos expériences nous avons choisi de calculer les unités lytiques pour un pourcentage de lyse de 6% car comme on peut le voir sur la figure 16, il s'agit d'un pourcentage qui se situe dans chacun de nos cas sur la partie linéaire de la droite de régression.

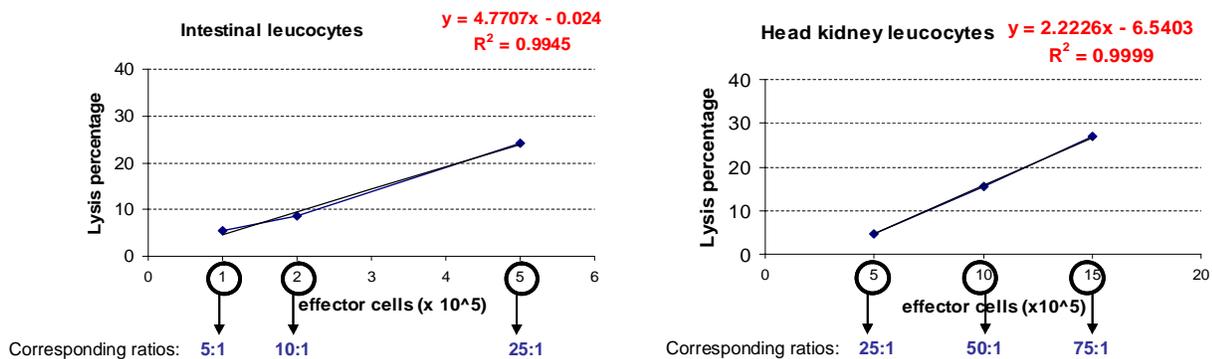


Figure n16 : Exemple de droites de régression correspondant aux pourcentages de lyse mesurés aux trois ratios cellules cibles : cellules effectrices en fonction du nombre de cellules effectrices. Les pourcentages de lyses ont été mesurés par cytométrie de flux à partir de suspensions de leucocytes intestinaux de truite arc-en-ciel. Les unités lytiques seront déduites des équations de ces droites en prenant un pourcentage de lyse de 6%.

4.4 Apoptose

L'apoptose des leucocytes a été mesurée selon le protocole du kit annexin V (APC annexin V, BD Pharmingen, réf. 550474, Koopman et al., 1994 ; Vermes et al. 1995) avec quelques modifications. Il s'agit d'une méthode de double marquage utilisant l'annexine V couplée au marqueur APC (allophycocyanine ; infra-rouge) et l'iodure de propidium. Elle est basée sur l'expression simultanée de ces deux signaux fluorescents permettant de différencier les cellules en phase précoce d'apoptose, les cellules en phase tardive d'apoptose, les cellules vivantes et les cellules en nécrose.

Préparation des leucocytes : Les suspensions de leucocytes isolés à partir du rein ou de l'intestin sont ajustées à $5 \cdot 10^6$ cellules/ml dans RPMI1640 supplémenté avec du sérum de salmonidés tel que décrit précédemment. Deux fois 1ml de chaque suspension cellulaire sont placés dans deux tubes adaptés à la cytométrie de flux. 30 μ l/ml de camptothécine à 1mM sont ajoutés pour induire l'apoptose dans un tube, alors que rien ne sera ajouté dans l'autre tube qui servira de témoin sans induction. Les tubes

sont incubés pendant 4h dans l'incubateur à 22°C et 5% CO₂. Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS 1X et remises en suspension dans le tampon de liaison (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) de l'annexine V en utilisant le même volume que pour l'incubation. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à température ambiante avec 5µl d'annexine V (concentration du kit) liée à l'APC et 5µl d'iodure de propidium (0.05mg.mL⁻¹). Après l'incubation, 400µl de tampon de liaison sont ajoutés dans chaque tube.

Lecture au cytomètre de flux : Les échantillons sont homogénéisés sur vortex puis analysés par cytométrie de flux (FACScan, Becton Dickinson). Le cytomètre de flux est préalablement paramétré de façon à obtenir une discrimination optimale de la population de cellules en phase précoce d'apoptose. Les données sont collectées sous la forme de diagrammes en nuage de points des deux paramètres de dispersion : SSC (granularité) et FSC (taille) et des deux paramètres de fluorescence : une fluorescence infra-rouge (APC, FL4) et une fluorescence rouge (PI, FL3) et d'histogrammes de fluorescence. Chaque analyse est réalisée sur 10000 cellules pour le rein. Pour l'intestin, une fenêtre est créée autour de la population des lymphocytes et la lecture se fait sur 10000 événements passant dans cette fenêtre. Dans chaque cas, le paramètre d'exclusion de la taille des cellules est réglé sur 200 pour éliminer les débris cellulaires de l'analyse.

Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel d'analyse BD CellQuest Pro. L'analyse se fait sur la population de lymphocytes pour les cellules du rein comme pour celle de l'intestin. Comme pour la cytotoxicité naturelle, les quatre populations cellulaires sont séparées dans les différents quadrants en fonction de leur fluorescence et le logiciel mesurera le nombre de cellules comprises dans chaque quadrant. La figure 17 récapitule le principe du test d'apoptose ainsi que la répartition des différentes populations cellulaires sur les quadrants du diagramme en nuage de point. Le nombre de cellules émettant une fluorescence infrarouge, c'est-à-dire les cellules retrouvées dans le quadrant bas droit représente la quantité de lymphocytes en phase précoce d'apoptose. Les cellules retrouvées dans le quadrant haut droit représentent les lymphocytes en phase tardive d'apoptose.

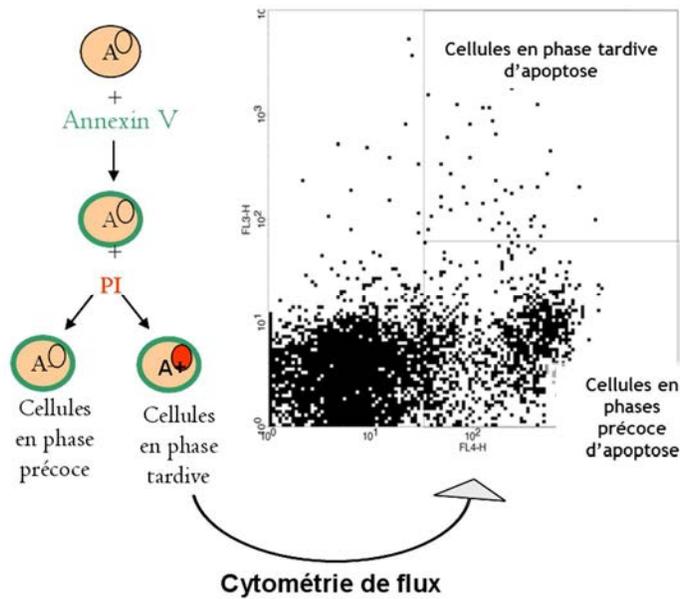


Figure 17 : Représentation récapitulative du test d'apoptose utilisant le double marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium. Le double marquage permet la discrimination dans des quadrants différents des cellules en phase précoce d'apoptose, en phase tardive d'apoptose et des cellules vivantes.

Expression des résultats : le pourcentage de cellules en apoptose représente le nombre de cellules en phase précoce d'apoptose divisé par le nombre total de lymphocyte et multiplié par cent.

4.5 Prolifération lymphocytaire

4.5.1 Méthode utilisant le Bromodéoxyuridine

La prolifération des lymphocytes est mesurée selon le protocole de la prolifération cellulaire Amersham Biotrak Sytem ELISA, la version 2 kit (réf. RPN250, GE Healthcare), sans modification, qui est basé sur les travaux de Porstmann et al. (1985). Le principe de cette méthode repose sur la Bromodéoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine ou BrdU) qui est un nucléoside synthétique analogue de la thymidine. La BrdU peut être incorporée dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en cours de réplication à la place de la thymidine et celle-ci pourra ensuite être détectée par un anticorps monoclonal couplé à un marqueur comme illustré dans la figure 18. Dans notre cas après une mise en culture des lymphocytes en présence de mitogènes pendant 72 heures, le BrdU est ajouté afin d'être incorporé à l'ADN des cellules en division. Au bout de 18 heures après incorporation du BrdU, les cellules sont fixées à l'éthanol et leur ADN est partiellement dénaturé par des nucléases pour permettre l'accessibilité et la détection du BrdU. Les molécules de BrdU sont reconnues par un anticorps monoclonal anti-BrdU

marqué à la peroxydase qui, en présence de TMB (tetraméthylebenzidine) produit une réaction colorée proportionnelle à la quantité de BrdU fixée dans l'ADN et mesurée en spectrophotométrie.

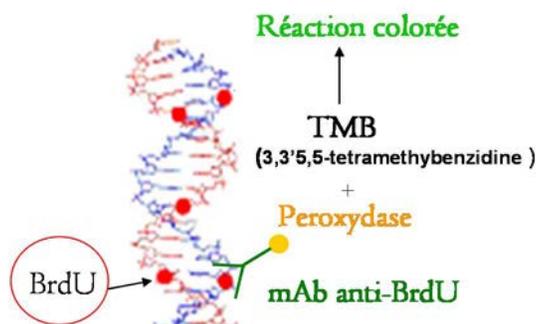


Figure 18 : Illustration du principe de détection du BrdU incorporé dans les brins d'ADN lors de la réplication cellulaire. La dénaturation partielle de l'ADN permet l'accessibilité du BrdU par l'anticorps monoclonal couplé à la peroxydase. Le contact de la peroxydase avec le TMB provoquera une réaction colorée qui pourra être quantifiée par spectrophotométrie et qui reflétera la quantité d'ADN présente dans le puits.

Mise en culture des lymphocytes : Les lymphocytes du sang périphérique ou de l'intestin sont ajustés à une concentration de $1.5 \cdot 10^7$ cellules/ml dans du RPMI1640. 20 μ l de chaque suspension sont alors ajoutés à 20 μ l de l'un des mitogènes suivants : PHA-P (lymphocytes T, 5 μ g/ml, Sigma, ref.L1668), LPS (lymphocytes B, 50 μ g/ml, Sigma, Réf. L4516) ou PWM (lymphocytes B et T, 10 μ g/ml, Sigma, Réf. L8777) et à 200 μ l de RPMI1640 supplémenté dans une microplaque 96 puits à fond plat. Des triplicats sont réalisés pour chaque mitogène et un contrôle sans mitogène ainsi qu'un blanc réactif sans cellules sont réalisés pour chaque poisson également en triplicat. Le blanc réactif sans cellules indique la fixation non spécifique de l'anticorps monoclonal marqué peroxydase à la microplaque, le contrôle sans mitogènes permet de connaître la multiplication de base des cellules dans le milieu et servira de témoin négatif. Les cellules sont incubées pendant 72h à 22°C (condition optimale pour les cellules de truites). Au bout de ce temps, les cellules sont marquées puis la prolifération quantifiée.

Marquage des cellules : Après 72h (J+3), 24 μ l de BrdU (10mM) sont ajoutés à chaque puits. Les cellules sont ensuite remises à incuber pendant 18h.

A J+4, les plaques sont centrifugées 10 minutes à 300g et à 22°C. Le milieu + BrdU est éliminé en retournant la microplaque puis en la tapant sur un papier absorbant. Toutes les étapes suivantes nécessitant l'élimination du milieu seront réalisées de cette manière. Les microplaques sont ensuite séchées 15 minutes à 60°C avec un sèche-cheveux.

La solution de fixation contenant de l'éthanol (200 μ l/puits) est ajoutée et la microplaque est mise à incuber durant 30 minutes à température ambiante (RT). Après cette incubation la solution de fixation

est éliminée. Cette étape sert à fixer les cellules marquées à la microplaque et à dénaturer l'ADN pour permettre l'accès du BrdU à l'anticorps. Après cela, un tampon bloquant contenant de la BSA (Albumine de sérum bovin) (200µl/puits) est ajouté et laissé en contact pendant 30 minutes à RT puis à son tour éliminé. La BSA se substitue aux composants non spécifiques qui pourraient se fixer sur la microplaque. L'anticorps monoclonal anti-BrdU couplée à la peroxydase (100µl/puits) est ensuite ajouté à chaque puits et laissé 90 minutes à RT afin de se lier au BrdU incorporé dans l'ADN cellulaire nouvellement synthétisé. A la fin de cette dernière incubation, les microplaques sont vidées et rincées trois fois avec 200µl par puits de solution de lavage. 100 µL de substrat TMB (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) sont alors ajoutés à chacun des puits et la microplaque est incubée 15 minutes à l'obscurité, sous agitation. Le substrat est alors dégradé par la peroxydase en formant un produit coloré. Cette réaction est stoppée au bout des 15 minutes par l'ajout de 25µl/puits de H₂SO₄ (1M). Les absorbances sont lues immédiatement après l'arrêt de la réaction au spectrophotomètre (Multiscan ascent, Thermo Labsystem) à 450nm. La densité optique (DO) lue est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée et donc au nombre de cellules ayant proliféré.

Expression des résultats : La prolifération est exprimée comme un indice de prolifération qui correspond à la DO des échantillons cultivés en présence de mitogènes divisée par la DO des mêmes échantillons cultivés sans mitogènes.

4.5.2 Méthode utilisant le CFSE

Pour cette méthode, la prolifération lymphocytaire est mesurée par cytométrie de flux, suivant le protocole présenté dans le kit « CellTrace™ CFSE Cell Proliferation » tirés des travaux de Lyons et Parish, 1994 (Invitrogen ref : C34554). Cette méthode a été utilisée par d'autres auteurs pour étudier la prolifération des cellules de différentes espèces dans différentes conditions (Lyons, 2000 ; Morrison et al., 2003 ; Leblanc et al., 2007 ; Bimczok et al., 2008 ; Lastovicka et al., 2009). Le protocole est basé sur l'incorporation dans les cellules au jour 0 de culture du CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). Le CFSE a la propriété de diffuser passivement dans les cellules, il est incolore et non fluorescent jusqu'à ce que les groupements acétates qui le composent subissent un clivage par les estérases intracellulaires. Le CFSE restant est hautement fluorescent et va réagir avec des amines intracellulaires pour former des conjugués fluorescents stables et uniformément répartis dans le cytoplasme qui resteront présents dans la cellule tout au long des divisions cellulaires. A chaque division cellulaire, il se produira une distribution équivalente de la fluorescence entre les cellules filles, rendant alors possible la mesure de la prolifération par cytométrie de flux comme illustré dans la figure 19.

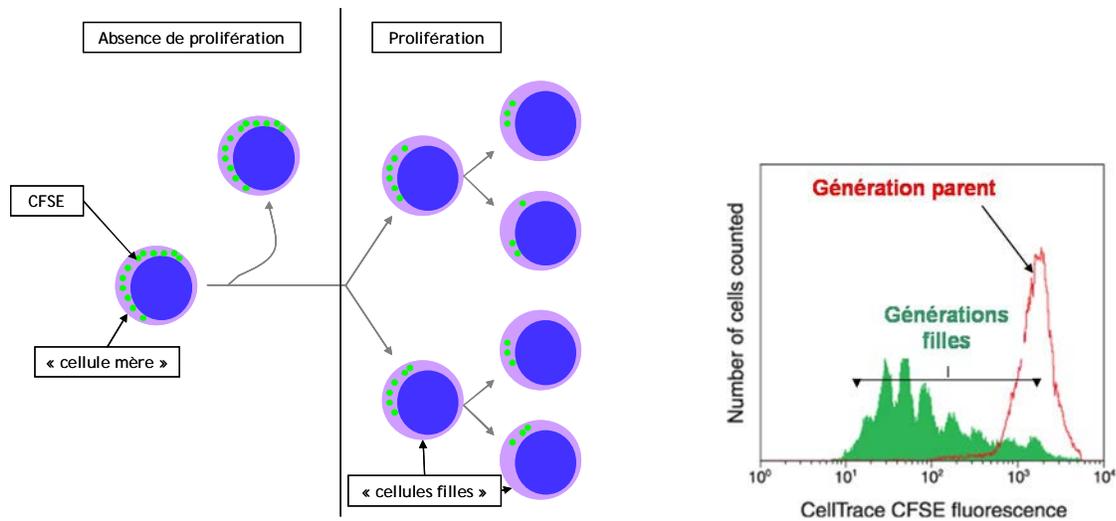


Figure 19 : Illustration du principe de la mesure de la multiplication cellulaire par marquage des cellules au CFSE et lecture au cytomètre de flux. A chaque division cellulaire, la fluorescence du CFSE est distribuée de manière équivalente rendant ainsi possible la différenciation des différentes générations filles par cytométrie de flux.

Dans le cadre d'une suspension homogène de cellules les divisions cellulaires successives se traduisent par des pics distincts sur l'histogramme de fluorescence généré par le logiciel d'analyse du cytomètre de flux, comme l'illustre l'exemple présenté dans la figure 19. Dans nos études, qu'il s'agisse de l'intestin ou du sang périphérique, la prolifération est étudiée sur une suspension hétérogène de cellules, comprenant une majorité de lymphocytes mais également des macrophages, des granulocytes (pour le sang périphérique) et d'autres cellules non lymphoïdes. De ce fait, l'histogramme de fluorescence obtenu au bout 6 jours de culture est du type de celui présenté dans la figure 20A. Cet histogramme nécessite un retraitement des données. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel Modfit, (Verity Software ,BD Biosciences). Ce logiciel a été spécialement développé pour retraiter des données générées par Cellquest Pro et a déjà été utilisé dans d'autres études de prolifération cellulaire (Liu et al., 2006). Grâce à un algorithme développé en fonction des propriétés du CFSE et en se basant sur la fluorescence du pic de la génération parent chaque pics de génération sera mieux différencié comme illustré sur la figure 20B.

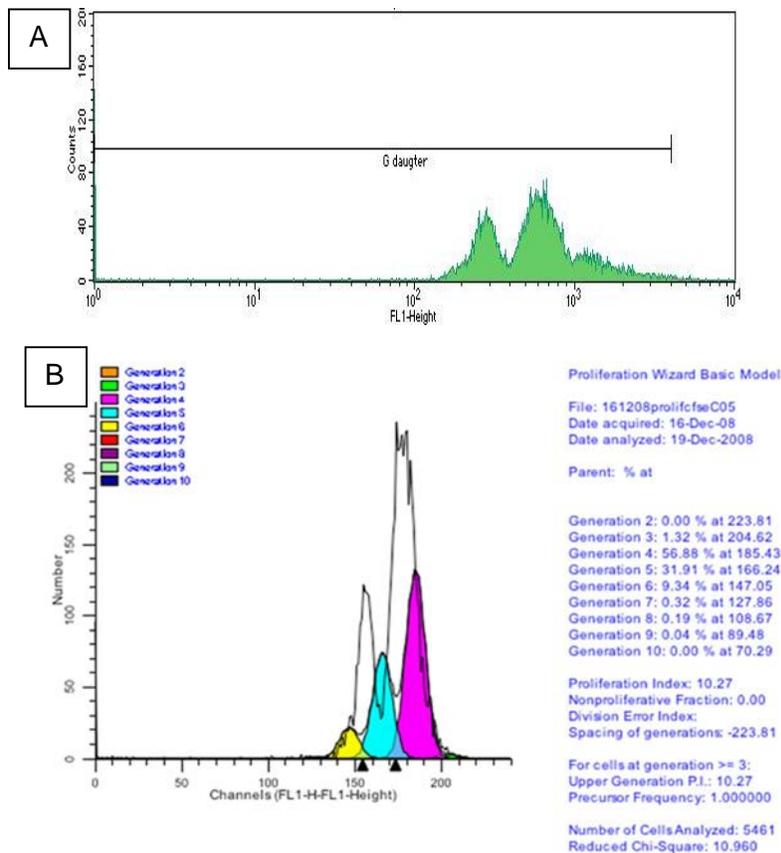


Figure 20 : A : Histogramme de fluorescence généré par le logiciel Cellquest Pro lors de l'étude des divisions cellulaires *in vitro* d'une culture de leucocytes de sang périphérique de truite arc-en-ciel. Le pic de la génération parent n'est plus visible et il est difficile de distinguer exactement combien de pics différents sont présents dans l'histogramme. Un des gros pics pouvant contenir plusieurs pics différents. B : Histogramme de fluorescence généré par le logiciel Cellquest Pro et retravaillé via le logiciel ModFit. A partir du pic de fluorescence lu à J0 de culture et des données de fluorescence enregistrées en fin de culture, le logiciel Modfit génère les pics de génération en fonction d'un algorithme mathématique basé sur les propriétés du CFSE. En plus de séparer les différents pics générationnels, le logiciel calcule le pourcentage de cellules présentes dans chaque génération et un indice de prolifération.

Marquage des cellules : Après l'isolement, les cellules sont ajustées à 1.10^7 cellules / ml de PBS 1% et incubées 10 minutes (22°C, 5% de CO₂) avec 2µl/ml de CFSE à 5mM. Après l'incubation, le marquage est stoppé par l'ajout de 4 volumes de RPMI1640 supplémenté froid suivi d'une incubation sur glace de 5 minutes. Chaque échantillon est ensuite lavé deux fois avec 5ml RPMI frais (10 minutes, 488g) et les cellules ajustées à $2.5.10^6$ cellules/ml dans du RPMI1640 supplémenté.

Mise en culture : Après le marquage, 100µl de chaque suspension cellulaire sont ajoutés à 20µl de mitogènes : soit 20µl de PHA-P (lymphocytes T, 5µg/ml, Sigma, ref.L1668), soit 20µl LPS (lymphocytes B, 50µg/ml, Sigma, Réf. L4516) ou soit 20µl PWM (lymphocytes B et T, 10µg/ml, Sigma, Réf. L8777) et 80µl de RPMI1640 supplémenté dans une microplaque 96 puits à fond rond. Un contrôle sans mitogène

est réalisé pour chaque poisson et des triplicats sont réalisés pour chaque échantillon. Les microplaques sont incubées 6 jours à 22°C et 5% de CO₂.

A J0, un tube minisorp contenant 100µl de suspension cellulaire, 10µl d'iodure de propidium (1mg/ml) et 890µl de RPMI1640 est préparé pour chaque poisson afin de régler les paramétrages du cytomètre et de déterminer l'intensité de fluorescence de la population parent.

Lecture des résultats : Au bout de six jours, 2µl d'iodure de propidium (1mg/ml) sont ajoutés dans chaque puits afin de contrôler la viabilité cellulaire. Avant analyse, les cellules sont remises en suspension par agitation des microplaques, puis passées au cytomètre de flux (Module HTS, FACScan, Becton Dickinson) préalablement paramétré de façon à mesurer les échantillons avec les mêmes réglages de fluorescence que ceux définis pour chaque poisson à J0. Les données sont collectées sous la forme d'un diagramme en nuage de points des deux paramètres de dispersion : SSC (granularité) et FSC (taille) et de deux histogrammes de fluorescences, FL1-H pour mesurer le CFSE et FL3-H pour l'iodure de propidium. Chaque analyse est réalisée sur 10000 cellules pour le sang et 20000 pour l'intestin et dans les deux cas, le paramètre d'exclusion de la taille des cellules est réglé sur 200 pour éliminer les débris.

Analyse des résultats : Les données obtenues sont traitées à l'aide du logiciel d'analyse Modfit LT™(Verity software house) comme illustré dans la figure 21. Chaque fichier de données enregistré avec le cytomètre de flux à J0 est utilisé pour créer le modèle d'analyse de base de chaque poisson (un modèle par poisson).

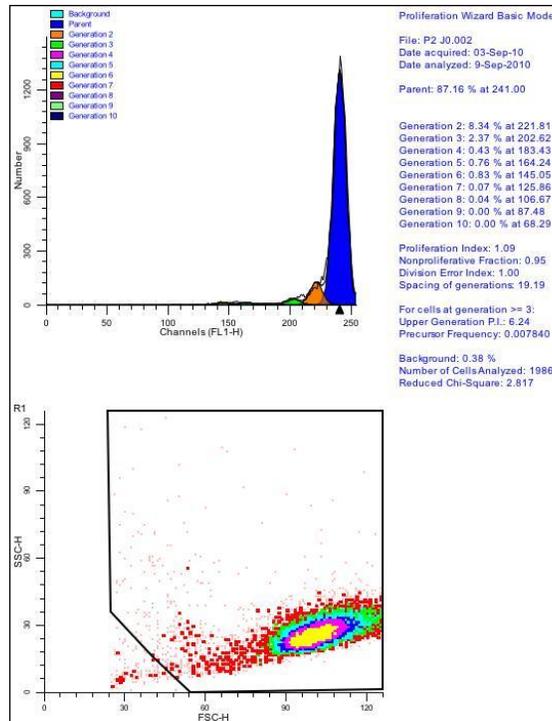


Figure 21: Modèle d'analyse généré par le logiciel Modfit LT™ (Verity software house) à partir des résultats enregistrés à J0 par le cytomètre de flux lors d'un test de prolifération utilisant la CFSE. Le pic généré par le logiciel servira de référence pour l'analyse des résultats obtenus à J6 avec les leucocytes provenant du même poisson.

L'analyse se fait sur l'ensemble de la population cellulaire moins les débris (discriminés en fonction de leur taille et complexité). En utilisant ce modèle en référence, chaque fichier du poisson correspondant enregistré à J6 est analysé à l'aide de l'outil « Proliferation Wizard » du logiciel Modfit (Figure 22).

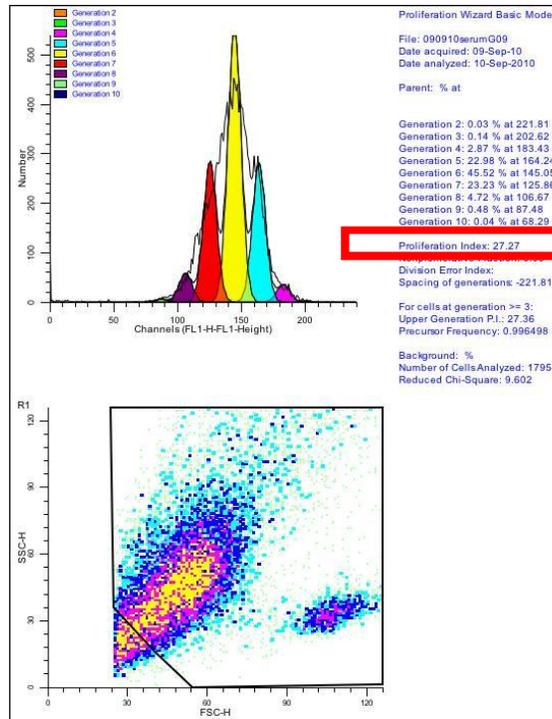


Figure 22 : Analyse des données de prolifération CFSE à J6 générée par le logiciel Modfit LT™ (Verity software house) utilisant comme base le modèle généré à J0 à partir des mêmes leucocytes intestinaux. A partir du pourcentage de cellules comprises dans chaque population filles (pics de différentes couleurs) le logiciel calculera l'indice de prolifération, encadré en rouge sur cet exemple, qui correspond à la somme de cellules présentes dans toutes les générations divisée par le nombre de cellules théoriquement présentes dans la population parente.

Après chaque analyse, le logiciel définit le nombre de générations successives créées depuis le début de la culture en se basant sur la baisse de fluorescence enregistrée et en considérant que celle-ci diminue de moitié après chaque mitose. A partir de là, le logiciel calcule également un index de prolifération correspondant à la somme de cellules présentes dans toutes les générations divisée par le nombre de cellules théoriquement présentes dans la population parente. C'est avec cette valeur que nous exprimons nos résultats. Un indice de prolifération élevé signifie donc qu'un plus grand nombre de division cellulaires ont eu lieu durant la culture. Cette méthode permet l'étude de la prolifération cellulaire induite par des mitogènes, l'étude de la modulation de cette prolifération par l'ajout de molécules dans le milieu de culture, mais permet également d'avoir une indication du nombre de division cellulaire de base survenant dans une culture non stimulée.

V. Analyse des paramètres moléculaires

5.1 Prélèvement et stockage des échantillons

Leucocytes : Les cellules immunitaires de rein antérieur et d'intestin isolées comme décrit dans le point 2.3 sont récoltées en culot sec dans un cryotube et congelées rapidement dans de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Afin de garantir un bon rendement en ARN au moment de l'extraction, chaque échantillon contient au maximum 1.10^7 cellules.

Tissus : Pour l'intestin, des morceaux d'environ 5mm^2 sont prélevés dans la partie antérieure et postérieure de l'intestin et mélangés dans le même cryotube. Le cryotube est ensuite plongé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

5.2 Extraction de l'ARNm et transcription inverse

L'ARNm total est extrait à partir des cellules isolées ou à partir d'un échantillon de tissu intestinal ou de rein antérieur. Les ARNm totaux sont extraits selon le protocole du RNeasy mini kit (Qiagen, réf. 74104) et RNase DNase (Qiagen, réf. 79254).

Avant de commencer l'extraction, différents tampons sont préparés au préalable. Les bases de ces différents tampons sont fournies dans le kit. Le tampon RLT est nécessaire à l'extraction des ARNm totaux à partir de cellules. Pour les tissus ou cellules riches en RNases, comme les cellules intestinales par exemple, il est recommandé d'ajouter $10\mu\text{l}$ de β -mercaptoethanol (β -ME) par ml de tampon RLT. Cette solution peut être conservée un mois à température ambiante. Le tampon RPE (fournit par le kit) ensuite, qui est le tampon de lavage, est dilué dans 4 volumes d'éthanol absolu avant la première utilisation. De même, une solution stock de DNase est préparée. Pour cela, la DNase I lyophilisée est dissoute dans $550\mu\text{l}$ d' H_2O RNase-free. Pour une meilleure conservation, il est conseillé de faire des aliquotes de $40\mu\text{l}$ qui serviront pour deux colonnes d'extraction. Ces aliquotes peuvent stockés à -20°C pendant 9 mois. Avant leur utilisation, $140\mu\text{l}$ de tampon RDD, fourni avec le kit RNase DNase, sont ajoutés à chaque aliquote.

Extraction de l'ARNm total: Les culots cellulaires et les morceaux de tissus sont repris dans $600\mu\text{l}$ de tampon de lyse RLT + β -ME et mélangés. Le lysat obtenu avec les culots cellulaires est homogénéisé durant 30s avec l'homogénéisateur manuel automatique (VWR). Pour le lysat obtenu avec les morceaux de tissus, il est nécessaire de poursuivre l'homogénéisation jusqu'à obtention d'une suspension homogène sans agrégat. La suite des étapes est identique pour les deux lysats. $600\mu\text{l}$ d'éthanol 70% RNase-free sont ajoutés à chaque suspension afin de précipiter les ADN et ARN, les extraits sont

immédiatement homogénéisés. 700µl sont ensuite transférés, en incluant les éventuels précipités, sur les colonnes fournies dans le kit RNeasy qui auront été préalablement placées sur des tubes de 2ml. Ces tubes contenant les colonnes sont ensuite centrifugés durant 30s à 16000g à 22°C. Cette dernière étape est répétée une nouvelle fois avec les 700µl d'échantillon restant. Un premier lavage est ensuite réalisé en versant 350µl de tampon RW1 sur la colonne, l'éluat est ensuite centrifugé pendant 30s à 16000g et 22°C. Afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant, chaque colonne est incubée pendant 15 minutes à température ambiante (TA) avec 80µl de DNaseI préparée comme expliqué précédemment. Après cette incubation, la colonne est lavée avec 350µl de tampon RW1 via une centrifugation de 30s à 16000g et 22°C. Après cette étape, la colonne est à nouveau lavée deux fois avec 500µl de tampon RPE, la première fois avec une centrifugation de 30s, 16000g, 22°C et la seconde fois avec une centrifugation de 2min, à 16000g et 22°C. Après ce dernier lavage le tube de collecte est remplacé par un nouveau tube propre de 2ml et la colonne est encore une fois centrifugée à 16000g TA pendant 3 minutes afin d'éliminer les dernières traces de tampon RPE. Pour finir, la colonne est placée sur un tube RNase-free de 1.5ml et 50µl d'H₂O RNase-free sont ajoutés afin d'éluer les ARN retenus sur la membrane de la colonne. L'ensemble est centrifugé pendant 2 min à 16000g et 22°C.

Dosage et vérification de la pureté de l'ARNm : Après l'extraction, l'ARNm total est dosé par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo). Cet instrument mesure également les valeurs des ratios 260/280 et 230/260 permettant d'évaluer la pureté des échantillons. L'absence de dégradation de l'ARN est ensuite vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. L'ARNm est déposé dans le puits d'un gel d'agarose 1% (1g par 100ml de TAE 1X RNase free + 3µl de GelRed ou SyBR safe) puis migre à 70volts pendant 60 à 90minutes. Les résultats sont observés grâce à la lecture de la fluorescence par le GelDoc (Biorad). L'absence de smir permet de vérifier la pureté de l'ARNm.

Stockage des ARNm : Une fois la qualité de l'ARN vérifiée et la quantité déterminée, les échantillons sont ajustés dans de l'H₂O RNase free afin d'obtenir une concentration de 1µg d'ARNm / 10µl d'eau. La totalité du volume de chaque échantillon est répartie en fractions de 10µl dans des tubes « RNase-free » de 200µl. Elles sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

5.3 Synthèse des ADNc à partir des ARNm

Afin d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc) des ARNm totaux extraits précédemment, une réaction de transcription inverse est réalisée grâce à l'enzyme Reverse transcriptase (RT). Cette réaction se réalise dans une microplaque Eppendorf Twin.tec de 96 puits RNase-free (ref :0030128672, Eppendorf) et pour chaque échantillon d'ARNm le mélange présenté dans le tableau 3 a été utilisé.

Tableau 3 : Composition du premier mélange réactionnel utilisé lors de la transcription inverse des ARNm en ADNc.

Réactifs	Volume en μ l
Random hexamer 50ng/l	1
dNTP 10mM	1
ARN 0.1 μ g/ μ l	10 (soit 1 μ g)

Le mélange est ensuite incubé à 65°C dans Mastercycler® ep realplex S2 (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pendant 5min pour éliminer les structures secondaires puis replacé à 4°C pour y rajouter les réactifs présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Composition du second mélange réactionnel utilisé lors de la transcription inverse des ARN en ADNc.

Réactifs	Volume en μ l
Tampon réaction 5X	4
dTT	2
RNase Out	0.5
M-MLV	1
H2O RNase free	0.5
Volume total	20

La microplaque est replacée dans Mastercycler® ep realplex S2 et le programme suivant est appliqué :

- Hybridation des random hexamers : 25°C - 10min
- Transcription inverse : 37°C - 1h
- Inactivation de l'enzyme : 70°C -15min

La quantité d'ADNc à synthétiser est déterminée en fonction du nombre de gènes à étudier. Le rendement de cette transformation n'étant pas de 100%, il est important de bien calculer à l'avance le nombre d'aliquotes d'ARNm provenant du même échantillon devant être transformé en ADNc nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses. Effectivement, afin de ne pas entraîner de biais dans

la mesure dus au rendement de ce processus, l'ensemble des ADNc ainsi obtenus seront mélangés pour chaque poisson et redistribués dans différents aliquotes de 10µl et stockés à -20°C afin d'éviter les décongelations et congélations répétées.

5.4 PCR temps réel

Les réactions en chaîne par polymérase en temps réel (q-PCR ou RT-PCR) sont réalisées avec le Mastercycler® ep realplex 2S suivant le protocole décrit précédemment par Bascope et al. en 2011.

Pour chaque échantillon, dans chaque puits sont déposés : 7.5µl de Mesa Fast qPCR MasterMix Plus dTTP for SYBR Assay No ROX (tampon réactionnel contenant la Taq polymérase ; le fluorochrome et les dNTP à la polymérisation de l'ADN, Eurogentec, Ref. RT-SY2X-03+NRWOUNF), 3.5µl d'H2O RNase-free, 1.5µl d'amorces sens à 1µM, 1.5µl d'amorces anti-sens à 1µM et 1µl d'ADNc à 0.1µg/µl. Soit un volume total de 15µl dans chaque puits.

Le programme de PCR utilisé est illustré dans la figure 23 .

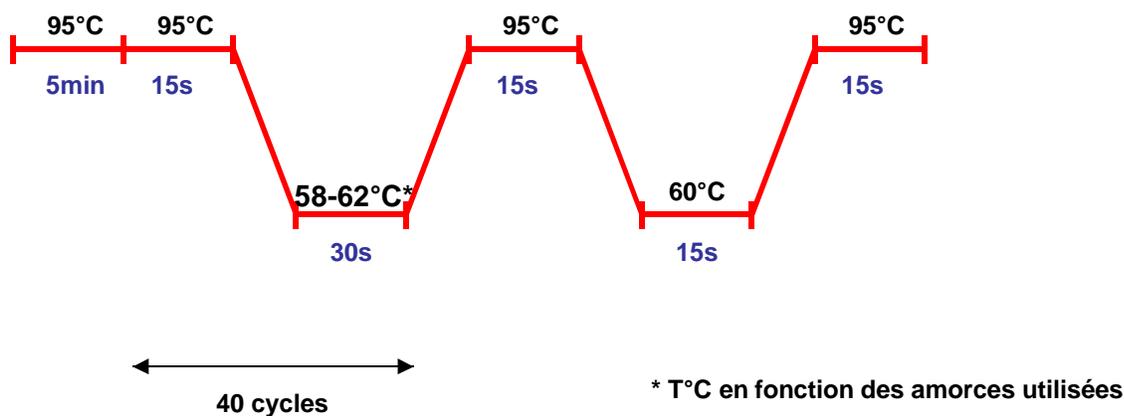


Figure 23 : Programme de PCR utilisé lors des analyses de PCR en temps réel.

5.5 Traitement des résultats

Dans ce travail, l'expression d'un gène d'intérêt dans une population test est mesurée de manière relative en fonction de l'expression du même gène dans une population témoin. Les quantités relatives seront exprimées en utilisant plusieurs gènes de références, selon les recommandations de Vandesompele et al. (2002). Il est à noter que l'ensemble des transformations de données décrites dans les prochains paragraphes sont effectuées individuellement pour chaque échantillons.

Transformation des valeurs de Ct : La première étape consiste à normaliser les valeurs de Ct obtenues pour un gène donné de façon à les exprimer comme une quantité relative. Cette quantité relative est mesurée en fonction de l'efficacité de PCR de la valeur de Ct la plus petite obtenue pour ce gène dans l'ensemble des échantillons des groupes test et témoin.

$$\text{Quantité relative} = E^{(Ct_{\min} - Ct_{\text{échantillon}})}$$

Normalisation en fonction des gènes de référence : Chaque gène de référence doit de préférence être un gène endogène existant à l'état d'une seule copie et d'expression constante. De plus, il doit être amplifié par PCR avec une efficacité similaire à celle du gène cible, quelle que soit la nature de l'échantillon étudié. Les gènes de référence sélectionnés dans notre étude sont : la GAPDH, la Cyclophilin, EF1- α et RPL1. Il est nécessaire de valider la stabilité d'expression du gène choisi comme référence en vérifiant au préalable que les niveaux d'expression de ce gène soient équivalents dans différentes conditions expérimentales. Pour cela nous utilisons le logiciel Genorm, un algorithme développé par Vandesompele et al. en 2002, qui permet de déterminer à partir d'un groupe de gènes de référence, lesquels sont les plus stables pour un essai donné. Une fois les gènes de références sélectionnés, un facteur de normalisation des gènes est calculé. Ce facteur correspond à la moyenne géométrique des quantités relatives des gènes de références sélectionnés par Genorm. La normalisation en fonction des gènes de référence correspond à la division des quantités relatives décrites dans le paragraphe précédent par ce facteur de normalisation.

Expression des résultats : La quantité relative ainsi normalisée (R) sera à nouveau exprimée en fonction de la valeur R la plus faible calculée dans l'ensemble des échantillons des groupes témoin et test.

$$R2 = R_{\text{échantillon}} / R_{\min}$$

La moyenne des R2 des échantillons de chaque groupe est calculée et le résultat final correspond à la moyenne des R2 du groupe test exprimée en fonction de la moyenne des R2 du groupe témoin.

$$R_{\text{norm}} = \text{Moyenne } R2_{\text{test}} / \text{Moyenne } R2_{\text{témoin}}$$

R_{norm} correspond donc à la différence d'expression d'un gène dans une population test par rapport à l'expression du même gène dans la population témoin.

VI. Optimisation de la PCR en temps réel des gènes d'intérêt

Lorsque l'on veut étudier l'expression relative d'un gène par PCR en temps réel pour la première fois il est impératif de procéder à différentes étapes d'optimisation de la méthode afin de s'assurer de l'exactitude des résultats ensuite obtenus. Avant la première mesure de l'expression d'un gène par PCR temps réel, une phase de mise au point est nécessaire afin de définir les amorces à utiliser, la température optimale d'hybridation des amorces et l'efficacité de la réaction.

La première étape de ces optimisations consiste à définir les amorces spécifiques du gène étudié. Les amorces spécifiques des gènes codant l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-8, l'IL-2, le CD3, le CD8 α , le CD8 β , Pax5, NKEF, les IgT, les IgM, T-bet, GATA3, l'IL4/13A, la GAPDH, la Cyclophillin, EF1- α et RPL1 ont été conçues en utilisant le logiciel Primer3, libre d'accès sur internet. Deux couples d'amorces sont définis pour chaque gène. Dans le cas d'une mesure par PCR temps réel, il est préférable que les amorces définies ne dépassent pas 20 paires de bases (pb), que leur pourcentage en base GC soit compris entre 40% et 60%, que les températures optimales d'hybridation théorique de deux amorces du même couple ne diffèrent pas de plus de 4°C et surtout que la taille de l'amplicon généré ne dépasse pas 200pb. Toutes ces conditions sont à définir dans le logiciel Primer3 qui générera des couples d'amorces correspondant au mieux à ces critères. Les amorces ainsi choisies sont commandées et générées sur le site internet du fournisseur Eurogentech.

Choix des amorces : pour définir quel est le meilleur couple d'amorces à utiliser pour chaque gène, une PCR temps réel est réalisée avec un calibrateur (mélange d'ADNc provenant de plusieurs poissons différents) pour chaque couple d'amorces donné. La PCR est réalisée à trois températures d'hybridation différentes : 58, 60 et 62°C afin de définir la température d'hybridation optimale. Pour chaque test il faut vérifier dans un premier temps si une amplification apparaît. Ensuite, en cas de signal positif, il faut s'assurer que la courbe de fusion ne présente qu'un seul pic (comme illustré sur la figure 24), ce qui signifie qu'un seul brin d'ADN est amplifié. Si ces deux conditions sont remplies, le couple d'amorces et la température sélectionnés seront ceux qui obtiennent la valeur de Ct la plus basse et la hauteur de plateau la plus haute. Il s'agit en effet de critères qui permettront une meilleure reproductibilité des mesures.

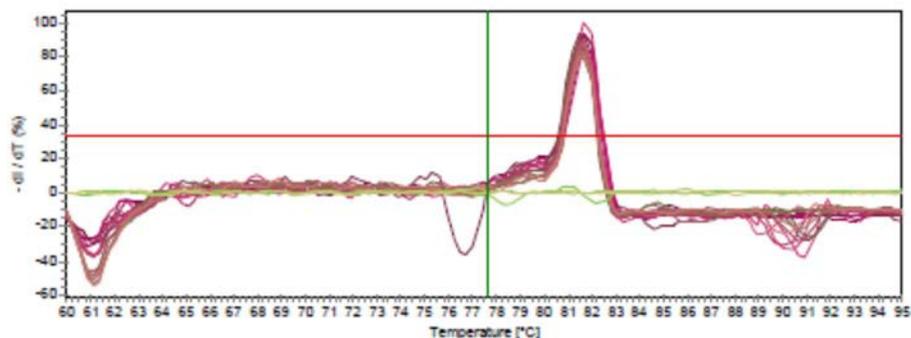


Figure 24 : Courbe de fusion correspondant à l'amplification du gène de la GAPDH à partir de l'ARNm extrait de cellules isolées d'intestin de truite arc-en-ciel.

Afin d'être totalement sûr qu'un seul brin d'ADN est amplifié une seconde vérification de la spécificité de la PCR est réalisée. En plus de la courbe de fusion éditée au moment de la PCR temps réel, la qualité des produits de PCR générés à partir des couples d'amorces sélectionnés précédemment est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (1g d'agarose + 100ml de TAE 1X + 3µl de GelRed), la migration se fait à 90V pendant 60 minutes. Cette électrophorèse permet de vérifier qu'une seule bande apparaît sur le gel et donc qu'un seul fragment d'ADN a été amplifié et que la taille de ce fragment correspond à la taille du fragment attendu. Si ces deux vérifications sont positives, l'ADN contenu dans la bande est purifié et ensuite digéré avec des enzymes de restriction précédemment sélectionnées en fonction de leur site de clivage présent dans l'amplicon attendu. Le clivage attendu sera ensuite vérifié par le biais d'une migration sur gel d'agarose avec de contrôler une dernière fois si le brin amplifié correspond réellement au transcrit que l'on veut étudié.

Efficacité de PCR : Pour chaque couple d'amorce et pour chaque type de tissus ou cellules utilisés, l'efficacité de la PCR est calculée. Pour cela partir du calibrateur (correspondant aux ADNc du tissus ou des cellules d'intérêt), une gamme de dilution au 1/2 comprenant 5 points est préparée. Cette gamme de dilution est déposée sur une microplaque et une réaction de PCR est réalisée avec un mélange réactionnel contenant les amorces (correspondantes au gène testé) avec la température d'hybridation optimale pour le couple d'amorce utilisé. Chaque mesure est réalisée en triplicats. A partir des résultats obtenus, le logiciel d'exploitation du Maxercycler Realplex S2 génère une droite de régression correspondant aux valeurs de Ct obtenus pour chaque concentration par rapport à la quantité théorique d'ADNc contenus dans chaque puits. A partir de cette droite, le logiciel déterminera l'efficacité de PCR qui est directement liée à la pente de la droite ($E = 10^{-1/\text{pente}}$), le logiciel calculera également le R^2 de la droite afin de vérifier la qualité de la dilution et des triplicats.

La mesure d'expression d'un gène est considérée comme correcte si les optimisations permettent d'obtenir une efficacité de réaction comprise entre 0.9 et 1.1 et un $R^2 > 0.9$.

Une fois ces mises au points réalisées pour chaque gène, l'analyse de l'expression des gènes dans les échantillons d'intérêt peut commencer.

VII. Statistiques

Nous avons utilisé différents tests statistiques afin de pouvoir analyser l'ensemble des données.

Pour la majorité des paramètres cellulaires c'est le logiciel Satbox Pro Agri® développé par Grimmersoft qui a été utilisé lors des analyses statistiques. Mais lorsque l'analyse statistique porte sur la comparaison de plus de deux populations et que celles-ci n'ont pas le même nombre de répétitions, c'est le logiciel Statgraphics® qui est utilisé. Il est également à signaler que tous les résultats correspondants à des proportions cellulaires (les pourcentages) sont modifiés avant d'être traités statistiquement. L'arc sinus de chaque pourcentage est mesuré et c'est cette valeur qui est utilisée lors du test statistique.

Les analyses de résultats correspondant à la comparaison de deux groupes de données, comme lors de la comparaison des paramètres intestinaux et systémiques ou lors de la comparaison des résultats de prolifération utilisant la méthode au BrdU et ceux utilisant la méthode au CFSE, se composent de tests de Student paramétriques lorsque les populations suivent la loi normale ou de tests de Mann-Whitney non paramétriques lorsque les populations ne suivent pas la loi normale. La normalité des populations est vérifiée dans chaque cas grâce à une représentation graphique des données. Pour l'ensemble de ces tests, les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a/b) lorsque la probabilité p est inférieure à 0,05.

Pour les analyses correspondant à la comparaison de plusieurs populations entre elles, comme lors de l'étude de l'effet de différentes doses de nucléotides sur les paramètres cellulaires, c'est une analyse de type ANOVA (comparaison de variance) qui est utilisée. Lorsque la valeur de la probabilité obtenue lors de l'ANOVA est faible, alors des tests de comparaison des moyennes (test de Newmann-Keuls et test de Bonferroni avec Satbox Pro Agri® ou test de l'intervalle LSD de Fisher avec Statgraphics®) sont effectués pour déterminer quels groupes sont significativement différents des autres. Lors de chaque analyse, des tests complémentaires comme la mesure d'un indice de normalité, une représentation graphique ou la mesure de l'écartype entre les résidus par le test du Khi², sont effectués en parallèle de la comparaison de variance afin de déterminer si la population de données suit la loi normale et donc si l'ANOVA est légitime. Dans les cas où ces tests préliminaires indiquent que la population ne suit pas la loi normale, les données seront analysées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les

différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a/b) lorsque la probabilité p est inférieure à 0,05.

Enfin pour l'analyse des données provenant des paramètres moléculaires, c'est-à-dire les résultats obtenus avec les PCR en temps réel, nous considérons observer une différence d'expression des gènes lorsque l'expression mesurée dans les leucocytes du groupe test est au moins deux fois plus forte ou plus faible que celle dans le groupe contrôle. Dans ces cas-là, nous utiliserons les mêmes tests statistiques que ceux décrits précédemment afin de déterminer si ces différences se révèlent être significatives ou non.

RESULTATS

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre d'introduction, un des objectifs du groupe de recherche en Nutrition et Santé des Poissons est l'étude du système immunitaire intestinal des poissons d'élevage dans le but de développer de nouveaux additifs alimentaires ayant des propriétés immunostimulantes. L'objectif final étant de limiter l'incidence des maladies d'origine bactérienne, virale ou parasitaire dans ces élevages. Afin de réaliser cet objectif, des outils permettant l'étude au niveau systémique des réponses immunes cellulaire et humorale ont été développés au sein de ce laboratoire. La mesure de ces réponses au niveau de la muqueuse intestinale a nécessité l'adaptation de ces méthodes à l'étude des cellules immunes intestinales. En ce qui concerne l'étude de la réponse humorale, il a été nécessaire de développer des techniques de biologie moléculaire qui n'étaient pas encore en place dans le laboratoire de DSM avec des outils adaptés à la truite. C'est pourquoi dans un premier temps j'ai mis au point ces nouvelles méthodes, notamment la technique de PCR en temps réel, au laboratoire SIMPA Stress, Immunité, Pathogènes du Pr JP Fripiat puis je les ai transposées dans un second temps au laboratoire de DSM Nutritional Products. Le développement de ces nouvelles techniques de biologie moléculaire a permis une étude de l'immunité intestinale plus approfondie par l'intermédiaire de la mesure de l'expression des gènes codant pour les cytokines inflammatoires, des marqueurs spécifiques des différents types de lymphocytes ou encore codant pour l'immunoglobulines T, une Ig spécifique de la muqueuse intestinale de la truite. Pour le moment très peu d'analyses au niveau protéique sont possibles chez la truite car peu d'anticorps spécifiques nous ont été disponibles.

I. Etude comparative de la réponse immune intestinale et systémique

Dans cette partie, nous avons utilisé des approches cellulaires et moléculaires pour étudier certaines fonctions de l'immunité innée et acquise au niveau de l'intestin et nous les avons comparées à celles du rein antérieur ou du sang périphérique de la truite arc-en-ciel. Ce travail de recherche a pour but d'améliorer les connaissances actuelles sur l'immunité intestinale de la truite arc-en-ciel. Il permettra le développement d'outils cellulaires et moléculaires afin d'étudier la modulation nutritionnelle de l'immunité intestinale. Dans cette première partie nous avons mis au point les techniques de purification des leucocytes intestinaux. Nous avons ainsi pu caractériser les différents types cellulaires qui composent ces suspensions puis nous avons étudié différentes fonctions de l'immunité innée et adaptative, toujours en comparant les résultats obtenus au niveau intestinal avec ceux obtenus au niveau systémique.

1.1 Caractérisation des types cellulaires dans le sang et le rein antérieur

Afin de déterminer les différents types cellulaires et leur proportion dans chacune des suspensions de leucocytes de sang périphérique et de rein antérieur nous avons réalisé des cytopsins de ces suspensions et les avons colorées selon la technique de May-Grünwald/Giemsa. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus après purification des leucocytes intestinaux obtenus selon deux méthodes différentes.

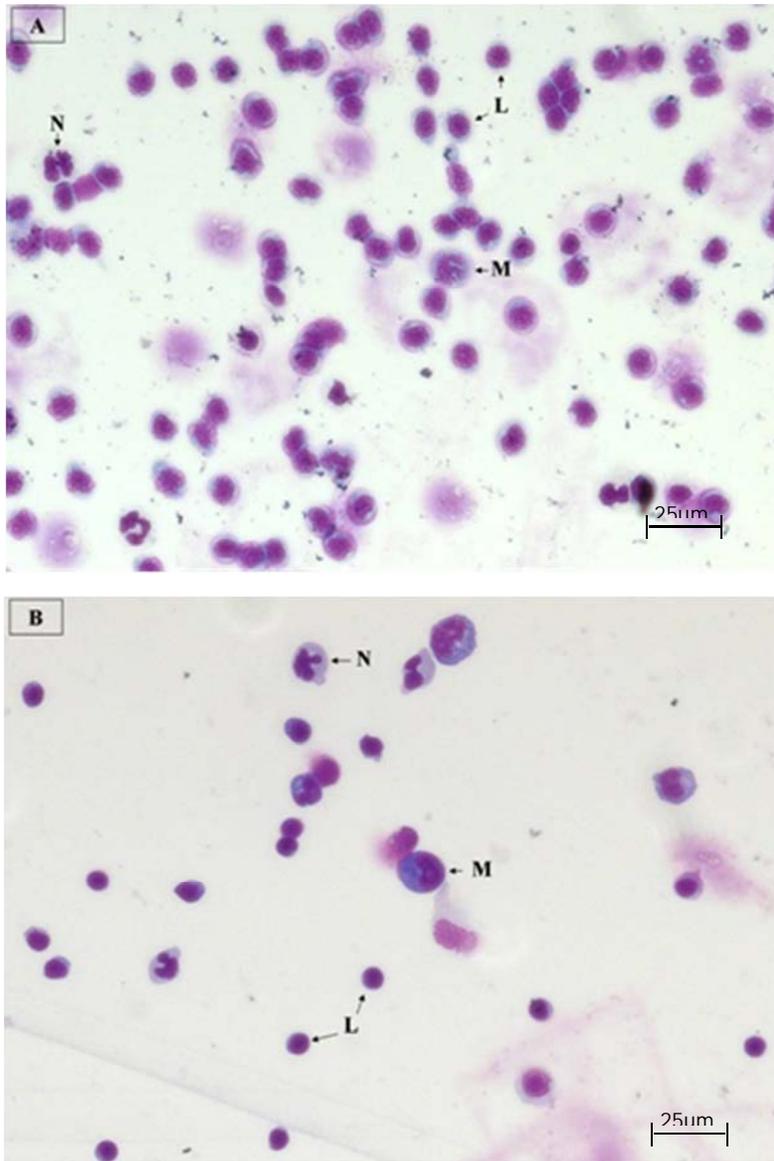


Figure 25 : Coloration au May-Grünwald / Giemsa de leucocytes purifiés de sang périphérique (A), de rein antérieur (B) : L = lymphocytes ; M = monocytes (sang périphérique) ; macrophages (rein antérieur) ; N = neutrophiles. Les cytopsins sont réalisées avec 50 µl de chaque suspension de leucocytes, fixées au méthanol et colorées. Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope Axio Scope (Zeiss) avec un objectif 40x (Grossissement = x400).

Ces observations microscopiques nous indiquent que les suspensions de sang périphérique contiennent :

- 88-97% de cellules de type lymphocytes (les NCC n'étant pas différenciables des lymphocytes lors d'une observation microscopique),
- 3-9% de monocytes,
- 1-3% de neutrophiles
- et moins de 0,4% d'autres types cellulaires, principalement des érythrocytes (Fig. 25A) ;

Les suspensions de leucocytes de rein antérieur contiennent :

- 49-66% de cellules type lymphocytes,
- 28-41% de macrophages,
- 5-13% de polynucléaires neutrophiles
- et moins de 1% d'autres types cellulaires, principalement des érythrocytes (Fig. 25B).

1.2 Méthodes de purification et caractérisation des types cellulaires présents dans les suspensions de leucocytes intestinaux

Afin de pouvoir étudier les fonctions immunitaires au niveau intestinal, la purification des leucocytes à partir de ce tissu a dû être mise au point. Deux approches ont été utilisées au cours de ce travail, une première utilisant différentes étapes de digestion chimique et enzymatique nommée par la suite « purification par digestion » puis, une seconde utilisant un broyage mécanique des tissus, nommée par la suite « purification mécanique ».

1.2.1 Etude des différents types cellulaires obtenus après purification par « digestion » ou « mécanique »

Nous avons, dans un premier temps, adapté la méthode d'isolement des leucocytes intestinaux de poisson décrite par Salinas et al. (2007). Cette méthode consiste en une double digestion, chimique puis enzymatique, des tissus intestinaux qui permettent de séparer les cellules des tissus. La suspension cellulaire est ensuite filtrée et lavée sur une colonne contenant de la laine de nylon afin de retenir un maximum de mucus. Les leucocytes présents dans cette suspension cellulaire sont ensuite isolés sur un gradient de densité (Ficoll Paque Plus) et lavés par centrifugation.

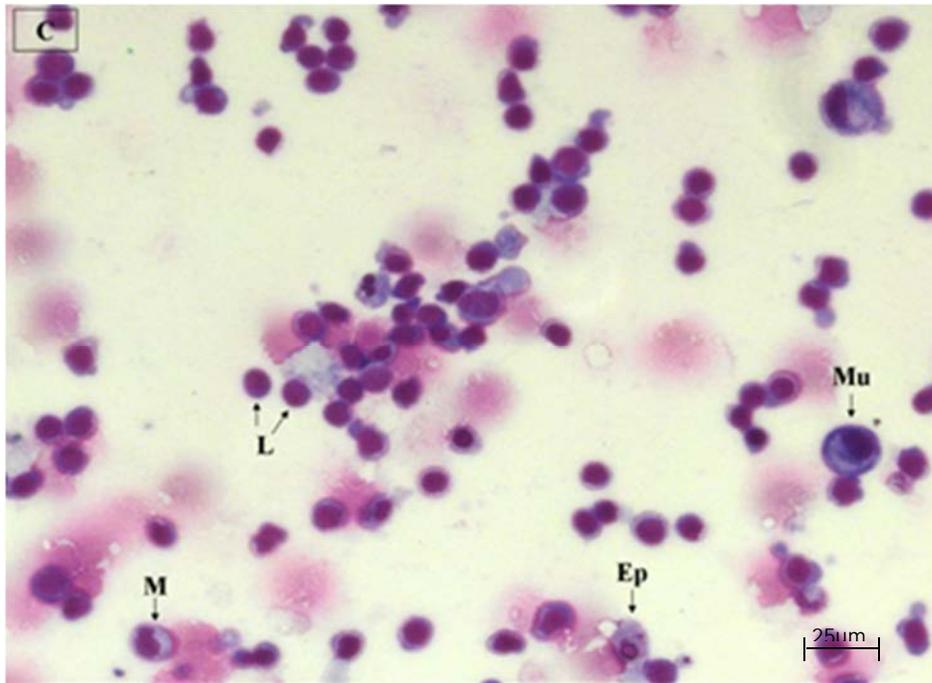


Figure 26 : Coloration au May-Grünwald / Giemsa de leucocytes purifiés d'intestin. L = lymphocytes. M= macrophages. Mu = cellules à mucus. Ep = cellules épithéliales. Les « cytopins » sont réalisées à partir de 50 μ l de chacune des suspensions de leucocytes, fixées au méthanol et colorées. Les lames sont observées sur un microscope Axio Scope (Zeiss) avec un objectif 40x (Grossissement =x400).

La figure 26 présente une illustration des différents types cellulaires obtenus après cet isolement. Cet isolement cellulaire, que nous nommerons l'isolement par « digestion » permet d'obtenir une suspension cellulaire contenant en moyenne, $2,9 \cdot 10^6$ leucocytes par intestin composée de :

- 70 à 79 % de cellules de type lymphocytes,
- 12 à 16 % de macrophages,
- 9 à 15 % d'autres types cellulaires (cellules épithéliales et cellules à mucus).

Le test de viabilité au bleu Trypan effectué après chaque isolement indique que plus de 90% de ces cellules sont vivantes. Cet isolement par digestion est celui qui a été utilisé lors de l'étude comparative des fonctions immunes intestinale et systémique ainsi que pour une partie de l'étude de la modulation de la réponse intestinale par les nucléotides correspondant aux résultats décrits dans la partie 2.1 du chapitre « Résultats ».

Dans un second temps, nous avons choisi de développer la méthode décrite par Takizawa et al. (2011) consistant en un broyage mécanique des tissus intestinaux à l'aide d'un Potter en verre permettant le détachement des cellules du tissu, puis à la séparation des leucocytes des autres cellules grâce à un gradient de densité (Ficoll Paque Plus). Cette technique d'isolement « mécanique », plus simple et plus

rapide que celle utilisée précédemment, permet d'obtenir en moyenne $9,7 \cdot 10^6$ leucocytes par échantillon d'intestin, composés de :

- 73 à 84 % de cellules de type lymphocytes,
- 13 à 23 % de macrophages,
- 4 à 9 % d'autres types cellulaires (cellules épithéliales et cellules à mucus).

A nouveau, le test de viabilité au bleu Trypan effectué après chaque isolement nous indique que plus de 90% de ces cellules sont vivantes après l'isolement. Cette méthode permet donc d'obtenir un rendement plus élevé en leucocytes dans un temps plus court. Cet isolement permet également de diminuer la proportion des cellules épithéliales et des cellules à mucus : 4 à 9% de contamination pour l'isolement mécanique et 9 à 15% pour l'isolement digestion et par conséquent d'augmenter les proportions de leucocytes

Les proportions cellulaires obtenues avec ces deux isolements sont différentes de celles observées dans les suspensions de leucocytes du rein antérieur et du sang périphérique. Les différences de proportion observées entre ces trois suspensions de leucocytes sont dues à la nature du tissu dont la composition cellulaire est différente, mais aussi aux différents protocoles utilisés pour extraire les leucocytes.

1.2.2 Evaluation du pourcentage de leucocytes en apoptose après purification

Afin de connaître l'influence de ces isolements sur l'état des cellules, nous avons mesuré le pourcentage de cellules en apoptose retrouvées dans chacune des suspensions directement après les deux isolements. La figure 27 indique que le pourcentage de leucocytes en apoptose après l'isolement mécanique est significativement plus faible qu'après isolement par digestion : 1.4% de cellules en apoptose contre 7.6% de cellules en apoptose, respectivement.

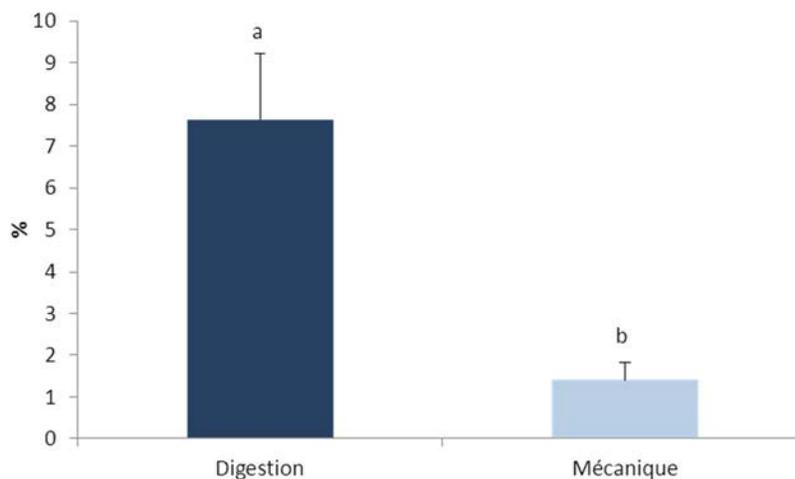


Figure 27 : Pourcentage de leucocytes intestinaux en apoptose. Ce pourcentage correspond au pourcentage de cellules marquées à l'annexine V -APC retrouvées dans les suspensions de leucocytes isolés analysées par cytométrie en flux directement après chacun des isollements. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$). (Test de Mann-Whitney, $n=6$; $p=0.003$)

Il semble donc que la méthode mécanique améliore la survie des leucocytes en culture *in vitro*. Dans la suite de nos études, nous avons étudié si ce nouvel isolement influence également les mesures des fonctions immunes intestinales.

1.3 Etude des principales fonctions de l'immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux et pathogènes. Elle englobe différents types de défense, des défenses constitutives comme les barrières épithéliales de la peau et des muqueuses ou le mucus et des défenses induites par différents types cellulaires comme la flambée respiratoire, la phagocytose ou la cytotoxicité naturelle et également la réponse inflammatoire.

1.3.1 La flambée respiratoire

La flambée respiratoire a tout d'abord été mesurée par chimiluminescence. Dans cette méthode de mesure, la flambée respiratoire totale (intra et extracellulaire) est mesurée grâce à la réaction lumineuse résultante de la mise en contact du luminol avec les dérivés oxygénés (H_2O_2 , O_2^-) produit par les phagocytes activés par du zymosan. Cette réaction lumineuse est enregistrée toutes les minutes pendant 180 min afin de dresser une cinétique de la flambée respiratoire pour chaque échantillon. Contrairement aux cellules du rein antérieur qui émettent une forte luminescence, un signal très faible a été obtenu avec les leucocytes intestinaux en utilisant cette méthode. L'aire sous la courbe (AUC)

mesurée à partir des différentes cinétiques à l'aide du logiciel Microwin® est égale en moyenne à $1.52 \pm 0.29 \text{ RLU} \times 10^6 / \text{min}$ avec les leucocytes intestinaux et à $704 \pm 32.7 \text{ RLU} \times 10^6 / \text{min}$ pour les leucocytes du rein antérieur. Cette faible réponse correspond à un signal se situant au niveau du bruit de fond de l'appareil et ne peut être quantifiée, même en augmentant le nombre de cellules au départ.

La méthode de chimiluminescence ne permettant pas de mesurer la flambée respiratoire dans les leucocytes intestinaux, nous avons ensuite essayé une méthode utilisant la cytométrie en flux. Dans cette seconde approche, le PMA induit la production de ROS (H_2O_2) qui est mise en évidence grâce à la dihydrorhodamine 123 (DHR 123), une sonde qui peut pénétrer dans le cytoplasme et réagir avec les H_2O_2 pour produire une molécule fluorescente. C'est donc la flambée respiratoire intracellulaire qui est mesurée avec cette approche. Lorsque la flambée respiratoire est mesurée à partir d'une suspension de leucocytes provenant du rein antérieur, un pic de fluorescence bien net est observable à T0. Au bout de 60 minutes nous observons un second pic correspondant à une population cellulaire émettant une fluorescence plus forte que celle du premier pic et correspondant donc aux phagocytes ayant produit des ROS intracellulaires (Figure 28).

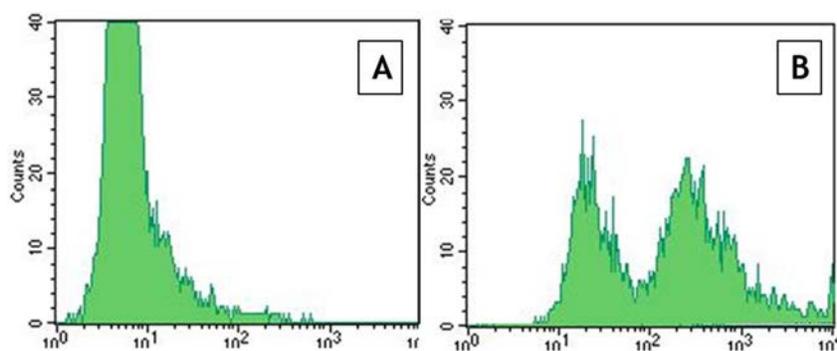


Figure 28 : Reproduction des histogrammes générés à T0 (A) et T60min (B) par le logiciel CellQuest pro® illustrant les pics de fluorescence obtenus lors de la mise en contact de la DHR 123 avec les dérivés oxygénés produits par des phagocytes isolés à partir du rein antérieur de truite arc-en-ciel. On observe bien dans la figure B l'apparition du second pic de fluorescence après 60 minutes de test correspondant au phagocytes ayant produit des ROS.

Ce pic de fluorescence permet alors de définir quelles cellules de la suspension émettent cette fluorescence et de procéder au traitement des résultats. En effet, seuls les phagocytes sont capables de flambée respiratoire, les cellules émettant une forte fluorescence étant de ce fait des phagocytes. A aucun moment, nous avons pu enregistrer un tel pic de fluorescence avec les leucocytes de l'intestin. Tous les leucocytes intestinaux semblent émettre un signal fluorescent, mais de très faible intensité correspondant à l'autofluorescence des cellules. De ce fait, il a été impossible de définir de manière précise la population de phagocytes et la réponse n'a pas non plus pu être quantifiée par cette méthode.

1.3.2. La phagocytose

La figure 29A montre que les phagocytes du rein antérieur et ceux de l'intestin ingèrent le même nombre de levures par cellule (2.7 à 3.1 levures en moyenne). Toutefois, le pourcentage de cellules ayant ingéré au moins une levure est trois fois plus élevé dans les suspensions de leucocytes du rein antérieur (45%) que dans celles de leucocytes intestinaux (15% ; Fig. 29B). Cette différence est confirmée par les indices de phagocytose qui sont également significativement différents : 113.3 ± 21.9 et 12.2 ± 1.84 respectivement pour les phagocytes du rein antérieur et les phagocytes intestinaux (figure 29C).

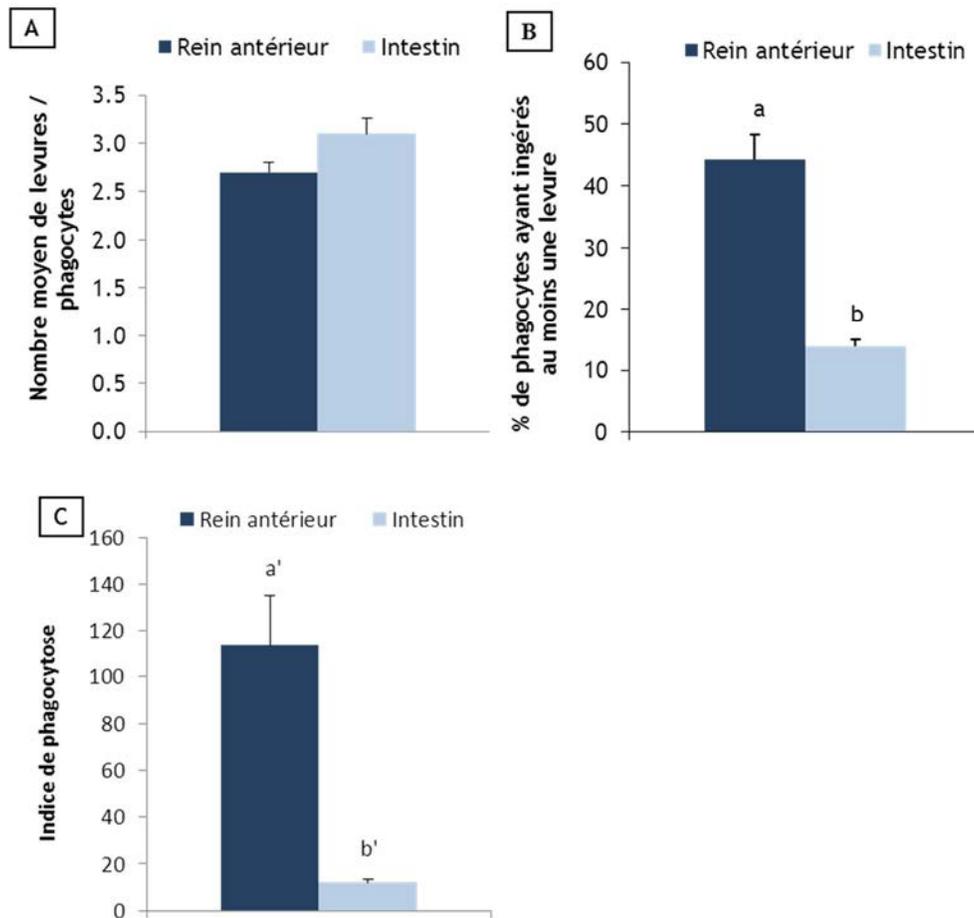


Figure 29 : Activité phagocytaire des leucocytes intestinaux et du rein antérieur. Les leucocytes de l'intestin ou du rein antérieur de truite arc-en-ciel ont été incubés pendant 4 h avec des levures (1 leucocyte pour 20 levures) dans la chambre de culture d'une lame de microscope. Après incubation, les phagocytes sont colorés au May-Grünwald /Giemsa et le nombre moyen de levures ingérées / phagocytes du rein antérieur de l'intestin (A), le pourcentage de phagocytes du rein antérieur ou de l'intestin ayant ingéré au moins une levure (B) ainsi que l'indice de phagocytose (C) des deux suspensions sont mesurés à partir de 200 cellules. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a=b et a'≠b'). (Tests de Mann-Whitney, n=6-9 ; p=0.091 pour A, p=25,8.10⁻⁵ pour B et p=26,6.10⁻⁵ pour C).

Ces observations basées sur l'analyse de 200 phagocytes (macrophages et neutrophiles pour le rein antérieur et juste macrophages pour l'intestin) montrent une différence dans la capacité de phagocytose des cellules de ces deux tissus.

Les indices de phagocytose calculés avec les phagocytes intestinaux ne diffèrent pas en fonction de l'isolement cellulaire utilisé (Figure 30). Et cela même si les phagocytes obtenus par l'isolement digestion ingèrent en moyenne plus de levures que ceux obtenus par l'isolement mécanique (3.1 ± 0.2 et 2.3 ± 0.1 levures par phagocytes respectivement, $p=0.03$). Par contre, le même pourcentage de phagocytes ayant ingéré au moins une levure est obtenu avec les deux types d'isolement ($13.9\% \pm 1.1$ et $12.9\% \pm 1.6$ respectivement ; $p=0.395$).

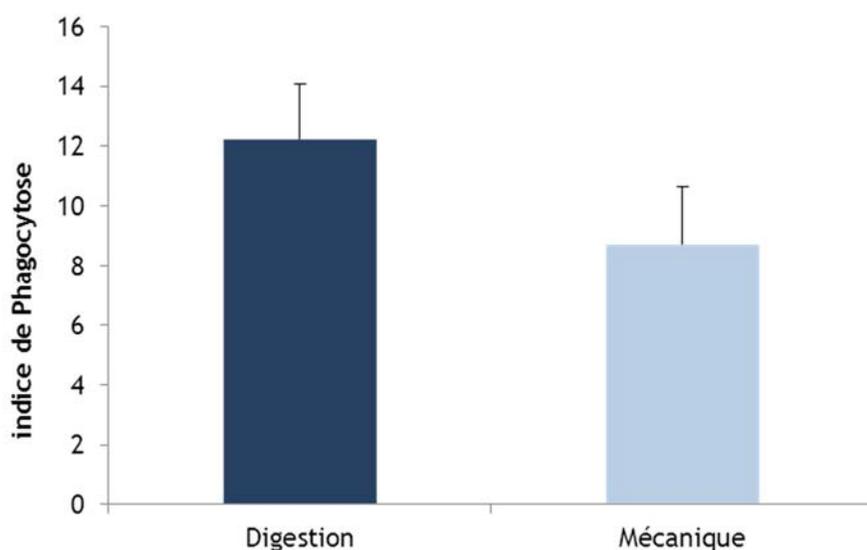


Figure 30 : Indice de phagocytose mesuré à partir de la phagocytose de levures par 200 phagocytes obtenus avec l'isolement digestion et mécanique et collés sur lame. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives. (Test de Mann-Whitney, $n=7-9$; $p=0.133$)

1.3.3 Cytotoxicité naturelle

Les NCC sont capables de détecter et de détruire, entre autres, des cellules infectées par des virus ou des cellules cancéreuses. Lors de cette étude, les activités cytotoxiques des NCC ont été mesurées à trois ratios différents de cellules effectrices par rapport aux cellules cibles : 5:1, 10:1 et 25:1 pour l'intestin et 25:1, 50:1 et 75:1 pour le rein antérieur. Les pourcentages de lyse obtenus à ces ratios sont de 3.79 ± 0.51 ; 5.20 ± 1.28 ; 13.2 ± 3.84 pour les leucocytes intestinaux et de 6.25 ± 1.65 ; 15.1 ± 3.50 et 25.9 ± 4.14 pour les leucocytes du rein antérieur. Nous avons ensuite déterminé les unités lytiques représentant l'activité cytotoxique naturelle de chaque poisson à partir des pourcentages de lyse obtenus aux différents ratios. Les NCC intestinales ont une activité cytotoxique moyenne de 55.0 ± 12.5 unités lytiques alors que l'activité cytotoxique des NCC du rein antérieur correspond en moyenne

à 21 ± 3.52 unités lytiques (Figure 31). Les NCC de l'intestin ont donc une activité cytotoxique deux fois plus élevée que celle des NCC du rein antérieur. Cela signifie qu'un nombre inférieur de NCC intestinaux sont nécessaires pour atteindre le même pourcentage de lyse.

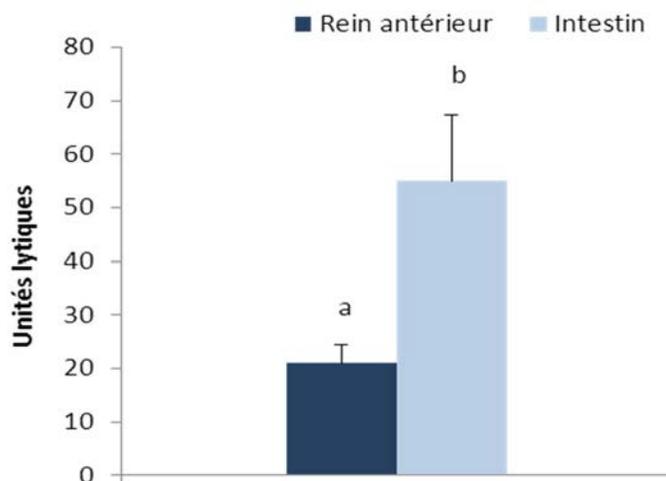


Figure 31 : Cytotoxicité naturelle des leucocytes du rein antérieur et de l'intestin. Les leucocytes sont incubés pendant 2h avec des cellules tumorales P815 à trois ratios de cellules effectrices / cibles différents : 5:1, 10:1 et 25:1 pour les leucocytes intestinaux et 25:1, 50:1 et 75:1 pour les leucocytes du rein antérieur. Les pourcentages de cellules cibles tuées par les cellules effectrices ont été déterminés pour les trois ratios et reportés sur un graphique. La régression linéaire déterminée à partir des pourcentages de lyse obtenus aux différents ratios, a permis la détermination des unités lytiques. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$). (Test de Mann-Whitney, $n=6$; $p=0.014$)

En parallèle du test cellulaire, nous avons étudié la cytotoxicité naturelle par le biais de la mesure de l'expression du gène codant NKEF, un gène renforçant l'activité des cellules cytotoxiques naturelles. Comme le montre la figure 32, l'expression du gène codant NKEF est cinq fois plus élevée dans les leucocytes de l'intestin que dans ceux du rein antérieur. Il semble donc que l'expression de gène NKEF soit corrélée à l'activité cellulaire mesurée précédemment et que l'activité cytotoxique naturelle soit plus importante dans l'intestin que dans le rein antérieur.

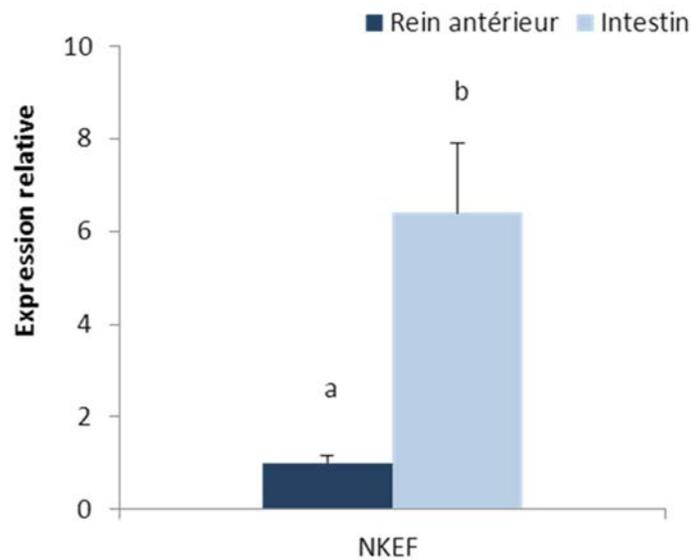


Figure 32 : Expression relative du gène codant NKEF dans les suspensions de leucocytes de l'intestin en fonction de l'expression du même transcrit dans les leucocytes du rein antérieur. Les expressions du gène NKEF ont été normalisée par rapport aux expressions des gènes de références cyclophiline et GAPDH. La moyenne des valeurs relatives obtenues pour l'expression de NKEF dans leucocytes du rein a été fixée à 1. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$). (Test de Mann-Whitney, $n=8-12$; $p=0.03$).

Concernant la comparaison entre les deux méthodes de purification des leucocytes intestinaux, la figure 33 indique que l'isolement utilisé a une forte influence sur l'amplitude des pourcentages de lyse mesurés. Nous remarquons que les pourcentages de lyse augmentent avec le ratio cellules effectrices : cellules cibles pour les deux isolements. Néanmoins ces pourcentages de lyses sont en moyenne 6 fois plus élevés pour les ratios 5 :1 et 10 :1 et 3 fois plus élevés pour le ratio 25 :1 avec l'isolement mécanique comparé à ceux obtenus avec l'isolement par digestion.

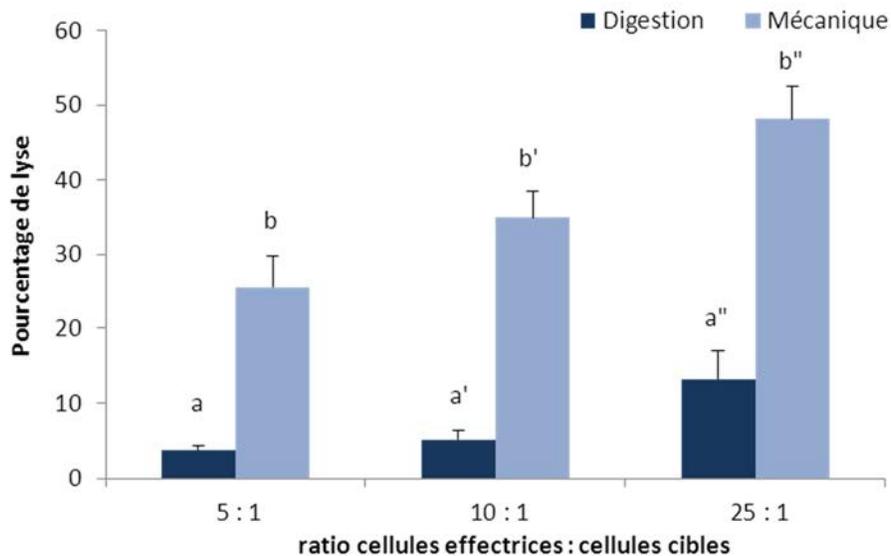


Figure 33 : Pourcentages de lyse obtenus aux ratios 5 : 1, 10 : 1 et 25 : 1 lorsque les cellules cytotoxiques naturelles isolées avec les deux techniques d'isolement sont mis en contact avec les cellules P815. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$, $a' \neq b'$, $a'' \neq b''$). (Test de Mann-Whitney, $n=6-9$; les valeurs de p aux trois ratios sont égales à $73,1.10^{-5}$)

Les NCC obtenues avec l'isolement mécanique ont donc une capacité de cytotoxicité naturelle plus importante que celle des NCC obtenues avec l'isolement par digestion. Cette différence peut provenir soit d'une augmentation de la proportion de NCC dans la suspension cellulaire, soit d'une amélioration de l'état physiologique des cellules. En l'absence d'anticorps spécifiques de ce type cellulaire chez la truite, il n'est pour le moment pas possible de quantifier ces cellules dans la suspension par cytométrie en flux. Il serait intéressant dans l'avenir de comparer à nouveau cette fonction intestinale à celle des NCC systémiques en utilisant l'isolement mécanique mais au regard de ces premiers résultats il semble que la cytotoxicité naturelle des NCC intestinaux reste plus forte que celle des NCC du rein antérieur.

1.3.4 Mesure de l'expression de cytokines inflammatoires par biologie moléculaire

Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α , produites essentiellement par les macrophages, jouent un rôle prépondérant dans la régulation des cellules phagocytaires et sont susceptibles d'intervenir dans chacune des étapes qui gouvernent la fonction pro-inflammatoire de ces cellules. Elles interviennent en particulier dans les phénomènes d'adhérence à l'endothélium, de déplacement orienté vers le site de l'agression, de phagocytose et d'activation des systèmes lytiques. Les macrophages produisent également l'IL-8 qui, elle, est impliquée dans le chimiotactisme.

Nous avons donc extrait les ARNm de ces trois cytokines des leucocytes purifiés par digestion à partir des reins antérieurs et de l'intestin, puis nous avons étudié leur niveau d'expression (Figure 34).

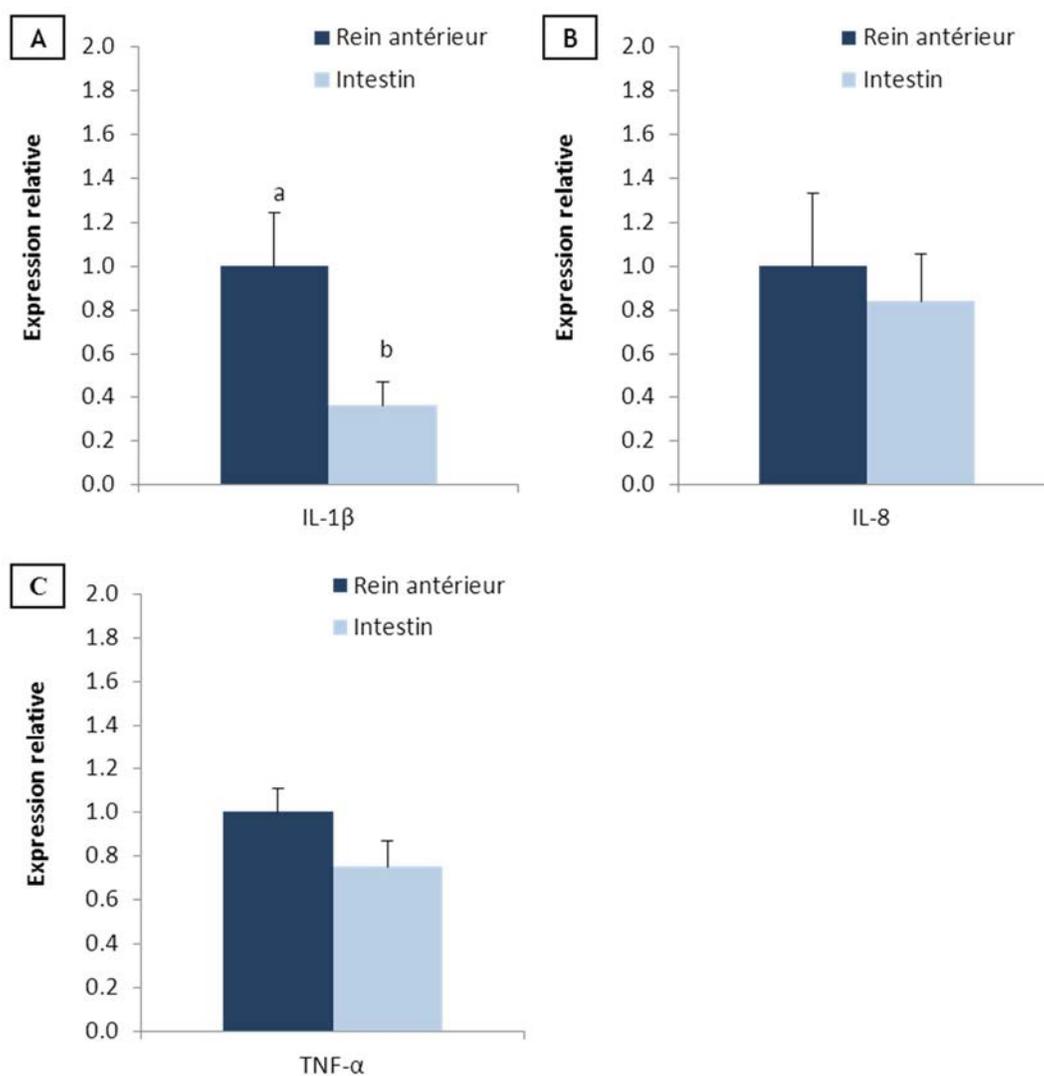


Figure 34 : Expression relative des gènes codants les cytokines inflammatoires IL-1 β (A), IL-8 (B) et TNF- α (C) dans les suspensions de leucocytes de l'intestin en fonction de l'expression de ces mêmes gènes dans les leucocytes du rein antérieur. Les expressions de l'IL-1 β et d'IL-8 ont été normalisées par rapport aux expressions des gènes de référence cyclophiline et GAPDH. L'expression du TNF- α a été normalisée par rapport à celle de la cyclophiline et de EF1- α . Les valeurs relatives obtenues pour les leucocytes du rein antérieur ont été définies comme égales à 1. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a \neq b). (Test de Mann-Whitney, n=8-12, p=0.01 pour A, p=0.38 pour B et p=0.06 pour C).

Les mesures par PCR temps réel ont montrés que ces trois cytokines s'exprimaient faiblement à la fois dans l'intestin et le rein antérieur. Les résultats présentés ici correspondent au niveau basal d'expression des cytokines dans les différents types cellulaires issus du rein antérieur et de l'intestin de poissons sains n'ayant été soumis à aucun pathogène. La figure 34 montre que les expressions relatives des gènes codant 'IL-8 et TNF- α sont équivalentes dans les leucocytes du rein antérieur et ceux de l'intestin alors que IL-1 β est trois fois moins exprimés dans les cellules intestinales que dans le

rein antérieur. Cette dernière observation pourrait être due à la faible proportion de macrophages retrouvée dans la suspension leucocytaire intestinale (Cf. 1.2) ainsi que leur faible capacité à phagocyter.

1.4 Etude des principales fonctions de l'immunité adaptative

Concernant l'immunité adaptative, nous avons étudié la réponse proliférative des lymphocytes à différents mitogènes puis nous avons mesuré l'expression des marqueurs cellulaires Pax5, CD3, CD8 α , CD8 β , des facteurs de transcription GATA3, T-bet, des cytokines IL4/13A et des chaînes lourdes d'IgM et d'IgT. Nous avons de plus déterminé l'apoptose des lymphocytes *ex vivo*.

1.4.1. Prolifération cellulaire

Lors des tests comparatifs de prolifération des lymphocytes intestinaux avec ceux du sang périphérique nous avons utilisé la méthode de mesure utilisant la fluorimétrie et une méthode utilisant un marquage au BrdU. Les leucocytes intestinaux ont été isolés par « digestion ». Les réponses prolifératives de ces deux suspensions ont été déterminées 72h après stimulation avec chacun des trois mitogènes : la PHA-P qui induit la prolifération des lymphocytes T, le LPS qui induit la prolifération des lymphocytes B et le PWM qui induit la prolifération des lymphocytes T et B.

Les résultats présentés dans la figure 35 indiquent que ces 3 mitogènes induisent la prolifération des lymphocytes du sang périphérique, les indices de prolifération mesurés étant en moyenne respectivement de 3.65 lors de la stimulation avec PHA-P, 10.1 avec LPS et 5.88 avec PWM. C'est donc le LPS qui induit la plus forte prolifération ce qui suggère une plus forte activation des lymphocytes B dans le sang de la truite. Par contre nous constatons que ces trois mitogènes n'induisent pas de prolifération des lymphocytes intestinaux (Figure 35), les indices de prolifération étant en moyenne égaux à 1 dans les trois cas.

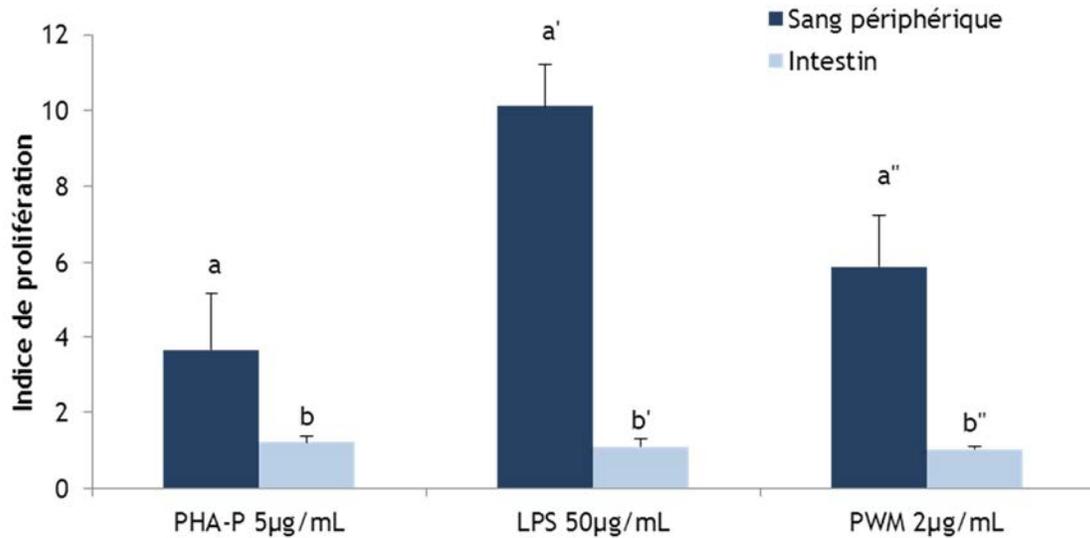


Figure 35 : Prolifération des leucocytes du sang périphérique et de l'intestin de truite arc-en-ciel en culture *in vitro* après stimulation par trois mitogènes (PHA-P, LPS et PWM). Pour chaque poisson, les cellules ont été cultivées avec ou sans mitogène. Les résultats représentent les indices de prolifération correspondant à la DO mesurée pour les échantillons cultivés en présence de mitogènes divisée par la DO déterminée pour les mêmes échantillons cultivés sans mitogène. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$, $a' \neq b'$, $a'' \neq b''$). (Tests de Mann-Whitney, $n=4-7$; $p=0.004$ pour PHA-P et LPS ; $p=0.005$ pour PWM).

Afin de vérifier si cette absence de prolifération n'est pas due à l'apoptose des lymphocytes en culture *in vitro*, nous avons déterminé le niveau d'apoptose grâce à la détection de l'annexine V-APC par cytométrie de flux dans nos préparations de leucocytes après 4h de culture *in vitro* (fig. 36). Ces tests montrent qu'en moyenne, 80% des lymphocytes intestinaux ne sont pas en apoptose. De plus, les préparations de leucocytes intestinaux contiennent également moins de 1% de cellules en phase de nécrose (marquage cellulaire à l'iodure de propidium, données non présentées). Donc l'absence de réponse aux mitogènes n'est pas due à la méthode de préparation des cellules intestinales, plus complexe et plus longue que celles des leucocytes sanguins.

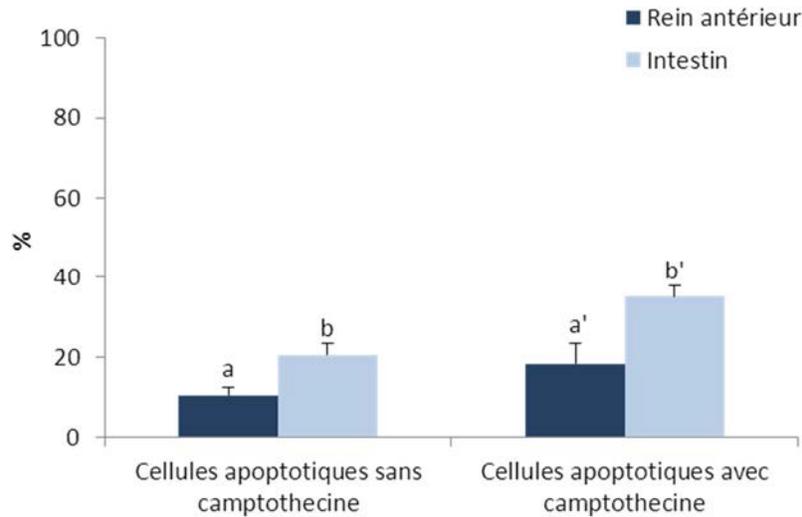


Figure 36 : Pourcentages de lymphocytes en apoptose présents dans les cultures *in vitro* de leucocytes intestinaux et de rein antérieur avec ou sans ajout de camptothécine dans le milieu. Les analyses ont été effectuées par cytométrie en flux sur 10000 événements, le résultat correspond au pourcentage de lymphocytes exprimant l'annexine V. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a \neq b, a' \neq b'). (Tests de Mann-Whitney, n=6 ; p=0.008 et p=0.012).

Par la suite, plusieurs paramètres des conditions de cultures des lymphocytes intestinaux utilisés lors de ces tests ont été modifiés, comme la durée de culture (4, 5 ou 6 jours), la concentration cellulaire ($3 \cdot 10^5$ et $4.5 \cdot 10^5$ leucocytes/puits) ou encore la concentration en mitogènes (dose-réponse avec PHA-P et LPS) mais sans que cela n'améliore la réponse mesurée. En effet, à chaque fois un indice de prolifération en moyenne égal à 1 a été déterminé. Nous avons ensuite testé de nouveau la prolifération cellulaire par la fluorimétrie, mais à partir de culture de leucocytes intestinaux obtenus par la technique d'isolement mécanique. A nouveau, les indices de prolifération n'ont pas dépassé 1. Malgré toutes ces tentatives d'optimisation, il n'a pas été possible dans nos conditions de culture actuelles de mesurer une prolifération des lymphocytes intestinaux lorsque ceux-ci sont stimulés avec les mitogènes PHA-P, LPS ou PWM.

Nous avons alors décidé d'utiliser une autre technique d'étude de la prolifération cellulaire en utilisant un marquage des cellules avec du CFSE et une lecture des résultats par cytométrie en flux. Le principe de cette technique repose sur la propriété du CFSE à être réparti de manière équivalente dans le cytoplasme des cellules filles lors des divisions cellulaires successives. L'intensité de fluorescence des cellules diminue donc au fur et à mesure des divisions. Ici, l'indice de prolifération mesuré reflète le nombre de division cellulaire successive des lymphocytes durant la culture *in vitro*, un indice élevé signifiant donc qu'un plus grand nombre de division cellulaires ont eu lieu durant la culture. L'utilisation de la cytométrie à la place de la fluorimétrie permet de cibler l'étude uniquement sur la

population de lymphocytes et de pouvoir ainsi observer plus précisément le devenir de ces cellules lors de la culture cellulaire.

Grâce à cette nouvelle méthode nous avons donc pu étudier la prolifération des cellules intestinales lors d'une culture *in vitro* de 6 jours sans stimulation mitogénique. Nous avons ensuite comparé ces résultats avec ceux obtenus avec des lymphocytes du sang périphérique.

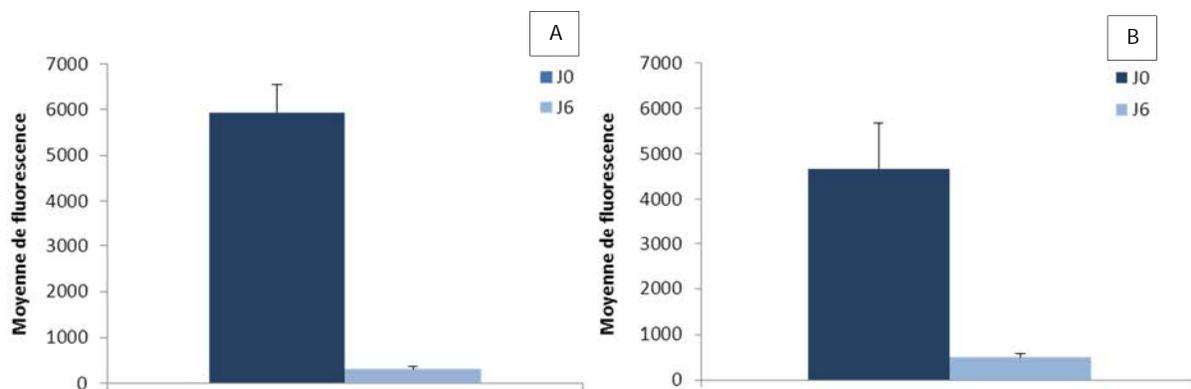


Figure 37 : Moyennes de fluorescence mesurées par Cellquest Pro au Jour 0 et Jour 6 de culture des leucocytes de sang périphérique (A) ou intestinaux (B) de neuf poissons sans stimulation par des mitogènes. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM.

Les résultats présentés sur les figures 37 A et B montrent que les moyennes de fluorescence décroissent fortement entre le jour 0 de mise en culture des leucocytes et le jour 6 à la fois pour le sang périphérique et pour l'intestin. Néanmoins cette décroissance est plus faible pour les leucocytes intestinaux. Effectivement la moyenne de fluorescence passe de 5944 à 310.9 soit une baisse de fluorescence de 95% pour le sang périphérique alors que pour l'intestin, la moyenne de fluorescence passe de 4671 à 491.7 soit une baisse de fluorescence de 89.5% (figure 38A). La viabilité de ces cellules a été testée au 6^{ème} jour de culture par un marquage à l'iodure de propidium et moins de 10% de mortalité ont été observés dans les deux cas.

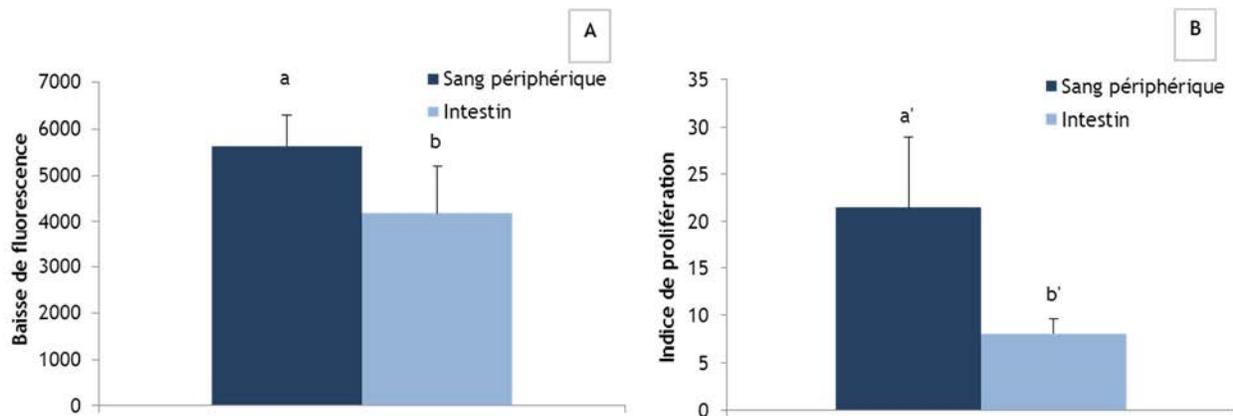


Figure 38 : A : Baisse de fluorescence moyenne observée entre le Jour 0 et le jour 6 lors de la mise en culture de leucocytes purifiés de sang périphérique et d'intestin. B : Indices de prolifération obtenus pour ces mêmes suspensions de leucocytes correspondants au nombre de cellules retrouvées dans les générations filles divisé par le nombre théorique de cellules présentes dans la génération parent. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$ et $a' \neq b'$). (Tests de Student, $n=9$; $p=0.001$ pour A ; $p=26,6 \cdot 10^{-5}$ pour B).

Les indices de prolifération déterminés à l'aide du logiciel ModFit pour les cultures de leucocytes de sang périphérique et d'intestin sont présentés dans la figure 38B. Nous constatons que l'indice de prolifération mesuré pour les leucocytes de l'intestin (8.01 ± 1.55) est significativement plus faible que celui mesuré pour le sang périphérique (21.5 ± 7.48) et est corrélé à la baisse de fluorescence présentée dans la figure 38A.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats montre que les leucocytes intestinaux se divisent lors de la culture même si ces divisions cellulaires restent plus faibles que celles observées dans le cas d'une culture de leucocytes de sang périphérique (Figure 38B).

Cette nouvelle méthode d'analyse de la prolifération utilisant le marquage des cellules par le CFSE mesuré ensuite par cytométrie en flux nous a donc permis d'obtenir des informations supplémentaires sur le maintien des leucocytes intestinaux en culture *in vitro* et permet une analyse plus précise que la méthode utilisant la fluorimétrie. C'est donc cette méthode qui sera utilisée à l'avenir lors des tests de prolifération cellulaire, au niveau de l'intestin de truite.

La figure 39 indique que les leucocytes intestinaux préparés d'après la méthode d'isolement mécanique ont un indice de prolifération significativement plus élevé que ceux obtenus selon la technique utilisant la digestion.

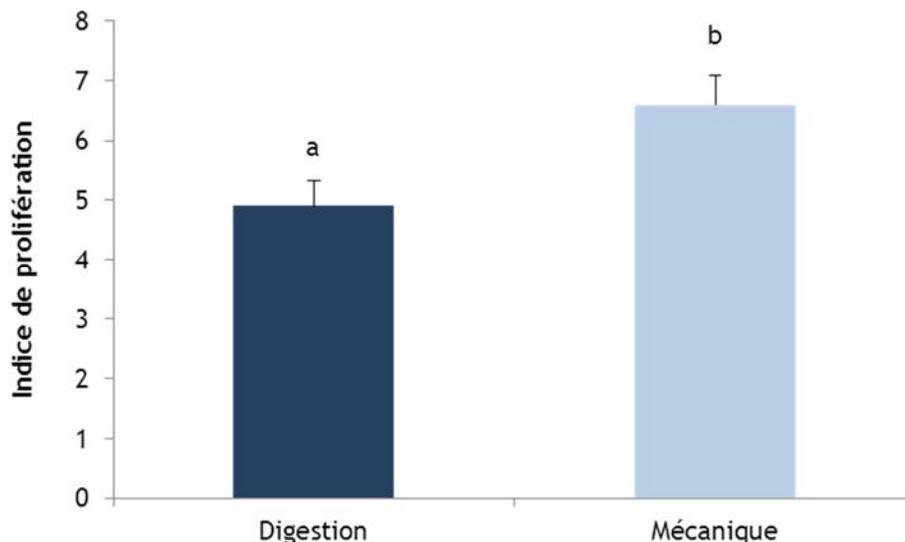


Figure 39 : Indice de prolifération correspondant au nombre de cellules retrouvées dans les générations filles divisé par le nombre théorique de cellules présentes dans la génération parent mesuré à partir des données de fluorescence enregistrées après 6 jours de culture *in vitro* par cytométrie de flux. Les leucocytes intestinaux isolés selon les deux techniques ont été marqués à J0 avec du CFSE puis mis en culture pendant 6 jours, dans du RPMI1640 supplémenté. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$). (Test de Student, $n=8$; $p=0.006$).

Dans le cadre de ce test la prolifération des cellules n'a pas été induite par des mitogènes, il s'agit donc là de la prolifération de base des leucocytes intestinaux en culture *in vitro*. Ces résultats semblent indiquer que les leucocytes obtenus avec l'isolement mécanique sont plus aptes à proliférer en culture *in vitro* que ceux obtenus avec l'isolement digestion.

1.4.2 Mesure de l'expression de gènes liés aux lymphocytes T et B et à leurs différentes fonctions

Ne possédant pas d'anticorps spécifiques de marqueurs des lymphocytes de truite, il n'a pas été possible d'utiliser la cytométrie en flux pour mettre en évidence les différents types cellulaires présents dans les tissus étudiés. Nous avons donc développé des analyses de biologie moléculaire basées sur l'expression de gènes spécifiques des différents types cellulaires d'intérêt. Les ARNm codant CD3 et Pax5, deux marqueurs spécifiques des lymphocytes T et B, ont été quantifiés par la méthode de PCR en temps réel permettant ainsi d'approfondir nos études de la prolifération de ces deux types de lymphocytes. Nous avons également quantifié les ARNm codant CD8 α et β , T-bet, IL-4/13A et GATA-3

afin d'approfondir l'étude des sous-populations de lymphocytes T et d'avoir une information sur la réponse des lymphocytes cytotoxiques, Th1 et Th2 de la truite arc-en-ciel, ce que ne nous permettaient pas les études cellulaires. Nous avons également mesuré l'expression des gènes codant les chaînes lourdes d'IgT et d'IgM dans les suspensions de leucocytes d'intestin et de rein antérieur. Tous les résultats de biologie moléculaire présentés dans le cadre de cette étude pour la partie intestinale sont mesurés à partir de cellules obtenues après purification par digestion.

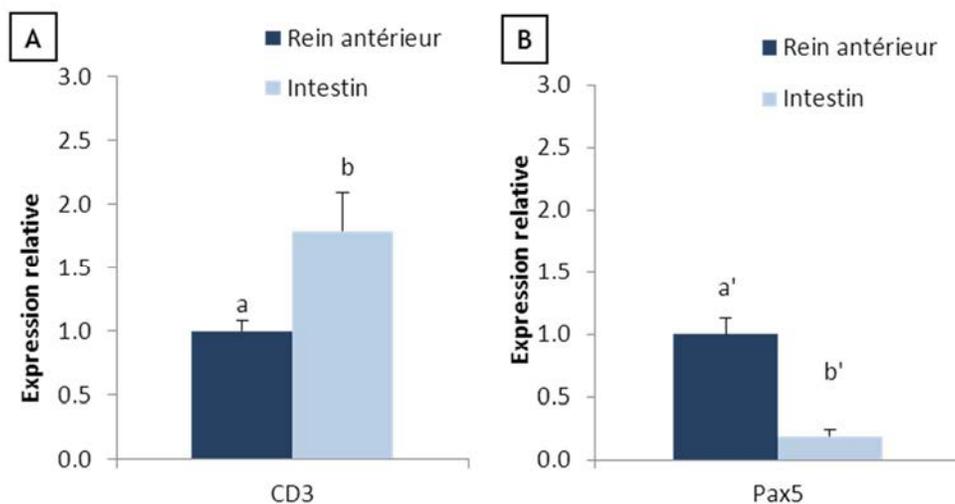


Figure 40 : Expressions relatives des gènes codant CD3 (marqueur des lymphocytes T, A) et Pax5 (marqueur des lymphocytes B, B) dans les suspensions de leucocytes de l'intestin en fonction des expressions des mêmes gènes dans les leucocytes du rein antérieur de truites. Les expressions relatives de CD3 et Pax5 sont normalisées par rapport à l'expression des gènes de référence EF1- α et cyclophiline. Les valeurs relatives obtenues avec les cellules du rein sont définies comme égales à 1 et les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a**≠**b et a'**≠**b'). (Tests de Student, n=12, p=0.007 pour A et p=24,6.10⁻⁷ pour B).

Les résultats présentés dans la figure 40 indiquent que l'expression relative du gène codant CD3 (marqueur spécifique des lymphocytes T) est significativement plus élevée dans les leucocytes intestinaux que celle mesurée dans les leucocytes. Néanmoins nous constatons que l'expression de ce marqueur au niveau intestinal n'est pas deux fois plus élevée que celle du rein antérieur. Il serait donc intéressant de mesurer l'expression des gènes codant les sous types des lymphocytes T afin de confirmer cette observation. Par contre l'expression du gène codant Pax5 (marqueur spécifique des lymphocytes B) est cinq fois plus faible dans l'intestin que dans les préparations cellulaires de rein antérieur.

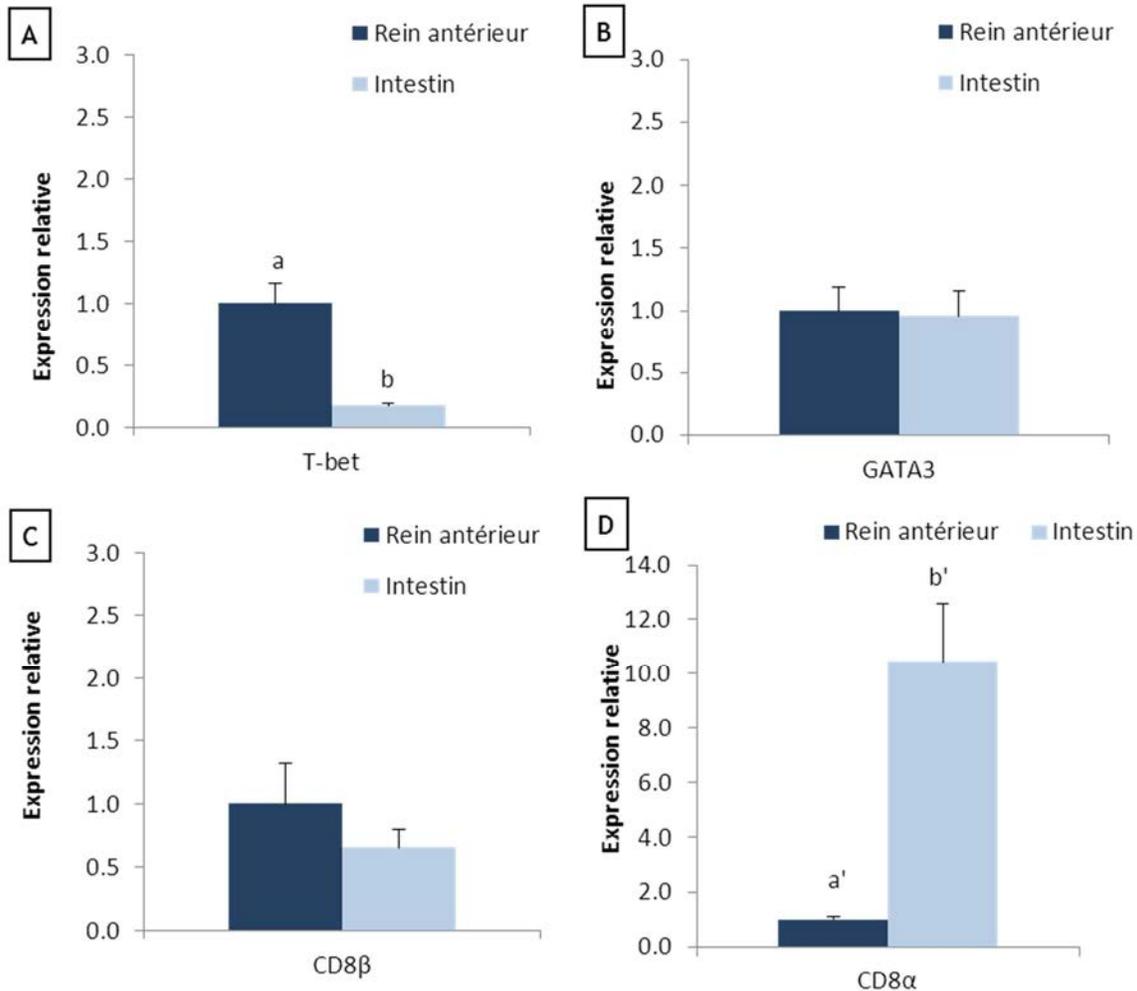


Figure 41 : Expressions relatives des gènes codant T-bet (A), GATA3 (B), CD8B (C) et CD8α (D) dans les leucocytes de l'intestin en fonction des mêmes expressions dans les leucocytes du rein antérieur de truites arc-en-ciel. Les expressions relatives de ces gènes sont normalisées par rapport aux expressions des gènes de référence cyclophiline, EF1-α et GAPDH. Les valeurs relatives obtenues avec les cellules du rein sont définies comme égales à 1 et les résultats sont exprimés comme des moyennes ± SEM. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$ et $a' \neq b'$). (Tests de Student, $n=12$, $p=16,1 \cdot 10^{-6}$ pour A, $p=0.36$ pour B, $p=0.147$ pour C et $p=60,6 \cdot 10^{-6}$ pour D).

Les figures 41A et 41B indiquent que les gènes codant GATA3 s'expriment de manière équivalente dans les deux préparations de leucocytes alors qu'une plus faible quantité relative d'ARNm codant T-bet est mesurée dans les leucocytes intestinaux. Les figures 41C et 41D montrent elles, qu'il n'y pas de différence significative d'expression du gène codant CD8B entre les préparations leucocytaires de l'intestin et du rein antérieur mais que l'expression du gène codant CD8α est 10 fois plus élevée dans les préparations intestinales par rapport à celles du rein antérieur. Ces résultats suggèrent une proportion ou une activation plus élevée des lymphocytes cytotoxiques dans les suspensions intestinales, la plupart de ces lymphocytes cytotoxiques exprimant la forme homodimère αα du CD8.

Afin d'approfondir l'étude concernant la réponse Th2 chez la truite arc-en-ciel nous avons utilisé les amorces conçues par Takizawa et al. (2011) pour quantifier les ARNm codant pour IL-4/13A dans les préparations leucocytaires de l'intestin et du rein antérieur. Cependant les valeurs de Ct obtenues étaient toujours ≥ 35 cycles, empêchant de ce fait la quantification de ces ARNm avec notre approche de PCR en temps réel. Nous avons défini deux autres paires d'amorces, mais celles-ci n'ont pas non plus permis l'amplification de ce transcrit. Ces résultats témoignent d'une très faible expression des gènes codant IL-4/13A à la fois au niveau systémique et intestinal.

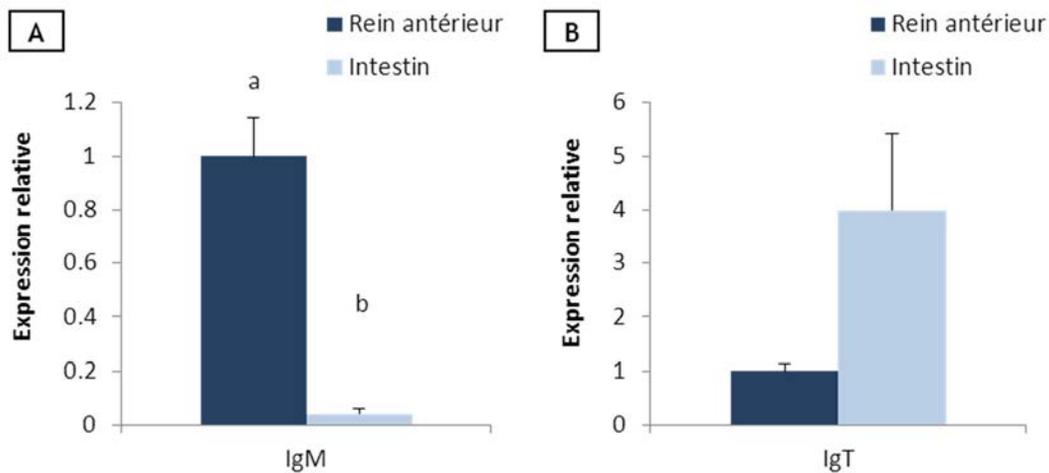


Figure 42 : Expressions relatives des gènes codant la chaîne lourde d'IgM (A) et d'IgT (B) dans les leucocytes de l'intestin en fonction des mêmes expressions dans les leucocytes du rein antérieur. L'expression des chaînes lourdes d'IgM a été normalisée par rapport aux expressions des gènes de référence cyclophiline, EF1- α et GAPDH. L'expression des chaînes lourdes d'IgT a été normalisée par rapport aux expressions de la cyclophiline et d'EF1- α . Les valeurs relatives obtenues avec les cellules du rein sont définies comme égales à 1 et les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$ et $a' \neq b'$). (Tests de Student et de Mann-Whitney, $n=12$, $p=0.00$ pour A et $p=0.124$ pour B).

Concernant les lymphocytes B, les résultats (fig. 42) illustrent une surexpression significative des gènes codant la chaîne lourde d'IgM dans les suspensions leucocytaires de rein antérieur par rapport aux suspensions intestinales. Par contre, il semble que le gène codant la chaîne lourde d'IgT soit 4 fois plus exprimé dans les suspensions leucocytaires intestinales par rapport à celle du rein antérieur, même si cette différence n'est pas significative du fait de fortes variations individuelles.

II. Modulation de la réponse intestinale par les nucléotides

Durant la seconde étape de ce travail de thèse, nous avons utilisé les outils cellulaires et moléculaires développés pour l'étude des fonctions immunes intestinales afin d'évaluer l'effet d'un ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel sur la réponse immune intestinale.

2.1 Modulation de la réponse immune intestinale de la truite arc-en-ciel par un régime alimentaire supplémenté en nucléotides

Dans ce premier essai nous avons étudié la modulation entraînée par l'ajout de différentes doses de nucléotides (600ppm et 3000ppm) dans l'alimentation des truites sur l'expression des gènes codant les cytokines inflammatoires (IL-1 β et TNF- α), la prolifération cellulaire, l'expression des gènes des marqueurs spécifiques des lymphocytes B et T (Pax-5 et CD3) et sur l'expression des gènes codant pour IgT. Dans cet essai, les leucocytes intestinaux ont été isolés selon la méthode de purification par digestion.

2.1.1 Effet des nucléotides sur l'expression des cytokines inflammatoires

Les résultats présentés dans la figure 43 nous indiquent que l'ajout de nucléotides à l'alimentation des truites arc-en-ciel n'influence pas l'expression des gènes codant les cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-8.

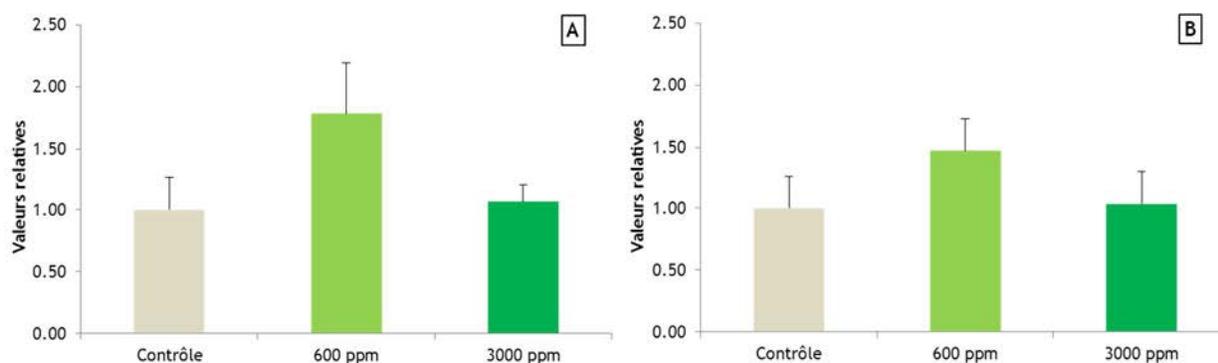


Figure 43 : Expression relative des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (A) et IL-8(B) déterminée par PCR en temps réel dans des leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté avec 600 et 3000ppm de nucléotides en fonction de l'expression des mêmes cytokines dans des leucocytes intestinaux issus de poissons contrôles. L'expression des cytokines a été normalisée par rapport à celle de la GAPDH, de la cyclophiline et de EF1- α . Les valeurs relatives obtenues pour les leucocytes du groupe contrôle ont été définies comme égales à 1. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives. (ANOVA 1 facteur, n=12, p=0.104 pour A et p=0.349 pour B).

Les mesures effectuées par PCR en temps réel témoignent également de la faible expression des ARNm de ces deux cytokines dans les leucocytes intestinaux quel que soit la dose de nucléotides ajoutée à l'aliment. Ces faibles expressions sont dues au fait que les mesures ont été effectuées sur des poissons sains pour lesquels aucune inflammation n'a été induite.

2.1.2 Effets des nucléotides sur la prolifération des lymphocytes intestinaux

La figure 44 présente les indices de prolifération mesurés après 6 jours de culture *in vitro* des leucocytes intestinaux prélevés sur des truites nourries avec un aliment supplémenté ou non en nucléotides. Lors de cette étude nous avons mesuré la prolifération cellulaire avec la méthode utilisant un marquage des cellules au CFSE et une lecture par cytométrie en flux. Ces indices de prolifération sont de 9.63 ± 0.90 pour le groupe contrôle ; 12.03 ± 0.59 pour le groupe de poissons nourri avec un aliment supplémenté de 600ppm de nucléotides et de 12.20 ± 1.09 pour le groupe de poissons nourris avec un aliment supplémenté de 3000ppm de nucléotides. Les leucocytes isolés à partir des intestins des truites nourries avec un régime supplémenté en nucléotides présentent un indice de prolifération significativement plus élevé que celui du groupe contrôle. Il semble donc que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites améliore la prolifération des leucocytes intestinaux en culture *in vitro*.

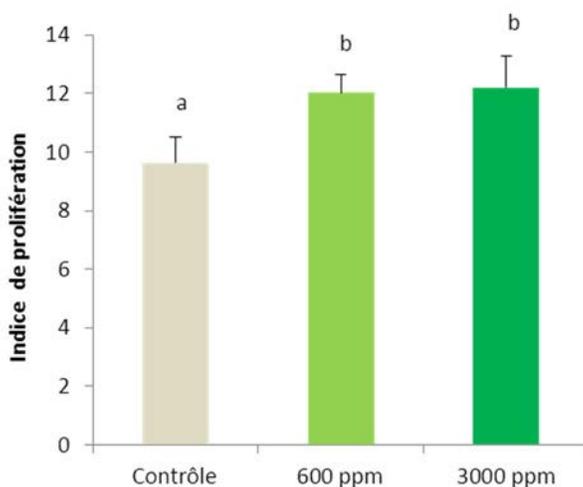


Figure 44 : Indices de prolifération mesurés après 6 jours de culture *in vitro* de leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté ou non avec 600 et 3000 ppm de nucléotides. Les indices de prolifération correspondent au nombre de cellules retrouvées dans les générations filles divisé par le nombre théorique de cellules présentes dans la génération parent. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes (a**). (ANOVA un facteur, n=8 ; p=0.018).**

Il est intéressant de noter qu'une tendance à la modulation positive est également observée sur les leucocytes isolés à partir du sang périphérique de truites nourries avec les mêmes aliments. Effectivement la figure 45 nous indique que les indices de prolifération mesurés avec les leucocytes du sang périphérique sont de 23.3 ± 4.20 pour le groupe contrôle; 28.3 ± 8.26 pour le groupe de poissons nourris avec un aliment supplémenté avec 600ppm de nucléotides et de 30.2 ± 3.63 pour celui nourris avec un aliment supplémenté avec 3000ppm de nucléotides.

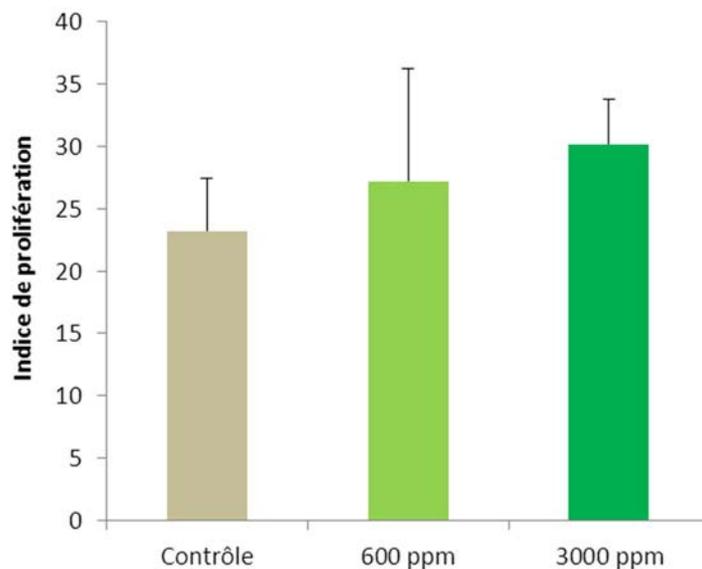


Figure 45 : Indices de prolifération mesurés après 6 jours de culture *in vitro* de leucocytes du sang périphérique isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté ou non de 600 et 3000 ppm de nucléotides. Les indices de prolifération correspondent au nombre de cellules retrouvées dans les générations filles divisé par le nombre théorique de cellules présentes dans la génération parent. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives mais une tendance est observée à $p < 0.1$. (ANOVA un facteur, $n=8$; $p=0.091$).

Ces résultats confirment donc que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel augmente la prolifération des lymphocytes *in vitro*.

2.1.3 Effets des nucléotides sur l'expression des marqueurs moléculaires spécifiques des lymphocytes B et T

Afin de savoir si l'effet positif des nucléotides sur la prolifération des lymphocytes touchait plus particulièrement les lymphocytes B ou les lymphocytes T, nous avons mesuré l'expression des gènes codant leurs marqueurs spécifiques, Pax-5 et CD3, dans des suspensions de leucocytes intestinaux provenant de poissons similaires à ceux du paragraphe précédent. Les résultats présentés dans la figure 46 indiquent que les quantités relatives de ces deux transcrits ne diffèrent pas de manière significative, d'une suspension de leucocytes à l'autre. Dans le cadre de cet essai, l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des poissons n'a pas d'influence sur l'expression des gènes codant Pax-5 et CD3.

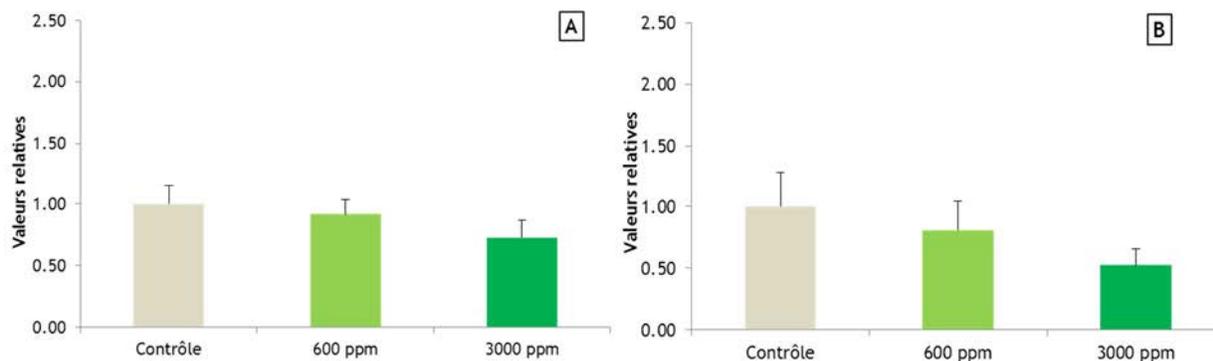


Figure 46 : Expression relative des gènes codant les marqueurs cellulaires des lymphocytes T CD3 (A) et des lymphocytes B Pax-5 (B) déterminée par PCR en temps réel dans des leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté avec 600 et 3000 ppm de nucléotides en fonction des mêmes expressions mesurées dans des leucocytes intestinaux issus de poissons contrôles. Les expressions des marqueurs cellulaires ont été normalisées par rapport aux expressions des gènes de référence de EF1- α , de la cyclophiline et GAPDH. Les valeurs relatives obtenues pour les leucocytes du groupe 0ppm ont été définies comme égales à 1. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives. (ANOVA un facteur, n=12, p=0.345 pour A et p=0.310 pour B).

L'expression de ces marqueurs cellulaires n'est, dans ce cas, pas corrélée avec les tests cellulaires présentés sur la figure 44. Néanmoins il faut prendre en compte qu'ils n'ont pas été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales. En effet, la prolifération cellulaire est mesurée après 6 jours de culture alors que l'expression des transcrits est mesurée directement dans la suspension de leucocytes à JO. Il serait intéressant de mesurer cette expression également après 6 jours de culture.

2.1.4 Effets des nucléotides sur l'expression de l'immunoglobuline spécifique à la muqueuse intestinale

Nous avons ensuite étudié l'effet d'un régime supplémenté en nucléotides sur l'expression de l'immunoglobuline spécifique de la muqueuse intestinale, IgT. Les résultats présentés dans la figure 47 montrent que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel n'influence pas l'expression du gène codant la chaîne lourde d'IgT.

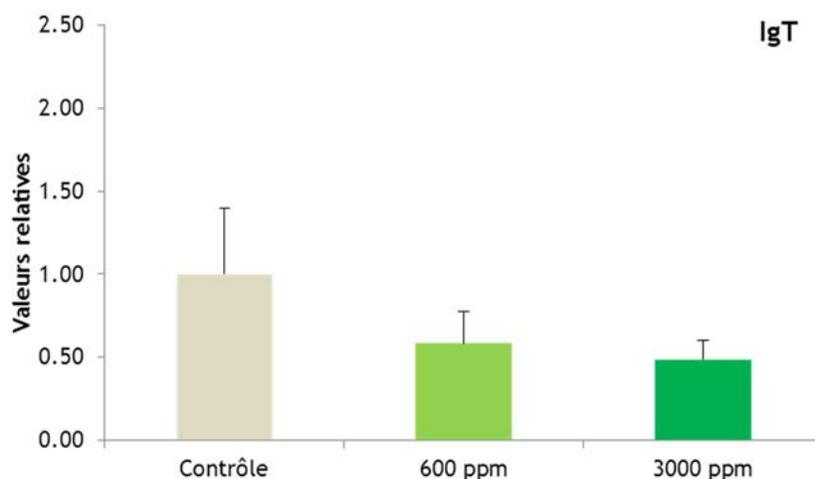


Figure 47 : Expression relative des gènes codant la chaîne lourde de l'immunoglobuline IgT dans des leucocytes intestinaux isolés à partir de truites arc-en-ciel nourries avec un aliment supplémenté avec 600 et 3000ppm de nucléotides en fonction des mêmes expressions mesurées dans des leucocytes issus de poissons contrôles. Les expressions des transcrits d'IgT ont été normalisés par rapport aux expressions des gènes de référence de EF1- α , de la cyclophiline et GAPDH. Les valeurs relatives obtenues pour les leucocytes du groupe contrôle ont été définies comme égales à 1. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives. (ANOVA un facteur, n=12, p=0.328).

2.2 Modulation de la réponse immune intestinale de la truite arc-en-ciel par un régime alimentaire supplémenté avec une dose plus faible de nucléotides

Les résultats obtenus lors des tests de prolifération des lymphocytes montrent que l'effet positif de l'ajout de nucléotides n'est pas différent entre les deux doses testées. La réponse maximale semble donc déjà être atteinte aux alentours de 600ppm. Pour cette raison, nous avons décidé lors de ce deuxième essai, de supplémenter l'aliment avec une dose plus faible de nucléotides, à savoir 375ppm et de la comparer à 750ppm. Nous avons ensuite étudié l'effet de ces régimes sur la phagocytose, la cytotoxicité naturelle et l'apoptose des leucocytes intestinaux de truite. Dans cet essai, les leucocytes ont été isolés selon la méthode de purification mécanique.

2.2.1 Effet des nucléotides sur la phagocytose

Les résultats illustrés dans la figure 48C nous indiquent que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel semble moduler l'indice de phagocytose des leucocytes intestinaux. L'indice de phagocytose varie de 4.40 ± 1.03 lorsque 375 ppm de nucléotides sont ajoutés à 16.3 ± 5.85 avec 750 ppm. Cette différence n'est pas significative à $p=0.055$ mais on observe tout de même une forte tendance à l'augmentation de l'indice de phagocytose lorsque 750ppm de nucléotides sont ajoutés à l'aliment des poissons.

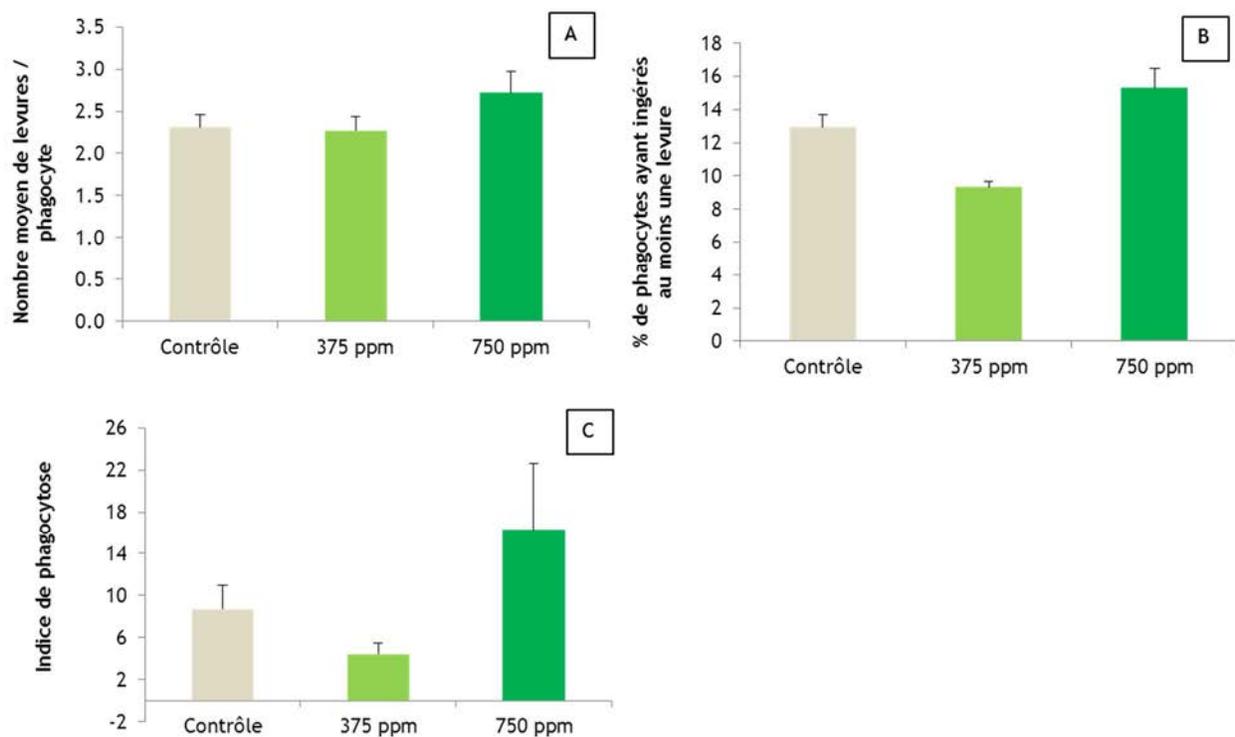


Figure 48 : Effet de l'ajout dans l'aliment de 375 et 750 ppm de nucléotides sur l'activité phagocytaire des leucocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel. Les leucocytes ont été incubés pendant 4 h avec des levures (1 leucocyte pour 20 levures) dans la chambre de culture d'une lame de microscope. Après incubation, les phagocytes sont colorés au May-Grünwald /Giemsa et le nombre moyen de levures ingérées / phagocytes du rein antérieur de l'intestin (A), le pourcentage de phagocytes du rein antérieur ou de l'intestin ayant ingéré au moins une levure (B) ainsi que l'indice de phagocytose (C) des deux suspensions sont mesurés à partir de 200 cellules. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($a \neq b$). (Test de Kruskal-Wallis pour A et ANOVA un facteur pour B et C, $n=7-9$; $p=0.09$ pour A, $p=0.134$ pour B et $p=0.055$ pour C).

Cette tendance à l'augmentation observée entre les deux groupes de poissons nourris avec l'aliment supplémenté illustre l'effet positif de la supplémentation en nucléotides sur la phagocytose des macrophages intestinaux. Il serait intéressant d'étudier à nouveau cette fonction avec un nombre plus important de poissons afin de diminuer les variations individuelles. En effet, comme l'illustrent les figures 48A et 48B, il semble que l'ajout de 750ppm de nucléotides dans l'alimentation des poissons augmente le nombre moyen de levures ingéré par phagocyte et le pourcentage de phagocytes ayant ingérés au moins une levure. Il se pourrait alors que l'absence de différence significative soit due à la variation individuelle observée entre les poissons, surtout pour le groupe de poissons ayant reçu l'alimentation supplémentée avec 750ppm de nucléotides.

2.2.2 Effet des nucléotides sur la cytotoxicité naturelle

Au cours du même essai, nous avons évalué l'effet des deux doses de nucléotides sur l'activité cytotoxique naturelle des NCC présentes dans une suspension de leucocytes intestinaux à trois ratios de cellules effectrices : cellules cibles différents : 5:1, 10:1 et 25:1. Les pourcentages de lyse obtenus à ces deux différentes doses sont décrits dans le tableau 5. L'activité cytotoxique est exprimée en unités lytiques déterminée à partir des pourcentages de lyses obtenus à chacun des ratios (figure 49).

Tableau 5 : influence d'un régime supplémenté avec 375 et 750ppm de nucléotides sur les pourcentages de lyse obtenus aux trois ratios cellules effectrices : cellules cibles (E:C).

Ratio E:C	Contrôle	375ppm	750ppm
5:1	25.5 ± 4.33	30.0 ± 6.39	23.4 ± 3.39
10:1	34.9 ± 3.59	34.0 ± 6.10	32.0 ± 4.23
25:1	48.1 ± 4.38	47.9 ± 7.02	42.1 ± 3.77

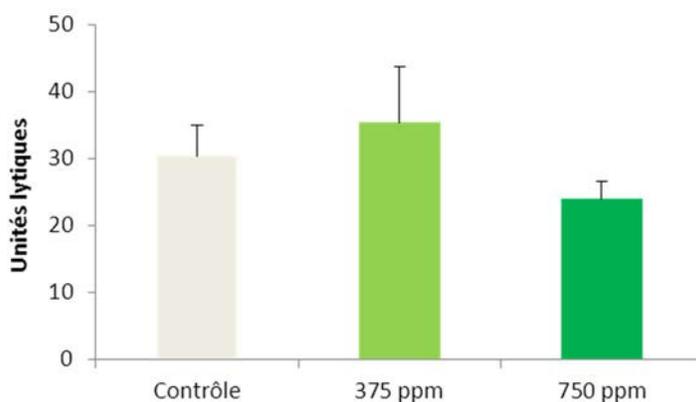


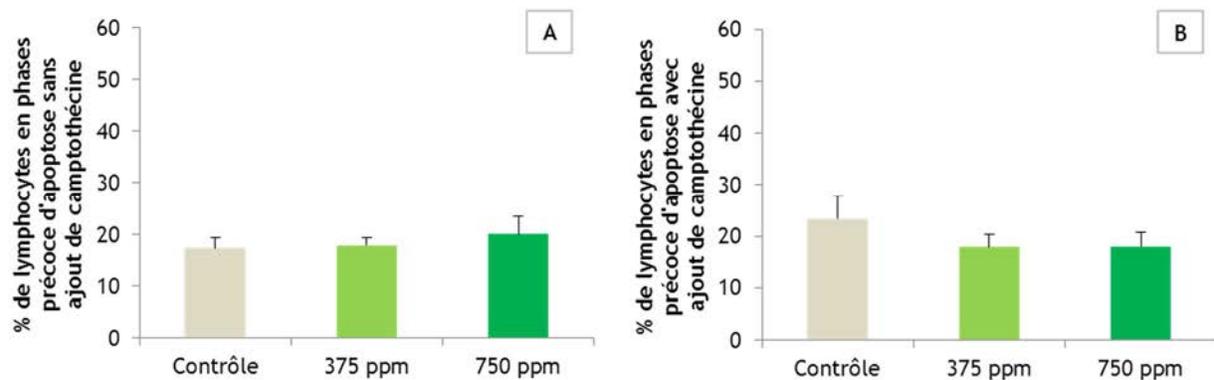
Figure 49 : Effet de l'ajout de 375 et 750 ppm de nucléotides dans l'aliment sur l'activité cytotoxique naturelle des leucocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel. Les leucocytes sont incubés pendant 2h avec des cellules tumorales P815 à trois ratios de cellules effectrices : cibles différents : 5:1, 10:1 et 25:1. Les pourcentages de cellules cibles tuées par les cellules effectrices sont déterminés par cytométrie de flux pour les trois ratios et reportés sur un graphique. La régression linéaire calculée à partir

de ce graphique a permis la détermination des unités. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives. (ANOVA, $n=9-11$; $p=0.305$).

Les résultats illustrés sur la figure 49 nous indiquent que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel n'influence pas l'activité cytotoxique naturelle des NCC intestinales dans nos conditions expérimentales.

2.2.3 Effet des nucléotides sur l'apoptose des lymphocytes en culture *in vitro*

Pour finir, nous avons mesuré l'influence de l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel sur le pourcentage de lymphocytes en apoptose lors d'une culture *in vitro*. Les résultats présentés dans la figure 50 indiquent que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation des truites ne semble pas avoir d'effet sur le pourcentage de cellules en apoptose après 2h de culture *in vitro*.



Figures 50 : Effet d'un régime supplémenté avec 375 et 750 ppm de nucléotides sur le pourcentage lymphocytes intestinaux en apoptose lors d'une culture *in vitro*. Les analyses ont été effectuées en cytométrie de flux sur 10000 événements après 2h d'incubation avec (B) ou sans (A) ajout de camptothécine dans le milieu de culture. Le résultat correspond au pourcentage de lymphocytes exprimant l'annexine V-APC à leur surface. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM et les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives. (ANOVA un facteur, $n=8$, $p=0.921$ pour A et $p=0.417$ pour B).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La muqueuse intestinale est en contact permanent avec une grande variété d'antigènes comprenant des antigènes provenant des aliments présents dans le lumen mais également des pathogènes potentiels. La grande surface de la muqueuse intestinale, encore augmentée par de nombreuses villosités et microvillosités chez les mammifères ou par des replis muqueux chez les poissons, augmente le risque d'invasion des agents pathogènes dans l'organisme et met ainsi en évidence l'importance du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à caractériser et à compléter les connaissances actuelles du système immunitaire intestinal de la truite arc-en-ciel en développant des méthodes cellulaires et moléculaires complémentaires visant à étudier différents aspects du système immunitaire inné et acquis. En plus de fournir des informations concernant la réponse immune intestinale, cette étude nous permettra également de définir des cibles potentielles pour la modulation de cette réponse intestinale. Dans la seconde partie, nous avons évalué grâce aux méthodes d'analyses mises en place l'effet immunostimulant au niveau local des nucléotides lorsqu'ils sont ajoutés à l'alimentation des poissons. L'effet positif des nucléotides a déjà été démontré sur certaines fonctions de la réponse immune systémique comme la prolifération lymphocytaire. Etant donné que l'administration des nucléotides se fait par le biais de l'alimentation des poissons, leur premier contact avec l'organisme a donc lieu au niveau de la muqueuse intestinale. Mais c'est également à ce niveau qu'entrent un grand nombre de pathogènes. C'est pourquoi il est intéressant d'étudier les possibles modulations de la réponse immune par les nucléotides directement au niveau local. Cette étude s'inscrit dans la démarche de DSM Nutritional Products consistant à développer de nouveaux additifs alimentaires aux propriétés immunostimulantes afin de renforcer les défenses immunitaires des poissons d'élevage ; ceci dans le but de diminuer les pertes dues à des infections, coûteuses pour l'industrie agro-alimentaire.

I. Etude comparative de la réponse immune intestinale et systémique

Nous avons étudié les principales fonctions des réponses non spécifiques et spécifiques du système immunitaire au niveau de l'intestin d'un poisson non infecté et nous les avons comparées à celles, mieux caractérisées, mesurées au niveau systémique.

Afin de pouvoir étudier ces fonctions au niveau de l'intestin, il a fallu dans un premier temps caractériser les cellules de la muqueuse intestinale de la truite arc-en-ciel, puis mettre au point une méthode d'isolement permettant d'obtenir un nombre suffisant de leucocytes viables pour étudier leurs fonctions immunes. Pour cela nous avons utilisé successivement deux techniques différentes

d'isolement cellulaire. La première utilisée est celle décrite par Salinas et al. (2007), qui consiste en une digestion chimique puis enzymatique des tissus intestinaux suivie par une séparation des cellules sur gradient de densité. Cette méthode a permis l'obtention d'une population leucocytaire relativement pure, viable et en quantité suffisante pour la conduite de la plupart des différents tests cellulaires. Cet isolement permet d'obtenir en moyenne $2,9 \cdot 10^6$ leucocytes composés de 70 à 79 % de lymphocytes, 12 à 16 % de macrophages et 9 à 15 % d'autres types cellulaires (cellules épithéliales et cellules à mucus). Cette technique a été utilisée dans un premier temps pour mettre au point les méthodes d'analyses cellulaires et moléculaires des leucocytes intestinaux. Néanmoins, celle-ci présente des inconvénients. Le premier est sa durée. Or le temps de mise en œuvre est un facteur important à prendre en compte pour la bonne conduite de tests cellulaires et qui devient même crucial lors des tests de prolifération. Afin de palier à ce problème nous avons dû réduire le nombre d'isollements simultanés réalisés lors de la mise en œuvre d'un test cellulaire et par conséquent fractionner dans le temps l'étude d'une même fonction. Un autre inconvénient de cet isolement est le faible rendement cellulaire obtenu qui ne laisse pas une grande marge de manœuvre lors de la réalisation des tests cellulaires et moléculaires. Effectivement il est arrivé qu'avec certains poissons, cet isolement ne permette pas l'obtention d'un nombre de leucocytes suffisant à la conduite du test cellulaire concerné. C'est pourquoi nous avons cherché à optimiser la purification des leucocytes à partir de l'intestin en utilisant une méthode plus rapide et permettant l'obtention d'un plus grand nombre de leucocytes. L'isolement mécanique décrit par Takizawa et al. (2011) que nous avons ensuite utilisé permet l'obtention en un temps plus court d'un plus grand nombre de cellules ($9,7 \cdot 10^6$ leucocytes en moyenne au lieu de $2,9 \cdot 10^6$ par poisson et de diminuer le pourcentage de contamination par les cellules épithéliales et les cellules à mucus (7% en moyenne au lieu de 12% en moyenne dans le cas de l'isolement par « digestion »). De plus cet isolement mécanique entraîne une baisse du pourcentage de cellules en apoptose de 7.6% à 1.4% après purification et permet d'obtenir une réponse cytotoxique naturelle plus forte ainsi qu'une plus forte prolifération des cellules en culture *in vitro* sans stimulation mitogénique. L'indice de phagocytose, quant à lui, ne diffère pas d'un isolement à l'autre même si l'on observe un nombre moyen de levures ingérées par phagocytes plus faible avec l'isolement mécanique. L'isolement mécanique présente donc de nombreux avantages techniques par rapport à l'isolement digestion et, mis à part pour la phagocytose, améliore les résultats obtenus lors des différents tests cellulaires, c'est donc cette méthode qui a été utilisée par la suite.

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus précisément le fonctionnement du système immunitaire lié à la muqueuse intestinale en mesurant les principales fonctions de l'immunité innée et acquise. De plus nous les avons comparées avec celles des leucocytes du rein antérieur (ou du sang périphérique pour l'étude de la prolifération cellulaire car le sang possède une proportion plus importante de lymphocytes que le rein antérieur).

Concernant l'immunité innée, nous avons tout d'abord étudié la phagocytose. Nos résultats montrent que le pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins une levure après une incubation de 4 heures est 3 fois plus élevé pour les phagocytes du rein antérieur que pour ceux de l'intestin alors que le nombre moyen de levures ingérées par phagocyte reste équivalent entre les cellules du rein et de l'intestin. L'indice de phagocytose ainsi mesuré à partir de ces valeurs est donc plus élevé pour les phagocytes du rein antérieur (113.3 ± 21.9) que pour les phagocytes intestinaux (12.2 ± 1.8). En utilisant la même méthode, Clerton et al. ont également illustré, en 2001, une différence dans l'indice de phagocytose entre les phagocytes du rein ($47,1 \pm 20,8$) et ceux de l'intestin ($8,2 \pm 3,2$). Dans une autre étude, Davidson et al. (1991) ont observé par microscopie UV que 10.5 à 13.5% des cellules de l'intestin développent une activité phagocytaire contre des billes de latex. Même si la méthodologie est différente par rapport à celle que nous avons utilisée, le pourcentage de cellules intestinales montrant une activité de phagocytose est comparable à celui que nous avons mesuré dans notre étude. L'activité phagocytaire des cellules intestinales de la truite arc-en-ciel est donc 3 à 10 fois inférieure de celles des phagocytes du rein antérieur, le nombre moyen de levures ingérées par phagocyte étant identique. Cette différence est difficile à expliquer d'autant plus qu'elle est contraire à ce qui est observé chez l'humain chez qui le pourcentage de macrophages ayant phagocyté des billes fluorescentes après une incubation de 1 heures est plus élevé pour les macrophages intestinaux par rapport au même pourcentage observé avec les monocytes du sang périphérique (Smythies et al., 2005). Il semble donc que les macrophages intestinaux de la truite ont un phénotype différent de ceux de l'humain ou bien alors qu'il est plus difficile de déclencher leur activité de phagocytose lors de tests *in vitro*. Il serait intéressant de renouveler ces expériences en utilisant des bactéries pathogènes à la place des levures afin de vérifier ou non si un plus grand pourcentage de cellules intestinales montrent une activité de phagocytose. Il serait également intéressant de comparer l'activité de phagocytose des cellules intestinales avec celle des monocytes du sang périphérique de la truite arc-en-ciel en plus de celle du rein antérieur.

En plus de la phagocytose, nous avons également étudié la flambée respiratoire, une autre fonction importante des phagocytes intestinaux. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes différentes, la première utilisant la chimiluminescence et la seconde utilisant la cytométrie en flux. Le principe de la première méthode repose sur les propriétés d'une molécule, le luminol, qui réagit avec les dérivés oxygénés (O_2^- , H_2O_2) générés par les phagocytes pour atteindre un état intermédiaire excité conduisant à une émission lumineuse (mesurable par chimiluminescence), lorsque la molécule retourne à son état de base. Etant donné que les molécules de luminol peuvent traverser les membranes cellulaires, l'émission lumineuse mesurée correspond à la fois à l'activité intra et extracellulaire et reflète donc la flambée respiratoire totale produite par la cellule (Briheim et al., 1984 ; Dahlgren et al., 1989). Au contraire la méthode utilisant la cytométrie en flux ne permet que la mesure de la flambée respiratoire au niveau intracellulaire. Ce test repose sur l'utilisation de la DHR 123 non fluorescente,

un marqueur pouvant traverser les membranes cellulaires qui, lorsqu'elle est oxydée par les peroxydes d'hydrogène H_2O_2 produits dans le phagocyte lors de la flambée respiratoire, se transforme en un composé fluorescent vert détectable par cytométrie de flux, la rhodamine 123 (Rothe et al., 1988). Ces deux méthodes malgré leurs précisions et leurs principes de détection différents n'ont pas permis la mesure de la flambée respiratoire dans nos suspensions de leucocytes intestinaux essentiellement en raison d'un signal émis trop faible. En utilisant la méthode de chimiluminescence, Clerton et al. (2001) ont mesuré la flambée respiratoire des leucocytes du rein antérieur et de l'intestin. Ils ont eux aussi enregistré une très faible réponse avec les leucocytes intestinaux quelques minutes après stimulation de ces cellules avec du PMA (120 unités relatives de luminescence RLU) qui est environ 600 fois plus faible que la réponse enregistrée avec les leucocytes du rein antérieur (près de 70 000 RLU). L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure que l'absence ou la très faible réponse des leucocytes intestinaux est due, soit à une absence d'activation des cellules n'entraînant pas la production de dérivés oxygénés, soit à une trop faible quantité de phagocytes dans les suspensions leucocytaires intestinales comme l'ont montré nos observations microscopiques. Afin de valider une de ces deux hypothèses, il serait intéressant de savoir si un signal correspondant à la flambée respiratoire peut être enregistrée avec l'une ou l'autre méthode lorsque les tests utilisent des suspensions cellulaires enrichies en phagocytes. Nous avons essayé, mais sans succès, d'enrichir les suspensions intestinales en macrophages par le biais d'un gradient continu de Percoll. Il serait intéressant à l'avenir de développer un anticorps monoclonal spécifique des macrophages de la truite qui pourrait permettre l'étude ciblée de cette population cellulaire en cytométrie en flux.

Pour compléter l'étude de la réponse innée au niveau intestinal, nous avons également étudié l'activité des cellules cytotoxiques naturelles. Nos résultats indiquent que la cytotoxicité naturelle enregistrée avec les leucocytes intestinaux est deux fois plus élevée que celle mesurée avec les leucocytes du rein antérieur. Jusqu'à présent seule une autre équipe a étudié cette fonction cellulaire au niveau intestinal chez la truite arc-en-ciel. McMillan et Secombes (1997) ont mesuré la cytotoxicité naturelle des leucocytes selon la méthode de Korzeniewski et Callewaert (1983) en quantifiant la libération de lactate déshydrogénase (LDH) par les cellules intestinales en présence de cellules cibles (EL4, lignée cellulaire issue d'un lymphome de souris) après une incubation d'une nuit. Les auteurs ont montré que les lymphocytes intra-épithéliaux de l'intestin et ceux du rein antérieur atteignent environ le même pourcentage de cytotoxicité (20 - 25%) pour un rapport cellule effectrice : cellule cible de 25:1. Dans notre étude, nous constatons que la cytotoxicité naturelle des leucocytes intestinaux est deux fois plus élevée au même ratio que celles des leucocytes du rein antérieur. Nos résultats ne sont donc pas en accord avec ceux présentés par ces auteurs. Néanmoins les différences existantes entre les méthodes utilisées dans les deux études : temps d'incubation, isolement cellulaire, cellules cibles utilisées et méthode d'analyse, peuvent expliquer cette différence. Dans notre cas, la cytotoxicité naturelle est mesurée avec une méthode non-radioactive et non-enzymatique développée chez les

mammifères par Chang et al. en 1993 utilisant la cytométrie en flux. Cette méthode basée sur le double marquage des cellules cibles avec, à la fois un marqueur fluorescent spécifique des cellules vivantes et un marqueur fluorescent spécifique des cellules mortes, permet une différenciation visuelle et une quantification directe des cellules cibles mortes par rapport aux autres groupes cellulaires. Ainsi, grâce à cette méthode, même une faible réponse cytotoxique peut être mesurée permettant la mise en évidence de faibles différences entre échantillons. La technique utilisée par McMillan et Secombes (1997) ne repose pas sur une mesure directe de la mortalité des cellules cibles. La LDH est une enzyme cytosolique présente dans la plupart des cellules eucaryotes et qui se retrouve dans le milieu de culture lors de la destruction de la membrane cellulaire au moment de la mort cellulaire. Dans le milieu, la LDH catalyse la réduction de NAD⁺ et NADH en présence de L-Lactate et cette formation de NADH peut être mesurée par colorimétrie via une réaction couplée réduisant le sel de tétrazolium en du formazan rouge. La mesure de l'activité cytotoxique est déduite de la mesure colorimétrique résultant de la formation de formazan. Il ne s'agit donc pas d'une observation directe du nombre de cellules cibles lysées comme lors de la cytométrie en flux mais d'une mesure indirecte à la suite de deux réactions chimiques. De plus la cytométrie en flux permet également de discriminer les cellules mortes des débris non fluorescents. De ce fait la méthode en cytométrie en flux que nous avons utilisée nous semble permettre une détection plus sensible des signaux.

L'activité cytotoxique naturelle est donc plus forte lorsqu'elle est mesurée au niveau intestinal qu'au niveau systémique. L'indisponibilité de marqueurs spécifiques aux cellules de la truite a empêché l'identification des différentes populations cellulaires comme les NCC et les lymphocytes par cytométrie en flux. De ce fait, la différence observée peut être due à un plus grand nombre de NCC présentes dans les préparations intestinales par rapport à celles du rein antérieur ou à une différence fonctionnelle. La plus forte expression des transcrits NKEF dans nos préparations intestinales comparée à celles du rein antérieur confirme l'hypothèse de la place importante de la fonction cytotoxique naturelle au niveau intestinal. Il a été démontré chez l'humain que NKEF augmentait le pourcentage de cytotoxicité naturelle lorsqu'il était ajouté au milieu de culture lors des tests et se révèle donc être un facteur renforçant l'action des cellules tueuses naturelles (Shau et al, 1993). De plus, ce facteur a été découvert chez la truite arc-en-ciel par Zhang et al. (2001) qui ont également mis en évidence son haut degré de conservation chez les différents Gnathostomes. Cette activité cytotoxique naturelle considérablement plus élevée observée dans l'intestin pourrait être d'un grand intérêt, en particulier pour la protection antivirale de l'organisme. En effet, les surfaces muqueuses sont une porte d'entrée pour une majorité d'agents pathogènes y compris les virus. Chez les mammifères, le système immunitaire lié aux muqueuses utilise des mécanismes non spécifiques et des mécanismes spécifiques pour lutter contre ces infections. Les défenses non spécifiques comprennent des facteurs physico-chimiques tels que la sécrétion de mucus et la barrière constituée par les cellules épithéliales mais aussi les cellules tueuses naturelles qui contribuent aux défenses antivirales en particulier dans la phase précoce de l'infection virale (Freihorst et Ogra, 2001). Chez la truite arc-en-ciel, les résultats de

Utke et al. (2007) ont montré une surexpression des gènes codant pour NKEF après une infection de la truite arc-en-ciel par le virus de la septicémie hémorragique virale (SHV) illustrant également chez ce poisson le déclenchement de la réponse immunitaire à médiation cellulaire représentées par l'action des NCC après une infection virale.

La réaction inflammatoire fait partie des mécanismes de défense de l'immunité innée. Cette réponse est déclenchée par la libération de nombreux médiateurs issus de l'activation cellulaire survenant lors de la reconnaissance d'un agent pathogène par les récepteurs TLR présents à la surface des cellules de l'immunité. Parmi ces médiateurs figurent les cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β et TNF- α . Ces cytokines vont induire et réguler la réaction inflammatoire spécifique. Les chimiokines comme IL-8 font également parties de ces médiateurs. Leurs rôles est d'attirer les cellules immunes sur le site inflammatoire et de réguler l'angiogenèse et l'hématopoïèse. Afin de compléter notre étude concernant l'immunité innée au niveau intestinal, nous avons choisi de mettre en place des moyens de mesure du niveau d'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α mais également de la chimiokine IL-8. Le manque d'anticorps spécifiques de ces protéines chez la truite arc-en-ciel, nous a conduits à utiliser une approche d'analyse par biologie moléculaire. Nous avons pu étudié le rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la régulation de la réponse immune innée chez la truite. Les animaux utilisés lors de ces tests étaient des poissons sains, n'ayant subi aucune infection. Nous avons donc enregistré le niveau d'expression basal des gènes des cytokines dans les leucocytes intestinaux et dans ceux du rein antérieur. Nos résultats montrent que leur niveau d'expression est faible quelque soient le tissu et la cytokine étudiés. Les résultats obtenus indiquent également qu'il n'y a pas de différence d'expression au niveau basal des gènes codants les cytokines TNF- α et IL-8 entre les suspensions de leucocytes de l'intestin et du rein antérieur. Par contre, IL-1 β est plus exprimée, au niveau basal, dans les leucocytes du rein antérieur que dans ceux de l'intestin. A la différence du TNF- α et de l'IL-8, l'IL-1 β est produite uniquement par les macrophages activés. De ce fait, nos résultats concernant la phagocytose des macrophages intestinaux ajoutés à la faible proportion de phagocytes présents dans les suspensions de leucocytes intestinaux expliquent probablement pourquoi les transcrits de l'IL-1 β sont moins abondants dans ces suspensions. Mulder et al. (2007) ont démontré une surexpression des gènes codant pour l'IL-1 β , le TNF- α , l'IFN- γ et IL-8 dans l'intestin proximal de truites arc-en-ciel infectées par *A. salmonicida*. Dans une autre étude, Komatsu et al. (2009) ont montré que non seulement l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-8, mais aussi l'IL-10, l'IL-11, l'IL-15, l'IL-16, l'IL-18 et le TGF β sont produites par les cellules de l'épithélium intestinal de la truite arc-en-ciel lors d'une infection bactérienne. Afin de compléter notre étude comparative, il nous a paru intéressant d'approfondir ce travail par une comparaison de la cinétique d'expression de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-8 dans les leucocytes de l'intestin et du rein antérieur après une infection bactérienne.

Concernant l'immunité adaptative, nos résultats montrent qu'à l'inverse des leucocytes du sang périphérique, les leucocytes intestinaux ne répondent pas aux stimulations mitogéniques après 6 jours de culture *in vitro*. Afin de savoir si cette absence de réponse est due à des dommages cellulaires induits par le processus de purification des leucocytes intestinaux, nous avons quantifié le pourcentage de leucocytes en phase d'apoptose dans nos préparations. Ces analyses indiquent qu'environ 20% des leucocytes intestinaux sont en apoptose. Ce pourcentage ne suffit pas à expliquer l'absence de réponse proliférative de ces cellules. D'autres études ont montré que les IELs de différentes espèces (rat, souris, humain) ne répondent pas non plus à une stimulation mitogénique *in vitro* (Greenwood et al., 1983 ; Nauss et al., 1984). De plus les résultats publiés par l'équipe de Sydora et al. (1993) montrent que l'absence de réponse proliférative des lymphocytes intraépithéliaux de souris mis en présence de mitogènes n'est pas due à une anergie des cellules. Enfin, l'étude de Brunner et al. (2001) montre qu'une interaction étroite entre les lymphocytes intestinaux et les cellules épithéliales ainsi qu'avec les cytokines produites (IL-7, IL-15) par celles-ci est indispensable à la survie et à la prolifération des lymphocytes intestinaux *in vitro*. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'absence de réponse proliférative des lymphocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel face aux mitogènes pourrait être due au manque de facteurs épithéliaux dans le milieu de culture. Par conséquent, pour étudier la réponse proliférative des lymphocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel, il serait peut-être nécessaire de développer ou d'adapter une co-culture de ces lymphocytes avec des cellules épithéliales. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons commencé des mises au point visant à cultiver *in vitro* les leucocytes intestinaux en utilisant un milieu de culture enrichi en facteurs épithéliaux. Pour cela des intestins entiers de truite arc-en-ciel ont été prélevés stérilement puis lavés et broyés intégralement avant d'être mis en culture dans du milieu supplémenté en sérum de salmonidés, antibiotiques et L-glutamine ; le but étant de pouvoir ensuite prélever le surnageant de ces cultures contenant les facteurs épithéliaux et de l'utiliser comme milieu de culture lors d'un essai de prolifération des lymphocytes intestinaux. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la quantité de broyat qui doit être mis en culture, la durée de culture permettant l'obtention d'un surnageant assez riche en extraits épithéliaux et la concentration de surnageant à ajouter au milieu de culture des leucocytes intestinaux. Les premiers essais que nous avons menés nous ont permis d'établir une technique de prélèvement des intestins et de mise en culture des broyats durant 24 à 72h permettant l'obtention d'un surnageant stérile. Nous avons utilisé ce surnageant pur ou dilué au demi, comme milieu de culture lors de premiers essais de prolifération. Nous n'avons pas observé de contamination de nos cultures ni de hausse de la mortalité des leucocytes après 6 jours de culture *in vitro*. Néanmoins aucune amélioration de l'indice de prolifération n'a été observée. L'optimisation de ces essais va nécessiter encore de nombreuses étapes avant la détermination des conditions expérimentales optimales nous permettant d'observer une prolifération des lymphocytes intestinaux en présence de mitogènes.

Puisqu'aucune réponse proliférative n'a été enregistrée après stimulation des lymphocytes intestinaux avec les mitogènes PHA-P, stimulant les lymphocytes T et LPS, stimulant les lymphocytes B, il n'est pas possible de savoir quel type lymphocytaire est prédominant au sein de la muqueuse intestinale de la truite arc-en-ciel. Pour cette raison et encore une fois en l'absence d'anticorps spécifiques de marqueurs phénotypiques de ces différents types cellulaires chez la truite arc-en-ciel, nous avons développé des outils de biologie moléculaire permettant la mesure de l'expression de deux transcrits codant spécifiquement pour les lymphocytes T et les lymphocytes B, respectivement CD3 et Pax-5. L'étude de l'expression de ces transcrits a révélé un niveau d'expression des gènes codant CD3 plus élevé et un niveau d'expression des gènes codant Pax5 plus faible dans les suspensions de leucocytes intestinaux par rapport à ceux mesurés avec les leucocytes du rein antérieur. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que la muqueuse intestinale est riche en lymphocytes T, une étude de Koppang et al. réalisée en 2010 avançant que près de 90% des leucocytes intestinaux seraient CD3+. Cependant, en nous basant sur nos seuls résultats de biologie moléculaire, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que ces différences peuvent aussi refléter un état d'activation différent de ces cellules. Effectivement la mesure de l'expression relative d'un gène codant un marqueur cellulaire par PCR temps réel ne peut être reliée directement à une proportion cellulaire. Suite à ces analyses, nous avons décidé d'approfondir la caractérisation de ces cellules et avons développé les outils moléculaires permettant l'étude de l'expression des différents sous types de lymphocytes T. Ainsi nous avons mesuré par PCR en temps réel l'expression des gènes codant CD8 β et α , un marqueur cellulaire spécifique des lymphocytes T cytotoxiques, T-bet, un marqueur d'activation des lymphocytes Th1 et GATA3, un marqueur d'activation des lymphocytes Th2.

Concernant l'expression du gène codant CD8 β , nous n'avons observé aucune différence entre les suspensions de leucocytes de l'intestin et celles du rein antérieur alors que l'expression des gènes codant CD8 α est 10 fois plus élevée dans les préparations de leucocytes intestinaux. Bernard et al. (2006) ont également observé une forte expression du gène CD8 α dans les IELs de truite par PCR semi quantitative et Takizawa et al. (2011) ont montré que 55% des leucocytes intestinaux de la truite arc-en-ciel sont CD8 α +. Ces données suggèrent que, comme chez les mammifères, les lymphocytes T cytotoxiques intestinaux de la truite arc-en-ciel expriment principalement la forme homodimère $\alpha\alpha$ du CD8. Les lymphocytes cytotoxiques représentent donc une population cellulaire importante de la muqueuse intestinale dans cette espèce. Cette information est intéressante pour la protection antivirale puisqu'une des actions principales des lymphocytes T cytotoxiques est l'élimination des cellules infectées par les virus. Chez la truite arc-en-ciel, une infection par le virus de la septicémie hémorragique déclenche à la fois la réponse innée menée par les NCC et mais également et au même moment, une réponse adaptative menée par les lymphocytes T cytotoxiques (Utke et al., 2006). Ces observations mettent en évidence l'importance des lymphocytes T cytotoxiques chez la truite arc-en-ciel. Au niveau intestinal, nos résultats, en accord avec les autres études déjà réalisées à ce sujet

(Bernard et al., 2006 ; Takizawa et al., 2011), confirment la forte proportion de lymphocytes T cytotoxiques dans la muqueuse intestinale. Il serait à présent intéressant de mesurer l'expression des gènes codant CD8 α et β en parallèle de ceux codant NKEF dans l'intestin des truites infectées afin de vérifier si les observations de Utke et al. (2006) au niveau systémique se retrouvent également au niveau intestinal.

Des niveaux d'expression similaires des gènes codant GATA3, marqueur d'activation des lymphocytes Th2, ont été observés dans les suspensions de leucocytes de rein antérieur et d'intestin alors que le gène codant T-bet, marqueur d'activation des lymphocytes Th1, est 4 fois moins exprimé dans les suspensions de leucocytes intestinaux que dans celles de leucocytes du rein antérieur. Ces résultats sont en accord avec les études de Wang et al. (2010) et Takizawa et al. (2011) qui ont mis en évidence, à l'aide de la même méthode, une plus forte quantité de transcrits T-bet dans le rein antérieur par rapport à l'intestin. Il semble donc qu'il y ait moins de lymphocytes Th1 ou que les cellules Th1 sont moins activées dans l'intestin que dans le rein antérieur de la truite arc-en-ciel saine, ce qui suggère une prédominance de la réponse Th2 dans l'intestin. Néanmoins, la seule étude des niveaux d'expression de GATA3 et T-bet dans la muqueuse intestinale et dans le rein antérieur ne suffit pas à valider cette hypothèse. C'est pourquoi nous avons aussi mesuré l'expression du transcrit codant pour IL-13/4A qui est une cytokine majeure de la voie Th2 dans cette espèce (Takizawa et al. 2011). En raison de la très faible expression de cette cytokine observée à la fois dans le rein et dans l'intestin lors de nos analyses, il nous a été impossible de quantifier ce transcrit avec la PCR en temps réel. De très faibles quantités de ce même transcrit ont également été mesurées par Takizawa et al. (2011) dans le rein antérieur et l'intestin de la truite arc-en-ciel. Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par ces auteurs et la difficulté à détecter ce transcrit est probablement due au fait que les poissons n'ont pas été immunostimulés ou infectés. À l'avenir, il serait intéressant de répéter ces études sur des poissons infectés pour confirmer l'hypothèse que le système intestinal développe plutôt une réponse de type Th2, hypothèse qui est tout de même supportée par de précédentes observations montrant une plus forte expression de l'IFN- γ dans les tissus lymphoïdes non muqueux (comme le rein antérieur de la truite arc-en-ciel) et une expression plus importante des facteurs de transcription de type Th2 dans les tissus lymphoïdes muqueux (y compris les muqueuses de l'intestin) (Takizawa et al., 2011).

Comme l'IgA chez les mammifères, les truites arc-en-ciel possèdent également un anticorps spécifique à la muqueuse intestinale, IgT (Hansen et al., 2005). La partie sécrétoire retrouvée sur cette immunoglobuline spécifique (Hansen et al., 2005) en plus des travaux réalisés par Zhang et al. (2010) illustrant la présence d'IgT dans le mucus intestinal ainsi que l'existence d'un équivalent chez la truite de la protéine transmembranaire plgR, prouvent que cette immunoglobuline a également la capacité de traverser la paroi intestinale pour se retrouver dans le lumen et y piéger les pathogènes qui s'y

trouvent. Notre étude montre une expression 25x plus faible du gène codant la chaîne lourde d'IgM et 4x plus forte de ceux codant pour la chaîne lourde d'IgT dans les suspensions leucocytaires intestinales par rapport aux expressions mesurées dans les suspensions de leucocytes du rein antérieur. Ces résultats suggèrent qu'une part importante des lymphocytes B intestinaux exprime IgT. Cette hypothèse est en accord avec l'étude de Zhang et al. (2010) qui montre que les IgT agissent comme des immunoglobulines de la muqueuse intestinale et qu'elles sont produites par une population de lymphocytes B ayant un phénotype différent des lymphocytes B retrouvés dans les autres tissus, exprimant uniquement IgT comme immunoglobuline de surface. Ils ont également montré que cette sous population IgT+ représente 54,3% des lymphocytes B de l'intestin et seulement 27,8% des lymphocytes B du rein.

En conclusion, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse montrent que les phagocytes intestinaux sont moins nombreux et moins activés par les levures que les phagocytes du rein antérieur mais qu'une fois activés, ils peuvent ingérer le même nombre de levures que ceux du rein antérieur. En revanche, l'activité cytotoxique naturelle des leucocytes intestinaux est deux fois plus élevée que celle des leucocytes du rein antérieur, résultat confirmé également par une plus forte expression du gène codant NKEF au niveau intestinal. Nous avons également constaté que les leucocytes intestinaux ne répondent pas aux stimulations mitogéniques *in vitro* et cela, probablement parce qu'ils ont besoin d'une interaction avec les cellules épithéliales intestinales et les cytokines produites par ces cellules. Enfin, nos données suggèrent que l'intestin contient une forte proportion de lymphocytes T exprimant la forme homodimère $\alpha\alpha$ du CD8 et qu'une grande proportion des lymphocytes B intestinaux est IgT+. L'ensemble de cette étude confirme que la truite arc-en-ciel et les poissons téléostéens en général, bien qu'ils soient moins évolués que les mammifères ou mêmes les oiseaux, possèdent un système immunitaire associé à la muqueuse intestinale. Celui-ci permet la mise en place au niveau local de la réponse immune non spécifique par l'action des macrophages, des NCC et de la présence de facteurs de l'inflammation. De plus, la réponse immune spécifique, orchestrée par les lymphocytes Th1 et Th2, comprenant les réponses à médiation cellulaire des lymphocytes T cytotoxiques et les réponses à médiation humorale des lymphocytes producteurs d'IgT est également possible. La forte proportion de lymphocytes T cytotoxiques ainsi que la forte activité de cytotoxicité naturelle observée au niveau intestinal nous laisse penser que la réponse à médiation cellulaire pourrait tout de même être la réponse principale mise en place lors d'une infection. Mais avant de pouvoir valider cette hypothèse il nous faudra tester l'ensemble de ces paramètres chez des truites arc-en-ciel ayant subi une infection.

II. Modulation de la réponse intestinale par les nucléotides

L'utilisation d'immunostimulants dans le but de renforcer les défenses immunes des poissons d'élevage est un secteur de recherche de plus en plus développé en aquaculture. En effet la propagation rapide des maladies dans l'eau des élevages ainsi que la difficulté de soigner un poisson malade met en avant l'importance de la prophylaxie en aquaculture. De nombreuses substances dites « immunostimulantes » comme les vitamines anti-oxydantes ou encore les β -1.3/1.6-glucans ont déjà prouvé leurs effets bénéfiques sur certaines fonctions du système immunitaire non-spécifique du poisson (ex. flambée respiratoire, phagocytose, cytotoxicité naturelle, action du lysozyme et du complément) lorsqu'elles sont ajoutées à leur alimentation (Dalmo et Bogwald, 2008). Plusieurs études réalisées chez les mammifères ont mis en évidence l'effet positif des nucléotides sur la réponse immune systémique non spécifique ainsi que sur la spécifique (Jyonouchi, 1994 ; Carver, 1994). Ainsi, depuis quelques années de plus en plus d'études concernant l'effet immunostimulant d'un ajout de nucléotides dans l'alimentation des poissons ont également été réalisées. Comme chez les mammifères, les nucléotides semblent avoir un effet positif, au niveau systémique, sur la réponse immune non spécifique des poissons en augmentant la phagocytose ou bien l'activité du complément (Sakai et al., 2001) mais également sur la réponse spécifique en augmentant la réponse proliférative des lymphocytes en présence de mitogènes et la production d'anticorps (Ramadan et al., 1994 ; Burrells et al., 2001a ; Leonardi et al, 2003). Cependant, les recherches concernant l'effet d'un tel régime supplémenté sur la réponse immune intestinale des poissons restent limitées mise à part quelques études morphologiques. En effet, Burrells et al. (2001b) ont montré, pour la première fois, grâce à des examens histologiques, que des saumons nourris avec un aliment supplémenté en nucléotides présentaient des modifications morphologiques de la muqueuse intestinale. Dans cette étude, ils ont démontré que la hauteur moyenne des replis muqueux de l'intestin proximal, moyen et distal ainsi que la superficie totale de l'intestin des poissons nourris avec un régime supplémenté en nucléotides sont significativement plus élevées que celles des poissons nourris avec un aliment non supplémenté. Borda et al. (2003) ont rapporté des observations similaires chez la dorade juvénile. Les nucléotides alimentaires influencent donc la morphologie de la muqueuse intestinale et il serait à présent intéressant de savoir s'ils peuvent également avoir une influence sur la réponse immune associée à cette muqueuse, d'autant plus que les nucléotides alimentaires se retrouvent dans le tractus gastro-intestinal en contact direct avec la muqueuse. La première partie de ce travail nous a permis de mettre en évidence les différents aspects de la réponse immune au niveau de la muqueuse intestinale de la truite arc-en-ciel. Nous avons donc décidé de tester dans ce travail, l'effet d'un régime supplémenté avec différentes doses de nucléotides sur les fonctions de la réponse immune intestinale de la truite arc-en-ciel. La phagocytose, la cytotoxicité naturelle, l'expression des gènes liés aux cytokines inflammatoires, l'apoptose, mais également la prolifération des lymphocytes et l'expression des gènes liés aux marqueurs spécifiques

des lymphocytes B et T et de l'immunoglobuline IgT ont été analysés. Ces différentes mesures ont été réalisées sur des poissons sains n'ayant subi aucune infection.

Nous avons étudié dans un premier temps l'influence des nucléotides sur l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL1- β et IL-8. Les mesures d'expression étant réalisées à partir de leucocytes prélevés sur des poissons sains, les résultats obtenus témoignent d'une faible expression de ces deux cytokines au niveau intestinal et du rein antérieur, quelles que soit les doses de nucléotides, mais ils reflètent uniquement l'expression basale de ces deux cytokines. Afin de mesurer l'effet des nucléotides sur la synthèse de l'IL1- β et de l'IL-8 lors d'une réponse inflammatoire, nous avons réalisé un premier essai expérimental avec cette fois-ci des poissons infectés. En nous basant sur le protocole expérimental de Harun et al. 2011, nous avons nourri, durant 3 semaines, deux groupes de 20 poissons avec un aliment supplémenté ou non avec 375ppm de nucléotides. Après cette phase d'alimentation les poissons ont été infectés par injection intra-péritonéale avec *Listonella anguillarum* (2.10^3 CFU/ml), une bactérie touchant surtout les salmonidés et qui peut induire une septicémie hémorragique particulièrement rapide, une nécrose du cœur, des reins et de la rate ainsi qu'une exophtalmie et qu'une opacification de la cornée (Travers, 2008). Des prélèvements de tissus intestinaux et du rein antérieur ont été effectués au temps 0, 6h, 24h, 48h et 72h afin de pouvoir établir une cinétique de l'expression des cytokines au cours de l'inflammation mais également d'étudier si l'ajout de nucléotides dans l'alimentation module la réponse inflammatoire intestinale. Les mesures n'ont pour l'instant pu être effectuées qu'à partir des tissus intestinaux mais aucun signal correspondant à l'expression de cytokines inflammatoires n'a pu être enregistré par PCR en temps réel. Ceci traduit l'absence de réponse inflammatoire au niveau de la muqueuse intestinale des poissons infectés dans nos conditions expérimentales et aux temps où nous l'avons mesuré. Il semble donc que le protocole que nous avons mis au point pour étudier la réponse inflammatoire intestinale soit mal adapté. Une première hypothèse est que la dose d'infection utilisée était trop faible. Effectivement, nous avons observé qu'avec une dose de 5.10^3 (CFU/ml) la mortalité des poissons au bout de 5 jours était supérieure à 70%. Afin de conserver assez d'individus pour l'ensemble des prélèvements nous avons donc réduit cette dose à 2.10^3 CFU/ml. Il est alors possible que celle-ci n'ait pas été assez forte pour induire une réponse inflammatoire mesurable durant les 72 heures de test après infection même si les poissons montraient des signes physiques tels que des taches brunes sur la peau, signes caractéristiques d'une infection à *L. anguillarum*. Il se peut également que le mode d'administration choisi n'ait pas permis d'observer la réponse inflammatoire dans les trois jours suivants l'infection. Dans leurs études, Mulder et al. (2007) ont infecté les poissons par bain en mettant la bactérie directement dans l'eau des bacs (1.10^5 bactéries par ml d'eau) et Komatsu et al. (2009) ont utilisé un procédé d'infection trans-anal. Ici, nous avons choisi d'injecter les bactéries par voie intrapéritonéale, qui est moins favorable à l'infection de la muqueuse intestinale mais plutôt à la contamination systémique. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser les échantillons provenant de rein antérieur des poissons infectés. Sur la

base de ces hypothèses, nous allons donc prochainement mettre en place de nouveaux essais afin de pouvoir étudier l'influence des nucléotides sur la réponse inflammatoire intestinale.

Les résultats obtenus lors des tests sur les lymphocytes intestinaux des poissons non infectés indiquent que l'ajout de nucléotides aux doses de 600ppm et 3000ppm dans l'alimentation augmente la prolifération de ces cellules en culture en absence de mitogène. Effectivement, les indices de prolifération mesurés à partir de lymphocytes issus des poissons nourris avec un aliment supplémenté avec 600ppm et de ceux nourris avec un aliment supplémenté avec 3000ppm sont significativement supérieurs à celui du groupe contrôle. Cependant, il n'y a pas de différence entre l'indice de prolifération mesuré après l'ajout de 600ppm de nucléotides dans l'aliment ou de 3000ppm. Il est possible que la réponse enregistrée à 600ppm soit déjà la réponse maximale. Il serait donc intéressant dans les prochains essais d'utiliser une dose intermédiaire située entre 0 et 600ppm, afin de déterminer la dose nécessaire et suffisante de nucléotides à ajouter dans l'aliment. De plus, il faudrait également réaliser une cinétique afin de déterminer la durée d'efficacité des nucléotides après l'arrêt de la supplémentation alimentaire. Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent pour la première fois qu'un régime supplémenté en nucléotides libres améliore la prolifération *in vitro* des lymphocytes intestinaux et que cette modulation est similaire à celle observée avec des lymphocytes du sang périphérique. Effectivement nous avons observé lors de la même étude une tendance à l'augmentation ($p=0.01$) des indices de prolifération des lymphocytes du sang périphérique issus des groupes de poissons nourris avec un aliment supplémenté en nucléotides (600ppm et 3000ppm). Cet effet a, par la suite, été confirmé statistiquement à des doses plus faibles de nucléotides lors d'autres études réalisées ultérieurement au CRNA. Chez les poissons, peu d'études ont pour l'instant été publiées sur ce sujet, seuls Ramadan et al. (1994) ont montré une augmentation de la réponse aux mitogènes des lymphocytes du sang périphérique des tilapias vaccinés lorsque ceux-ci étaient nourris avec un aliment supplémenté en nucléotides (5g/kg de nourriture). Par contre, chez les mammifères de nombreuses études ont montré que les nucléotides augmentaient la réponse proliférative aux mitogènes spécifiques des cellules T (PHA, ConA) alors qu'aucun effet n'était observé avec les mitogènes spécifiques des cellules B (LPS) (Kulkarni et al, 1989; Jyonouchi et al, 1994; Carver & Walker 1995; Gil et al, 1997, Rueda & Gil, 2000; Gil, 2001). Bien qu'il ait été impossible de mesurer une réponse aux mitogènes (PHA, PWM et LPS) des lymphocytes intestinaux, nous avons pu mettre en évidence un effet bénéfique des nucléotides sur la prolifération spontanée de ces cellules en culture *in vitro* grâce à l'utilisation de la technique de CFSE mesurée par cytométrie en flux.

Afin de déterminer quelles sous-populations de lymphocytes sont sensibles aux nucléotides, nous avons mesuré l'expression des gènes des marqueurs spécifiques des lymphocytes T et B, respectivement Pax-5 et CD3. Les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les groupes de poissons nourris avec les nucléotides et le groupe contrôle. Étudié dans ces conditions, il ne

semble pas qu'un régime supplémenté en nucléotides influence l'expression de ces gènes. Néanmoins, il faut noter que ces premières expériences n'ont pas été réalisées avec des lymphocytes cultivés pendant 6 jours, comme lors des analyses de prolifération, mais à partir de leucocytes fraîchement extraits des poissons. Afin de savoir quels types de lymphocytes répondent aux nucléotides lors des tests de prolifération il faudrait extraire les ARN totaux des leucocytes après les 6 jours de culture *in vitro*. De premiers tests ont été réalisés dans ce sens mais la quantité d'ARN récoltée à partir des cellules restantes après 6 jours de culture n'a pas été suffisante à la conduite des PCR en temps réel. Ceci est probablement dû à la trop faible quantité de cellules dans le puits, puisqu'il faut un nombre de cellules minimal de 1.10^6 et dans l'idéal de 1.10^7 pour obtenir une quantité d'ARN suffisante et de bonne qualité pour la conduite des tests des PCR en temps réel. Or les puits de culture sont ensemencés avec seulement 3.10^5 cellules et le nombre de leucocytes obtenus après l'isolement cellulaire ne permet pas d'ensemencer assez de puits avec des cellules issues du même poisson afin de pouvoir réaliser en parallèle les tests cellulaires et moléculaires. Il serait intéressant dans un prochain temps de renouveler ces tests en récoltant les leucocytes de plusieurs poissons après les 6 jours de culture afin d'atteindre un nombre de cellules plus important. Une autre stratégie serait d'utiliser des leucocytes issus de poissons différents pour les tests cellulaires et moléculaires. D'autres mises au point seront donc nécessaires avant de parvenir à corrélérer l'expression des transcrits codant pour les marqueurs des lymphocytes et la prolifération de ces mêmes lymphocytes en culture *in vitro*.

Enfin, concernant les effets des nucléotides libres sur la synthèse de l'immunoglobuline spécifique à la muqueuse intestinale, l'IgT, les résultats indiquent que ceux-ci n'influencent pas l'expression du gène codant la chaîne lourde d'IgT. A nouveau, cette mesure ayant été réalisée sur des poissons sains, nos résultats reflètent la synthèse basale de cette immunoglobuline. Afin de déterminer si les nucléotides peuvent stimuler la production des IgT lors d'une réponse immunitaire, il sera intéressant d'utiliser des poissons vaccinés, idéalement par voie orale. Nous pourrions également nous servir de la mesure d'expression de ce gène pour déterminer si les nucléotides augmentent la prolifération *in vitro* de la population spécifique de lymphocytes B de la muqueuse intestinale qui exprime uniquement IgT comme immunoglobuline de surface.

A la suite de ces premiers essais nous avons décidé d'analyser les effets d'un régime supplémenté en nucléotides sur la phagocytose, la cytotoxicité naturelle et l'apoptose mais en utilisant une gamme de doses moins étendue. Les réponses obtenues lors des tests de prolifération des lymphocytes semblent effectivement indiquer que la réponse maximum est déjà atteinte aux alentours de 600 ppm. Nous avons donc décidé de supplémenter cette fois-ci l'aliment avec 375 et 750 ppm de nucléotides, 375ppm étant la dose recommandée par DSM Nutritional Products sur la base d'essais de prolifération réalisés par l'équipe du groupe aquaculture du CRNA en parallèle du travail de thèse.

Concernant la phagocytose, nos données indiquent que l'ajout de nucléotides dans l'alimentation semble améliorer l'activité de phagocytose des macrophages intestinaux des truites arc-en-ciel. Même si l'analyse statistique ne permet pas de détecter une augmentation significative entre les différents groupes de poissons, il semble tout de même fortement que l'activité de phagocytose mesurée est plus importante lors de l'ajout de 750 ppm de nucléotides dans l'aliment qu'avec l'ajout de 375 ppm. En 1989, Kulkarni et al. ont montré chez des souris infectées par *S. aureus* une augmentation de la phagocytose lorsque les animaux étaient nourris avec un aliment supplémenté en ARN. Plus récemment en 2001, Sakai et al. ont démontré chez la carpe que l'administration orale d'une dose croissante de nucléotides (0.15, 1.5 et 15 mg par poisson) augmentait, et cela de manière dose dépendante, le pourcentage de cellules du rein antérieur ayant phagocyté des billes de latex. Malgré les variations inter-individus observées dans notre étude, il semble qu'à l'instar de ce qui a été observé au niveau systémique chez la carpe, les nucléotides ajoutés à l'alimentation des truites arc-en-ciel ont un effet positif sur le pourcentage de phagocytes intestinaux ayant ingérés au moins une levure. Il sera néanmoins nécessaire de renouveler cette expérience avec un nombre plus important d'individus afin de confirmer ces données.

Les données obtenues lors de cet essai montrent également que des truites arc-en-ciel nourries avec un régime supplémenté en nucléotides et celles nourries avec un régime non supplémenté conservent la même activité de cytotoxicité naturelle. Nos résultats ne montrent aucune différence entre les unités lytiques mesurées avec les NCC du groupe contrôle et celles mesurées avec les NCC issues des poissons nourris avec les régimes supplémentés. Peu d'études ont pour le moment été publiées concernant ce sujet. Néanmoins Carver et al. ont montré en 1990 qu'un ajout de nucléotides dans l'eau de boisson de souris juste sevrées (3.5mg/100ml) augmentait l'activité des NK. Il semble donc que les nucléotides peuvent avoir un effet positif sur l'activité des NK des mammifères. Une étude réalisée au sein du centre de recherche en nutrition animale de DSM Nutritional Products avec des NCC du rein antérieur de truite arc-en-ciel a également démontré que l'ajout de nucléotides dans l'aliment n'influait pas l'activité cytotoxique naturelle des NCC (données non présentées). Sur la base des résultats obtenus lors de ces essais, il semble donc que la supplémentation des aliments avec des nucléotides n'influence pas l'activité cytotoxique naturelle des truites arc-en-ciel, ni au niveau local ni au niveau systémique. En ce qui concerne l'apoptose des cellules immunes, les résultats obtenus lors de cet essai montrent que l'ajout de nucléotides dans le régime alimentaire des truites n'influence pas la mort cellulaire programmée des lymphocytes intestinaux en culture *in vitro*. En effet, le pourcentage de lymphocytes en apoptose, qu'elle soit induite ou non par la camptothécine, reste identique d'un groupe de poisson à l'autre. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des lymphocytes provenant du rein antérieur lors d'autres essais testant l'effet d'un régime supplémenté en nucléotides sur l'apoptose des lymphocytes en culture *in vitro* réalisés au centre de recherche en nutrition animale (données non présentées). Les pourcentages d'apoptose présentés dans ce travail correspondent au pourcentage de

cellules en apoptose après 2 heures de culture *in vitro*. Etant donné les résultats positifs observés lors des essais de prolifération, il serait intéressant dans un prochain essai de mesurer l'apoptose des leucocytes après 6 jours de culture cellulaire afin de voir si l'augmentation des divisions cellulaires observée en prolifération est accompagnée d'une baisse de l'apoptose cellulaire.

En conclusion, les différentes analyses effectuées à partir de leucocytes intestinaux issus de truite arc-en-ciel nourries avec un régime supplémenté en nucléotides ont permis d'obtenir les premiers résultats concernant la modulation de la réponse immune locale par les nucléotides alimentaires. Il a donc été démontré qu'en absence de stimulation mitogénique, l'ajout de nucléotides dans le régime alimentaire des truites entraîne une augmentation de l'indice de prolifération des lymphocytes intestinaux en culture *in vitro*. Une tendance similaire est également observée avec les lymphocytes du sang périphérique dans les mêmes conditions de culture. L'ajout de nucléotides dans l'alimentation semble également améliorer la phagocytose *in vitro* de levures par les macrophages intestinaux des truites arc-en-ciel. Ces résultats prouvent que les nucléotides lorsqu'ils sont ajoutés à l'alimentation des poissons stimulent certaines fonctions immunes intestinales de la truite arc-en-ciel. Ces observations ajoutées aux effets positifs observés au niveau systémique confirment l'intérêt de l'utilisation des nucléotides comme additif alimentaire à effet immunostimulant. Afin d'approfondir cette première étude il serait intéressant à l'avenir de déterminer, par des études cinétiques, durant combien de temps est observé l'effet positif des nucléotides et la relation entre la dose et la durée de la supplémentation.

Par contre, aucune stimulation n'a été observée sur la cytotoxicité naturelle, l'apoptose, ni dans les niveaux d'expressions des marqueurs spécifiques des lymphocytes B et T dans nos conditions expérimentales. De la même façon, l'expression basale des cytokines inflammatoires au niveau intestinal n'est pas modifiée par l'ajout des nucléotides dans l'alimentation des truites arc-en-ciel. Concernant l'expression des marqueurs spécifiques des lymphocytes et l'apoptose il sera nécessaire de poursuivre les premiers tests cellulaires initiés au sein du laboratoire afin d'étudier l'expression de CD3 et Pax-5 ainsi que le pourcentage d'apoptose avec des leucocytes mis en culture durant 6 jours. Pour ce qui est de l'expression des cytokines inflammatoires et de la production d'IgT, il faudra répéter le challenge infectieux décrit précédemment en modifiant les paramètres expérimentaux, notamment la dose et le mode d'administration. Ce travail a d'ailleurs déjà été débuté car un autre challenge vient d'être réalisé avec une dose plus forte de *L. Anguillarum*, les résultats n'ont pas encore pu être analysés. Il a déjà été démontré qu'un régime supplémenté en nucléotides diminuait de plus de 10% au bout de 12 jours le taux de mortalité des truites arc-en-ciel lors d'une infection avec *V. Anguillarum* (Burrels et al. 2001). Un challenge comparable a aussi été réalisé par DSM Nutritional Products en collaboration avec l'université de Berne et a aussi montré un effet positif de la supplémentation en nucléotides. Une autre perspective de cette seconde partie de thèse serait d'utiliser le poisson infecté

comme modèle pour une étude plus approfondie de la prolifération lymphocytaire et de sa modulation par une supplémentation en nucléotides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGRAWAL, P.K. and REYNOLDS, D.L., 1999. An evaluation of the mitogenic reactivity of intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens. *Avian Diseases*, 43(2), pp. 172-181.
- BAILEY, M., 2009. The mucosal immune system: Recent developments and future directions in the pig. *Developmental and comparative immunology*, 33(3), pp. 375-383.
- BAILEY, M., HALL, L., BLAND, P.W. and STOKES, C.R., 1994. Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal *lamina propria* of pigs. *Immunology*, 82(4), pp. 577-583.
- BALCÁZAR, J.L., VENDRELL, D., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., GIRONÉS, O. and MUZQUIZ, J.L., 2006. Immune modulation by probiotic strains: Quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 29(5-6), pp. 335-343.
- BASCOVE, M., GUÉGUINOU, N., SCHAERLINGER, B., GAUQUELIN-KOCH, G. and FRIPPIAT, J.P., 2011. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB Journal*, 25(9), pp. 2947-2955.
- BEDARD, P.A., ALCORTA, D., SIMMONS, D.L., LUK, K.C. and ERIKSON, R.L., 1987. Constitutive expression of a gene encoding a polypeptide homologous to biologically active human platelet protein in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(19), pp. 6715-6719.
- BEFUS, A.D., JOHNSTON, N., LESLIE, G.A. and BIENENSTOCK, J., 1980. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *Journal of Immunology*, 125(6), pp. 2626-2632.
- BERNARD, D., SIX, A., RIGOTTIER-GOIS, L., MESSIAEN, S., CHILMONCZYK, S., QUILLET, E., BOUDINOT, P. and BENMANSOUR, A., 2006. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *Journal of Immunology*, 176(7), pp. 3942-3949.
- BIANCHI, A.T.J., ZWART, R.J., JEURISSEN, S.H.M. and MOONEN-LEUSEN, H.W.M., 1992. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: An immunohistological approach. *Veterinary immunology and immunopathology*, 33(3), pp. 201-221.

- BIENENSTOCK, J., PEREY, D.Y., GAULDIE, J. and UNDERDOWN, B.J., 1973. Chicken A: physicochemical and immunochemical characteristics. *Journal of Immunology*, 110(2), pp. 524-533.
- BIMCZOK, D., RAU, H., SEWEKOW, E., JANCZYK, P., SOUFFRANT, W.B. and ROTHKÖTTER, H., 2008. *Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro*.
- BINNS, R.M. and LICENCE, S.T., 1985. Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 186, pp. 661-668.
- BORDA, E., MARTINEZ-PUIG, D. and CORDOBA, X., 2003. Well-balanced nucleotide supply makes sense. *Feed Mix*, 11, pp. 24-26.
- BRANDTZAEG, P. and JOHANSEN, F., 2003. *I, 4. Immunology of the gut*.
- BRIHEIM, G., STENDAHL, O. and DAHLGREN, C., 1984. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infection and immunity*, 45(1), pp. 1-5.
- BROWN, W.R. and BUTLER, J.E., 1994. Characterization of a Ca gene of swine. *Molecular immunology*, 31(8), pp. 633-642.
- BROWN, G.D., HERRE, J., WILLIAMS, D.L., WILLMENT, J.A., MARSHALL, A.S.J. and GORDON, S., 2003. *Dectin-1 mediates the biological effects of B-glucans*.
- BROWN, W.R., KACSKOVICS, I., AMENDT, B.A., BLACKMORE, N.B., ROTHSCHILD, M., SHINDE, R. and BUTLER, J.E., 1995. The hinge deletion allelic variant of porcine IgA results from a mutation at the splice acceptor site in the first Ca intron. *Journal of Immunology*, 154(8), pp. 3836-3842.
- BRUNNER, T., ARNOLD, D., WASEM, C., HERREN, S. and FRUTSCHI, C., 2001. Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes. *Cell death and differentiation*, 8(7), pp. 706-714.
- BRYANT, J., DAY, R., WHITESIDE, T.L. and HERBERMANN, R.B., 1992. Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 146(1), pp. 91-103.
- BURNS, R.B., 1982. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Research in Veterinary Sciences*, 32, pp. 359-367.

BURRELLS, C., WILLIAMS, P.D. and FORNO, P.F., 2001. Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds: 1. Effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture*, 199, pp. 159-169.

BURRELLS, C., WILLIAMS, P.D., SOUTHGATE, P.J. and WADSWORTH, S.L., 2001. Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 199, pp. 171-184.

BYRNES, S., EATON, R. and KOGUT, M., 1993. In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *International journal for parasitology*, 23(5), pp. 639-645.

CARVAJAL, B.G., METHNER, U., PIEPER, J. and BERNDT, A., 2008. Effects of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on cellular recruitment and cytokine gene expression in caecum of vaccinated chickens. *Vaccine*, 26(42), pp. 5423-33.

CARVER, J.D., 1994. Dietary nucleotides: Cellular immune, intestinal and hepatic system effects. *Journal of Nutrition*, 124, pp. 144S-148S.

CARVER, J.D., COX, W.I. and BARNES, L.A., 1990. Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14, pp. 18-22.

CARVER, J.D. and ALLAN WALKER, W., 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *The Journal of nutritional biochemistry*, 6(2), pp. 58-72.

CAVAILLON, J.M., 1995. Les cytokines de l'inflammation : Cytokines et aspect biochimiques de l'inflammation. *Comptes rendus des séances de la société de biologie et de ses filiales*, 189(4), pp. 531-544.

CHANDRA, R.K. and KUMARI, S., 1994. Nutrition and immunity: An overview. *Journal of Nutrition*, 124(8 SUPPL.), pp. 1433S-1435S.

CHANG, L., GUSEWITCH, G.A., CHRITTON, D.B.W., FOLZ, J.C., LEBECK, L.K. and NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L., 1993. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods*, 166(1), pp. 45-54.

CHEN, Y., CHOU, K., FUCHS, E., HAVRAN, W.L. and BOISMENU, R., 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 99, pp. 14338-14343.

CHEROURTRE, H., 2004. Starting at the beginning: New perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annual Review of Immunology*, 22, pp. 217-246.

CHETTRI, J.K., RAIDA, M.K., HOLTEN-ANDERSEN, L., KANIA, P.W. and BUCHMANN, K., 2011. PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and comparative immunology*, 35(4), pp. 476-482.

CHOI, S.H., KORNEGAY, E.T. and EIGEL, W.N., 1991. Characterizations of small intestinal mucus glycoproteins from pigs of various ages. *Comparative Biochemistry and Physiology - part A Molecular & Integrative Physiology*, 99(4), pp. 677-680.

CHU, R.M., GLOCK, R.D., ROSS, F.R. and COX, D.F., 1979. Lymphoid tissues in the small intestine of swine from birth to one month of age. *American Journal of Veterinary Research*, 40, pp. 1713-1719.

CHU, R.M. and LIU, C.H., 1984. Morphological and functional comparisons of Peyer's patches in different parts of the swine small intestine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 6(3-4), pp. 391-403.

CLERTON, P., TROUTAUD, D., VERLHAC, V., GABAUDAN, J. and DESCHAUX, P., 2001. Dietary vitamin e and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: Effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(1), pp. 1-13.

CRHANOVA, M., HRADECKA, H., FALDYNOVA, M., MATULOVA, M., HAVLICKOVA, H., SISAK, F. and RYCHLIK, I., 2011. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infection and Immunity*, 79(7), pp. 2755-63.

DAHLGREN, C., FOLLIN, P., JOHANSSON, A., LOCK, R. and ORSELIUS, K., 1989. Localization of the luminol-dependent chemiluminescence reaction in human granulocytes. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 4(1), pp. 263-266.

DALMO, R.A. and BØGWALD, J., 2008. β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(4), pp. 384-396.

DAVIDSON, G.A., ELLIS, A.E. and SECOMBES, C.J., 1991. Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 14(6), pp. 651-659.

DAWSON, H.D., BESHAK, E., NISHI, S., SOLANO-AGUILAR, G., MORIMOTO, M., ZHAO, A., MADDEN, K.B., LEDBETTER, T.K., DUBEY, J.P., SHEA-DONOHUE, T., LUNNEY, J.K. and URBAN JR., J.F., 2005. Localized

multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infection and immunity*, 73(2), pp. 1116-1128.

DEBARD, N., SIERRA, F., BROWNING, J. and KRAEHNBUHL, J.-., 2001. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse peyer's patches. *Gastroenterology*, 120(5), pp. 1173-1182.

DEL CACHO, E., GALLEGO, M., SANZ, A. and ZAPATA, A., 1993. Characterization of distal lymphoid nodules in the chicken caecum. *Anatomical Record*, 237(4), pp. 512-517.

DU-HYUNG, K. and AUSTIN, B., 2006. Cytokine expression in leukocytes and gut cells of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114, pp. 297-304.

EVANS, D.H., 1998. The physiology of fishes. 2nd ed: CRC Press, pp. 43-64.

FAGARASAN, S. and HONJO, T., 2003. Intestinal IgA synthesis: Regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), pp. 63-72.

FORTUN-LAMOTHE, L. and BOULLIER S., 2004. Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico) Sept. 2004, WRSA ed.*, pp.1035-1067.

FOURNIER-BETZ, V., QUENTEL, C., LAMOUR, F. and LEVEN, A., 2000. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 10(2), pp. 187-202.

FREIHORST, J. and OGRA, P.L., 2001. Mucosal immunity and viral infections. *Annals of Medicine*, 33(3), pp. 172-177.

FRIEDMAN, A., BAR-SHIRA, E. and SKLAN, D., 2003. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World Poultry Science*, 59, 209-219.

GEBERT, A., ROTHKOTTER, H., PABST, R., 1994. Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Research*, 276, 213-221.

GEORGOPOULOU, U. and VERNIER, J., 1986. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Developmental and comparative immunology*, 10(4), pp. 529-537.

GETTY, R., 1975. Sisson and Grossman's the Anatomy of the Domestic Animals. *Saunders 2*, pp. 1874-1875.

GIL, A., 2001. New additions to infant formulas. In: C. LIFTSCHITZ, *Pediatric Gastroenterology and Nutrition in Clinical Practice*, edited by Marcel Dekker, New York, pp. 113-135.

GIL, A., MARTINEZ-AUGUSTIN, O. and NAVARRO, J., 1997. Role of dietary nucleotides in the modulation of the immune response In: J.A. BELLANTI, R. BRACCI, G. PRINDULL and M. XANTHOU, *Neonatal Hematology and Immunology III*, edited by Elsevier Science, Amsterdam, pp. 139-144.

GÖBEL, T.W.F., KASPERS, B. and STANGASSINGER, M., 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International immunology*, 13(6), pp. 757-762.

GOODMAN, R.B., FOSTER, D.C., MATHEWES, S.L., OSBORN, S.G., KUIJPER, J.L., FORSTROM, J.W. and MARTIN, T.R., 1992. Molecular cloning of porcine alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic factors I and II: Identification of porcine IL-8 and another intercrine-a protein. *Biochemistry*, 31(43), pp. 10483-10490.

GREENWOOD, J.H., AUSTIN, L.L. and DOBBINS III, W.O., 1983. In vitro characterization of human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*, 85(5), pp. 1023-1035.

GUILLAUME, J., KAUSHIH, S., BERGOT, P. and METAILLER, R., 1999. Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Edited by INRA / IFREMER, pp. 490.

HAMADA, H., HIROI, T., NISHIYAMA, Y., TAKAHASHI, H., MASUNAGA, Y., HACHIMURA, S., KAMINOGAWA, S., TAKAHASHI-IWANAGA, H., IWANAGA, T., KIYONO, H., YAMAMOTO, H. and ISHIKAWA, H., 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *Journal of Immunology*, 168(1), pp. 57-64.

HANSEN, J.D., LANDIS, E.D. and PHILLIPS, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), pp. 6919-6924.

HARDER, W., 1975. *Anatomy of fishes*. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.

HART, S., WRATHMELL, A.B., HARRIS, J.E. and GRAYSON, T.H., 1988. Gut immunology in fish: A review. *Developmental and comparative immunology*, 12(3), pp. 453-480.

- HARUN, N.O., WANG, T. and SECOMBES, C.J., 2011. Gene expression profiling in naïve and vaccinated rainbow trout after *Yersinia ruckeri* infection: Insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish. *Vaccine*, 29(26), pp. 4388-4399.
- HASHIMOTO, T., OHNO, N. and YADOMAE, T., 1997. Subgrouping immunomodulating β -glucans by monitoring IFN- γ and NO syntheses. *Drug Development Research*, 42(1), pp. 35-40.
- HAVERSON, K., SINGHA, S., STOKES, C.R. and BAILEY, M., 2000. Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology*, 101(4), pp. 492-500.
- HAYARI, Y., SCHAUENSTEIN, K. and GLOBERSON, A., 1982. Avian lymphokines. II: Interleukine-1 activity in supernatants of stimulated adherent splenocytes of chickens. *Developmental and comparative immunology*, 6(4), pp. 785-789.
- HÉBERT, P., AINSWORTH, A.J. and BOYD, B., 2002. Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells. *Developmental and comparative immunology*, 26(1), pp. 53-62.
- HENDERSON, S.C., BOUNOUS, D.I. and LEE, M.D., 1999. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infection and immunity*, 67(7), pp. 3580-3586.
- HOKARI, R., MIURA, S., NAGATA, H., FUJIMORI, H., KOSEKI, S., KATO, S., KUROSE, I., SEKIZUKA, E., GRANGER, D.N. and ISHII, H., 2001. Intercellular cell adhesion molecule-1 regulates lymphocyte movement into intestinal microlymphatics of rat Peyer's patches. *Journal of leukocyte biology*, 70(6), pp. 896-902.
- HONG, Y.H., LILLEHOJ, H.S., HYEN LEE, S., WOON PARK, D. and LILLEHOJ, E.P., 2006. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF). *Developmental and comparative immunology*, 30(10), pp. 919-929.
- HUETHER, M.J., LIN, G., SMITH, D.M., MURTAUGH, M.P. and MOLITOR, T.W., 1993. Cloning, sequencing and regulation of an mRNA encoding porcine interleukin-1 β . *Gene*, 129(2), pp. 285-289.
- HYLAND, K.A., BROWN, D.R. and MURTAUGH, M.P., 2006. *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis infection of the porcine jejunal Peyer's patch rapidly induces IL-1 β and IL-8 expression. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109(1-2), pp. 1-11.

HYLAND, K.A., KOHRT, L., VULCHANOVA, L. and MURTAUGH, M.P., 2006. Mucosal innate immune response to intragastric infection by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Molecular Immunology*, 43(11), pp. 1890-1899.

JONES, S.R.M., 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Developmental and comparative immunology*, 25(8-9), pp. 841-852.

JYONOUCHI, H., 1994. Nucleotide actions on humoral immune responses. *Journal of Nutrition*, 124(1 SUPPL.), pp. 138S-143S.

KAISER, P., HUGHES, S. and BUMSTEAD, N., 1999. The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken Chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster. *Immunogenetics*, 49(7-8), pp. 673-684.

KATOH, S., KITAZAWA, H., SHIMOSATO, T., TOHNO, M., KAWAI, Y. and SAITO, T., 2004. Cloning and characterization of swine interleukin-17, preferentially expressed in the intestines. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 24(9), pp. 553-559.

KIM, D.K., HONG, Y.H., PARK, D.W., LAMONT, S.J. and LILLEHOJ, H.S., 2008. Differential immune-related gene expression in two genetically disparate chicken lines during infection by *Eimeria maxima*. *Developmental Biology*, 132, pp. 131-140.

KITAGAWA, H., HIRATSUKA, Y., IMAGAWA, T. and UEHARA, M., 1998. Distribution of lymphoid tissue in the caecal mucosa of chickens. *Journal of anatomy*, 192(2), pp. 293-298.

KITAGAWA, H., IMAGAWA, T. and UEHARA, M., 1996. The apical caecal diverticulum of the chicken identified as a lymphoid organ. *Journal of anatomy*, 189(3), pp. 667-672.

KITAGAWA, H., SHIRAISHI, S., IMAGAWA, T. and UEHARA, M., 2000. Ultrastructural characteristics and lectin-binding properties of M cells in the follicle-associated epithelium of chicken caecal tonsils. *Journal of anatomy*, 197(4), pp. 607-616.

KOGUT, M.H., 2002. Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokinen in the recruitment oh heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella enteridis*. *Comparative Immunology and Microbiology Infection Disease*. 25, 159-172.

KOMATSU, K., TSUTSUI, S., HINO, K., ARAKI, K., YOSHIURA, Y., YAMAMOTO, A., NAKAMURA, O. and WATANABE, T., 2009. Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the

rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in response to bacterial infection. *Developmental and comparative immunology*, 33(4), pp. 499-506.

KOPPANG, E.O., FISCHER, U., MOORE, L., TRANULIS, M.A., DIJKSTRA, J.M., KÖLLNER, B., AUNE, L., JIRILLO, E. and HORDVIK, I., 2010. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of anatomy*, 217(6), pp. 728-739.

KORZENIEWSKI, C. and CALLEWAERT, D.M., 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 64(3), pp. 313-320.

KRINGEL, H., IBURG, T., DAWSON, H., AASTED, B. and ROEPSTORFF, A., 2006. A time course study of immunological responses in *Trichuris suis* infected pigs demonstrates induction of a local type 2 response associated with worm burden. *International journal for parasitology*, 36(8), pp. 915-924.

KUHNERT, P., WUTHRICH, C., PETERHANS, E. and PAULI, U., 1991. The porcine tumor necrosis factor-encoding genes: Sequence and comparative analysis. *Gene*, 102(2), pp. 171-178.

KULKARNI, A., FANSLOW, W., HIGLEY, H., PIZZINI, R., RUDOLPH, F. and VAN BUREN, C., 1989. Expression of immune cell surface markers in vivo and immune competence in mice by dietary nucleotides. *Transplantation proceedings*, 21(1 I), pp. 121-124.

KULKARNI, A.D., RUDOLPH, F.B. and VAN BUREN, C.T., 1994. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: A review. *Journal of Nutrition*, 124(8 SUPPL.), pp. 1442S-1446S.

LAŠT'OVICKA, J., BUDINSKÝ, V., ŠPÍŠEK, R. and BARTUNKOVÁ, J., 2009. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cellular immunology*, 256(1-2), pp. 79-85.

LAURIDSEN, J.H. and BUCHMANN, K., 2010. Effects of short- and long-term glucan feeding of rainbow trout (Salmonidae) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 40(1), pp. 61-66.

LEBACQ-VERHEYDEN, A.M., VAERMAN, J.P. and HEREMANS, J.F., 1972. A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions. *Immunology*, 22(1), pp. 165-175.

LEBLANC, C.J., DIETRICH, M.A., HOROHOV, D.W., BAUER, J.E., HOSGOOD, G. and MAULDIN, G.E., 2007. Effects of dietary fish oil and vitamin E supplementation on canine lymphocyte proliferation evaluated using a flow cytometric technique. *Veterinary immunology and immunopathology*, 119(3-4), pp. 180-188.

- LEWIS, J.A. and SOUTHERN, L.L., 2001. Swine nutrition. Edited by CRC press, pp. 1009.
- LI, P. and GATLIN III, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251(2-4), pp. 141-152.
- LI, P., LEWIS, D.H. and GATLIN III, D.M., 2004. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 16, pp. 561-569.
- LIEBLER-TENORIO, E.M. and PABST, R., 2006. MALT structure and function in farm animals. *Veterinary research*, 37(3), pp. 257-280.
- LEONARDI, M., SANDINO, A.M. and KLEMPAU, A., 2003. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin European Association Fish Pathology*, 23, pp. 52-59.
- LILLEHOJ, H.S., 1994. Analysis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal T lymphocyte sub-populations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Research in Veterinary Science*, 56, pp. 1-7.
- LILLEHOJ, H.S., MIN, W. and DALLOUL, R.A., 2004. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science* . 83, pp. 611-623.
- LILLEHOJ, H.S. and TROUT, J.M., 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical microbiology reviews*, 9(3), pp. 349-360.
- LIN, G., PEARSON, A.E., SCAMURRA, R.W., ZHOU, Y., BAARSCH, M.J., WEISS, D.J. and MURTAUGH, M.P., 1994. Regulation of interleukin-8 expression in porcine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), pp. 77-85.
- LIU, D., YU, J., CHEN, H., REICHMAN, R., WU, H. and JIN, X., 2006. Statistical determination of threshold for cellular division in the CFSE-labeling assay. *Journal of immunological methods*, 312(1-2), pp. 126-136.
- 'LORROT, L., 'BENHAMADOUICHE-CASARI, H. and 'VASSEUR, M., 2005. Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Virologie*, 9, pp. 9-18.
- LOW, C., WADSWORTH, S., BURRELLS, C. and SECOMBES, C.J., 2003. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. *Aquaculture*, 221(1-4), pp. 23-40.

- LU, Y., SARSON, A.J., GONG, J., ZHOU, H., ZHU, W., KANG, Z., YU, H., SHARIF, S. and HAN, Y., 2009. Expression profiles of genes in toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(11), pp. 1639-1647.
- LY, J., 1979. Aspectos morfológicos del sistema digestivo del cerdo. Edited by: *Centro de Información y Documentación Agropecuario*.
- LYONS, A.B., 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), pp. 147-154.
- LYONS, A.B. and PARISH, C.R., 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 171(1), pp. 131-137.
- MACPHERSON, A., KHOO, U.Y., FORGACS, I., PHILPOTT-HOWARD, J. and BJARNASON, I., 1996. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut*, 38(3), pp. 365-375.
- MCMILLAN, D.N. and SECOMBES, C.J., 1997. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish and Shellfish Immunology*, 7(8), pp. 527-541.
- MOCKETT, A.P.A., 1986. Monoclonal antibodies used to isolate IgM from chicken bile and avian sera and to detect specific IgM in chicken sera. *Avian Pathology*, 15, pp. 337-348.
- MORRISON, R.N., LYONS, A.B., NOWAK, B.F. and HAYBALL, J.D., 2004. Snapper (*Pagrus auratus*) leucocyte proliferation is synergistically enhanced by simultaneous stimulation with LPS and PHA. *Fish and Shellfish Immunology*, 16(3), pp. 307-319.
- MUIR, W.I., BRYDEN, W.L. and HUSBAND, A.J., 1998. Evaluation of the Efficacy of Intraperitoneal Immunization in Reducing *Salmonella typhimurium* Infection in Chickens. *Poultry science*, 77(12), pp. 1874-1883.
- MUIR, W.I., BRYDEN, W.L. and HUSBAND, A.J., 2000. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Developmental and Comparative Immunology*, 24, pp. 325-342.
- MULDER, I.E., WADSWORTH, S. and SECOMBES, C.J., 2007. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(4), pp. 747-759.

MURTAUGH, M.P., 1994. Porcine cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 43(1-3), pp. 37-44.

NAUSS, K.M., PAVLINA, T.M., KUMAR, V. and NEWBERNE, P.M., 1984. Functional characteristics of lymphocytes isolated from the rat large intestine. Response to T-cell mitogens and natural killer cell activity. *Gastroenterology*, 86(3), pp. 468-475.

NOOR, S.M., HUSBAND, A.J. and WIDDERS, P.R., 1995. In ovo oral vaccination with *Campylobacter jejuni* establishes early development of intestinal immunity in chickens. *British poultry science*, 36(4), pp. 563-573.

OLIVIER, M., BERTON, P. and SALMON, H., 1996. Localisation immunohistochimique dans l'intestin de porc des composantes cellulaires et humorales de la réponse immunitaire. *Veterinary Research*, 51, pp. 57-65.

OTTEN, M.A. and VAN EGMOND, M., 2004. The Fc receptor for IgA (FcaRI, CD89). *Immunology letters*, 92(1-2), pp. 23-31.

PABST, R., GEIST, M., ROTHKOTTER, H.J. and FRITZ, F.J., 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology*, 64(3), pp. 539-544.

PARK, S., KO, H., SHIM, D., YANG, J., PARK, Y., CURTISS III, R. and KWEON, M., 2008. MyD88 signaling is not essential for induction of antigen-specific B cell responses but is indispensable for protection against *Streptococcus pneumoniae* infection following oral vaccination with attenuated *Salmonella* expressing PspA antigen. *Journal of Immunology*, 181(9), pp. 6447-6455.

PARRY, S.H., ALLEN, W.D. and PORTER, P., 1977. Intestinal immune response to E. coli antigens in the germ free chicken. *Immunology*, 32(5), pp. 731-741.

PAULI, U., BEUTLER, B. and PETERHANS, E., 1989. Porcine tumor necrosis factor alpha: cloning with the polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *Gene*, 81(1), pp. 185-191.

PEPPARD, J.V., ROSE, M.E. and HESKETH, P., 1983. A functional homologue of mammalian secretory component exists in chickens. *European journal of immunology*, 13(7), pp. 566-570.

PICCHIETTI, S., TERRIBILI, F.R., MASTROLIA, L., SCAPIGLIATI, G. and ABELLI, L., 1997. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anatomy and Embryology*, 196(6), pp. 457-463.

- PIRIOU, L., CHILMONCZYK, S., GENETET, N. and ALBINA, E., 2000. Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry*, 41(4), pp. 289-297.
- PORSTMANN, T., TERNYNCK, T. and AVRAMEAS, S., 1985. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: An enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *Journal of immunological methods*, 82(1), pp. 169-179.
- POST, G., 1987. Textbook of Fish Health - Revised and Expanded - rev edition. Edited by: REV 87, T.F.H. Publications, Inc.
- QIN, Q.W., OTOTAKE, M., NOGUCHI, K., SOMA, G.-., YOKOMIZO, Y. and NAKANISHI, T., 2001. Tumor necrosis factor alpha (TNF α)-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(3), pp. 245-256.
- RAMADAN, A., AFIFI, N.A., MOUSTAFA, M.M., SAMY, A.M., 1994. The effect of ascogen on the immune response of Tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Fish and Shellfish Immunology*, 4, pp. 159-165.
- REVILLA, C., CHAMORRO, S., ALVAREZ, B., PÉREZ, C., EZQUERRA, A., ALONSO, F. and DOMÍNGUEZ, J., 2005. Analysis of functional heterogeneity of porcine memory CD4 + T cells. *Developmental and comparative immunology*, 29(5), pp. 479-488.
- REYA, T. and CLEVERS, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), pp. 843-850.
- ROMBOUT, J.H.W.M., TAVERNE-THIELE, A.J. and VILLENA, M.I., 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): An immunocytochemical analysis. *Developmental and comparative immunology*, 17(1), pp. 55-66.
- ROTHE, G., OSER, A. and VALET, G., 1988. Dihydrorhodamine 123: A new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*, 75(7), pp. 354-355.
- RUEDA, R. and GIL, A., 2000. Influence of dietary compounds on intestinal immunity. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(SUPPL. 2), pp. 146-156.
- SAKAI, M., TANIGUCHI, K., MAMOTO, K., OGAWA, H. and TABATA, M., 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, 24(8), pp. 433-438.

- SALINAS, I., MESEGUER, J. and ESTEBAN, M.Á., 2007. Assessment of different protocols for the isolation and purification of gut associated lymphoid cells from the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biological Procedures Online*, 9(1), pp. 43-55.
- SALMON, H., 1987. The intestinal and mammary immune system in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 17(1-4), pp. 367-388.
- SCOTT, A.L. and KLESIUS, P.H., 1981. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. *Developments in biological standardization*, 49, pp. 243-254.
- SECOMBES, C.J., WANG, T., HONG, S., PEDDIE, S., CRAMPE, M., LAING, K.J., CUNNINGHAM, C. and ZOU, J., 2001. Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and comparative immunology*, 25(8-9), pp. 713-723.
- SECOMBES, C.J., ZOU, J., LAING, K., DANIELS, G.D. and CUNNINGHAM, C., 1999. Cytokine genes in fish. *Aquaculture*, 172(1-2), pp. 93-102.
- SHANMUGASUNDARAM, R. and SELVARAJ, R.K., 2011. In vitro lipopolysaccharide treatment alters regulatory T cell properties in chickens. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3-4), pp. 476-481.
- SHAU, H., GUPTA, R.K. and GOLUB, S.H., 1993. Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells. *Cellular immunology*, 147(1), pp. 1-11.
- SMYTHIES, L.E., SELLERS, M., CLEMENTS, R.H., MOSTELLER-BARNUM, M., MENG, G., BENJAMIN, W.H., ORENSTEIN, J.M. and SMITH, P.D., 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), pp. 66-75.
- SNOECK, V., PETERS, I.R. and COX, E., 2006. The IgA system: A comparison of structure and function in different species. *Veterinary research*, 37(3), pp. 455-467.
- SOLEM, S.T. and STENVIK, J., 2006. Antibody repertoire development in teleosts - A review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental and comparative immunology*, 30(1-2), pp. 57-76.
- SOMMERSET, I., KROSSØY, B., BIERING, E. and FROST, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), pp. 89-101.

STAVE, J.W., ROBERSON, B.S. and HETRICK, F.M., 1983. Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from the pronephros of striped bass. *Developmental and comparative immunology*, 7(2), pp. 269-276.

STEVENS, C.E. and HUME, I.D., 1995. Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. 2nd edn. Edited by: *Cambridge University Press, New York*.

STOKES, C.R. and BAILEY, M., 2000. The porcine gastrointestinal *lamina propria*: An appropriate target for mucosal immunisation? *Journal of Biotechnology*, 83(1-2), pp. 51-55.

STOKES, C.R., BAILEY, M. and WILSON, A.D., 1994. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Veterinary immunology and immunopathology*, 43(1-3), pp. 143-150.

SUBASINGHE, R.P., 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: Opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive veterinary medicine*, 67(2-3 SPEC. ISS.), pp. 117-124.

SYDORA, B.C., MIXTER, P.F., HOLCOMBE, H.R., EGHTEADY, P., WILLIAMS, K., AMARAL, M.C., NEL, A. and KRONENBERG, M., 1993. Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogenic signals. *Journal of Immunology*, 150(6), pp. 2179-2191.

TAHMASEBI-KOBYANI, A., KEYVANSHOKOOH, S., NEMATOLLAHI, A., MAHMOUDI, N. and PASHA-ZANOOSI, H., 2011. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), pp. 189-193.

TAKIZAWA, F., DIJKSTRA, J.M., KOTTERBA, P., KORYTÁŘ, T., KOCK, H., KÖLLNER, B., JAUREGUIBERRY, B., NAKANISHI, T. and FISCHER, U., 2011. The expression of CD8 α discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Developmental and comparative immunology*, 35(7), pp. 752-763.

TAKIZAWA, F., KOPPANG, E.O., OHTANI, M., NAKANISHI, T., HASHIMOTO, K., FISCHER, U. and DIJKSTRA, J.M., 2011. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular immunology*, 48(12-13), pp. 1360-1368.

TREES, A.J., KARIM, M.J., MCKELLAR, S.B. and CARTER, S.D., 1989. Eimeria tenella: local antibodies and interactions with the sporozoite surface. *Journal of Protozoology*, 36(4), pp. 326-333.

- TREPEL, F., 1974. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift*, 52(11), pp. 511-515.
- UAUY, R., 1994. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *Journal of Nutrition*, 124(1 SUPPL.), pp. 157S-159S.
- UTKE, K., BERGMANN, S., LORENZEN, N., KÖLLNER, B., OTOTAKE, M. and FISCHER, U., 2007. Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(3), pp. 182-196.
- VAN HEMERT, S., HOEKMAN, A.J.W., SMITS, M.A. and REBEL, J.M.J., 2007. Immunological and gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine. *Veterinary Research*, 38, pp. 51-63.
- VAN IMMERSEEL, F., DE BUCK, J., DE SMET, I., MAST, J., HAESEBROUCK, F. and DUCATELLE, R., 2002. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal *lamina propria* of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Developmental and comparative immunology*, 26(4), pp. 355-364.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. and SPELEMAN, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7),.
- VEGA-LOPEZ, M.A., TELEMO, E., BAILEY, M., STEVENS, K. and STOKES, C.R., 1993. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the *lamina propria*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 37(1), pp. 49-60.
- VERLHAC, V., 2010. Nutrition and immunity: An update. *Aquaculture Research*, 41(3), pp. 356-372.
- VERLHAC, V. and GABAUDAN, J., 2005. The effect of vitamin C on fish health. Edited by: *DSM Nutritional Products 51644. Basel, Switzerland*.
- VERLHAC, V. and VISWANATH, K., 2004. Nutrition and immune modulation in aquatic animals. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond*, 1(4), pp. 5-9.
- VERVELDE, L. and JEURISSEN, S.H.M., 1993. Postnatal development of intra-epithelial leukocytes in the chicken digestive tract: Phenotypical characterization *in situ*. *Cell Tissue Research*, 274, pp. 295-301.

- VERVELDE, L., VERMEULEN, A.N. and JEURISSEN, S.H.M., 1996. In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunology*, 18(5), pp. 247-56.
- VERVELDE, L., VERMEULEN, A.N. and JEURISSEN, S.H.M., 1992. In situ immunocytochemical detection of cells containing antibodies specific for *Eimeria tenella* antigens. *Journal of immunological methods*, 151(1-2), pp. 191-199.
- VIJTIUK, N., TRUTIN-OSTOVIĆ, K., BALENOVIĆ, T., POPOVIĆ, M. and VALPOTIĆ, I., 2002. Functional and phenotypic analyses of porcine gut immune cells immunized by oral administration of F4ac+ nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Veterinarni Medicina*, 47(12), pp. 333-341.
- WANG, T., HOLLAND, J.W., MARTIN, S.A.M. and SECOMBES, C.J., 2010. Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5), pp. 705-715.
- WEINING, K.C., SICK, C., KASPERS, B. and STAEHELI, P., 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin-1β: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *European Journal of Biochemistry*, 258(3), pp. 994-1000.
- WERSHIL, B.K. and FURUTA, G.T., 2008. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2 SUPPL. 2), pp. S380-S383.
- WIDDERS, P.R., PERRY, R., MUIR, W.I., HUSBAND, A.J. and LONG, K.A., 1996. Immunisation of chickens to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *British poultry science*, 37(4), pp. 765-778.
- WILDERS, M.M., DREXHAGE, H.A. and WELTEVREDEN, E.F., 1983. Large mononuclear Ia-positive veiled cells in Peyer's patches. I. Isolation and characterization in rat, guinea pig and pig. *Immunology*, 48(3), pp. 453-460.
- WILSON, A.D., STOKES, C.R. and BOURNE, F.J., 1986. Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: A comparison between murine and porcine responses. *Immunology*, 58(4), pp. 621-625.
- WINTERØ, A.K., JØRGENSEN, C.B., ROBIC, A., YERLE, M. and FREDHOLM, M., 1998. Improvement of the porcine transcription map: Localization of 33 genes, of which 24 are orthologous. *Mammalian Genome*, 9(5), pp. 366-372.

WITHANAGE, G.S.K., KAISER, P., WIGLEY, P., POWERS, C., MASTROENI, P., BROOKS, H., BARROW, P., SMITH, A., MASKELL, D. and MCCONNELL, I., 2004. Rapid Expression of Chemokines and Proinflammatory Cytokines in Newly Hatched Chickens Infected with *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Infection and immunity*, 72(4), pp. 2152-2159.

YODER, J.A., 2004. Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 138(3), pp. 271-280.

ZAPATA, A. and AMEMIYA, C.T., 2000. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Current Topic in Microbiology and Immunology*, 248, pp. 67-107.

ZAPATA, A.G., CHIBÁ, A. and VARAS, A., 1997. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. *Fish Physiology*, 15, pp. 1-62.

ZHANG, H., EVENHUIS, J.P., THORGAARD, G.H. and RISTOW, S.S., 2001. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*, 25, pp. 25-35.

ZHANG SHUPING, LILLEHOJ, H.S. and RUFF, M.D., 1995. In vivo role of tumor necrosis-like factor in *Eimeria tenella* infection. *Avian Diseases*, 39(4), pp. 859-866.

ZHANG, S., LILLEHOJ, H.S. and RUFF, M.D., 1995. Chicken tumor necrosis-like factor. I. In vitro production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. *Poultry science*, 74(8), pp. 1304-1310.

ZHANG, Y.-., SALINAS, I., LI, J., PARRA, D., BJORK, S., XU, Z., LAPATRA, S.E., BARTHOLOMEW, J. and SUNYER, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*, 11(9), pp. 827-835.

PUBLICATION

MARTIN, E., VERLHAC TRICHET, V., LEGRAND-FROSSI, C. and FRIPPIAT, J., 2012. Comparison between intestinal and non-mucosal immune functions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(6), pp. 1258-1268.



Comparison between intestinal and non-mucosal immune functions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Eve Martin^{a,b,*}, Viviane Verlhac Trichet^a, Christine Legrand-Frossi^b, Jean-Pol Fripiat^b

^aResearch Center for Animal Nutrition and Health, DSM Nutritional Products France, 1 Bd d'Alsace, P.O. Box 170, 68305 Saint Louis Cedex, France

^bLorraine University, Faculty of Medicine, Development and Immunogenetics, JE 2537, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2012

Received in revised form

15 August 2012

Accepted 10 September 2012

Available online 28 September 2012

Keywords:

Immune response

Rainbow trout

Intestine

Head kidney

Leukocytes

ABSTRACT

Since mucosal surfaces represent major portals of entry for pathogens, its associated immune system is important to protect the organism. In this paper, we compared at the cellular and molecular levels intestinal leukocyte suspensions with their head kidney (HK) or peripheral blood (PBL) counterparts to highlight characteristics of intestinal immune functions in healthy rainbow trout. These studies show that intestinal phagocytes are less activated by yeast cells but when they are activated they can ingest as many yeast cells as their HK counterparts. A natural cytotoxic activity could be detected which is twice higher in intestinal than in HK leukocyte preparations. This natural cytotoxic activity is correlated with the expression of transcripts encoding the natural killer enhancement factor (NKEF). Intestinal leukocytes did not respond to an *in vitro* mitogenic stimulation performed under classical culture conditions. And finally, a high expression of CD8 α transcripts was observed in gut leukocyte preparations, suggesting that the intestine could contain a high proportion of T cells expressing the $\alpha\alpha$ homodimeric form of CD8. This kind of comparison on nonimmunized fish provides better knowledge on basal immune functions in the intestine to, analyze later on, immune responses induced by an antigenic stimulation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The intestinal mucosa is constantly in contact with a wide variety of antigens, including potential pathogens and food antigens present in the lumen. The large surface of this mucosa, further amplified by the numerous villi and microvilli in mammals or by mucosal plicae in fish, increases the risk of pathogen entry thereby highlighting the importance of the immune system associated to the intestinal mucosa. Histological studies have identified this immunological tissue in teleost fish [1–4]. Although it does not contain lymphoid structures such as mammalian germinal centers [5], it is composed of a diffuse population of leukocytes comprising phagocytes, natural cytotoxic cells and lymphocytes present in the epithelium and the lamina propria of the fish intestine [6–10]. Several authors reported phagocytic activity of rainbow trout,

Oncorhynchus mykiss, intestinal macrophages against fluorescent latex microspheres, yeast and radioactively labeled live or inactivated bacteria *in vitro* [11–13]. McMillan and Secombes [8] detected a nonspecific cytotoxic response of intestinal leukocytes against the EL4 mouse thymoma cell line. Zhang et al. [14] demonstrated that rainbow trout express NKEF, a factor enhancing the action of natural killer cells in mammals. Furthermore, it was shown that fish intestine contains a large population of T cells as shown by the expression of specific T cells markers [15,16], most of them expressing CD8 [16]. CD8 can be homodimers of two alpha chains or heterodimers of one alpha and one beta chain. In mammals, 90% of circulating T lymphocytes express the heterodimeric forms of CD8 whereas homodimeric CD8 molecules are predominantly expressed by natural killer and intraepithelial lymphocytes (IEL). As in mammals, trout CD8 is a dimeric transmembrane glycoprotein [17]. Moreover, Wang et al. and Takizawa et al. [18,19] recently demonstrated the existence of the T-bet and GATA3 transcription factors and the IL4/13A cytokine in rainbow trout which suggest the presence of Th1 and Th2 responses. The discovery of IgT, an immunoglobulin isotype associated to the intestinal mucosa of rainbow trout [20,21], confirms the presence of B cells in this tissue. Furthermore, molecular investigations reported constitutive expressions of inflammatory cytokines, IL-1 β , TNF- α and IL-8, in the

Abbreviations: NKEF, natural killer enhancing factor; HK, head kidney; IEL, intraepithelial lymphocyte; NCC, natural cytotoxic cell; PBL, peripheral blood leukocyte; AUC, area under the curve.

* Corresponding author. Research Centre for Animal Nutrition and Health, DSM Nutritional Products France, 1 Bd d'Alsace, P.O. Box 170, 68305 Saint Louis Cedex, France. Tel.: +33 3 89 69 66 70; fax: +33 3 89 69 66 05.

E-mail address: eve.martin@dsm.com (E. Martin).

intestine of rainbow trout [22–25]. These cytokines have properties similar to the ones of their mammalian orthologs [26]. Based on this similarity, it could be hypothesized that resident cells of fish intestinal mucosa could modulate local immunity via the secretion of various cytokines, as seen in mammals [27].

In this study, we used cellular and molecular approaches to study rainbow trout's intestinal immune functions. Based on prior knowledge of the rainbow trout systemic immune response, we studied major functions linked to actors of the innate and adaptive components of the immune system at the level of the intestine and compared them with results obtained at the level of HK or peripheral blood. For the innate immunity, we studied the oxidative burst, the phagocytic and cytotoxic activities in relation to the expression of the NKEF gene and the expression of pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α and IL-8) transcripts. For the adaptive immunity, we studied lymphocyte proliferative responses, apoptosis, and the expression of CD3, CD8 α , CD8 β , GATA3, T-bet, IL4/13A, Pax5, IgM and IgT heavy chain transcripts. We believe that, in the future, this kind of comparative study is interesting to analyze fish immune responses induced by an antigenic stimulation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female rainbow trout (*O. mykiss*) of body weight ranging from 130 to 230 g were raised from the egg stage at the Research Centre for Animal Nutrition & Health of DSM Nutritional Products in Village-Neuf, France. Animals were treated in accordance with the national legislation and the European community directive (86/609/EEC). Fish were maintained in 250 L sub-square tanks, part of a recirculating unit supplied with tap water at 15 °C \pm 1 °C with partial renewal. Maximum biomass per tank was 25 kg/m³. Fish were fed with a standard trout diet.

2.2. Anesthesia and dissection

Trout were anesthetized with MS222 (Tricaine methane sulfonate MS222, 100 g/L; Thomson, Ref: Vm 01360/4000) and euthanized by a blow to the head. Blood samples were taken from anesthetized fish with a heparinised syringe. Fish were bled and ventrally dissected to remove the entire gastrointestinal tract and the HK. After being carefully unrolled, the portion of the intestine from the pyloric caeca to the anus was cleared from its perivisceral fat, incised in its length, and feces and undigested food were washed off. Tissues were then kept in culture medium (RPMI 1640, Sigma, Ref. R7638), on ice until further processing. All experiments were performed using four to twelve individuals.

2.3. Cell isolation

2.3.1. Isolation of intestinal leukocytes

Intestinal leukocytes were isolated following the chemical and enzymatic method of Salinas et al. [28] and Davidson et al. [11] except that all steps were performed at 4 °C and all reagents were diluted in culture medium. Gut samples from individual fish were washed twice in fresh culture medium and cut into small pieces in 15 mL of DTT solution (0.145 mg/mL, Sigma, Ref. D5545) + EDTA (0.37 mg/mL, Sigma, Ref. E-9884). After 10 min of incubation at 22 °C with gentle agitation, supernatants were removed and samples were washed three times with fresh culture medium before being incubated for 60 min at 22 °C under vigorous agitation in 25 mL of medium containing collagenase type II (0.37 mg/mL, Sigma, Ref. C6885), DNase I (0.05 mg/mL, Sigma,

Ref. DN-25), fish serum (0.5%, Interchim, Ref. N82800F), penicillin and streptomycin (25 units/mL + 25 μ g/mL respectively, Sigma, Ref. P0781). Cells contained in the supernatant were collected by filtration of the digested samples through a 100 μ m nylon mesh. Tissues remaining in the filtration mesh were further grinded and rinsed with 5 mL of culture medium. Cells collected in the culture medium after this grinding step, were added to those present in the supernatant to maximize cell recovery. These cell suspensions were centrifuged (10 min, 488 g). The pellets were resuspended in 5 mL of culture medium and passed through a 10 mL syringe filled with 2.5 g of nylon wool. Columns were rinsed with 5 mL of culture medium and drained to obtain the final cell suspensions that were kept at 4 °C until further processed (density gradient). During the optimization of this protocol we determined its impact on cellular profile and viability using flow cytometry. Moreover, after each isolation step, the viability of our cells was determined with trypan blue exclusion test. Cell suspensions did always present viability above 90%.

2.3.2. Isolation of head kidney leukocytes

The HK from individual fish was crushed through a metallic mesh in 5 mL of culture medium and filtered through a 30 μ m nylon mesh, rinsed with 10 mL of culture medium and kept at 4 °C until further processed (density gradient).

2.3.3. Density gradient centrifugation

The Ficoll solution (10–15 mL Ficoll-Paque PLUS, 1.077 g/mL Amersham, Ref. 17-1440-03) was carefully layered under the diluted cell suspensions obtained from intestine, HK or peripheral blood (1 mL blood in 15 mL of culture medium). After centrifugation (40 min, 1356 g, 4 °C) the interface between the Ficoll solution and the sample was collected. Leukocyte-enriched suspensions were centrifuged (10 min, 488 g, 4 °C) and filtered through a 30 μ m nylon mesh. This operation was repeated a second time for the HK but not for the intestine because of the low yield of cell isolation. Cells were resuspended in 1 mL of culture medium, counted using a Thoma hemacytometer and their viability evaluated using Trypan blue. May–Grünwald/Giemsa cytopsin staining of the obtained intestinal, HK and peripheral blood leukocyte suspensions were performed to determine the percentages of the different cell types present in each suspension of leukocytes. In all cases, we counted 200 cells in each of 4 cytopsin.

2.4. Analysis of cellular parameters

2.4.1. Oxidative burst

Two methods were used to study oxidative burst, the first one was based on chemiluminescence and the second one on flow cytometry. In each case suspensions of intestine or HK leukocytes were adjusted at 1×10^7 cells/mL in fresh RPMI 1640 culture medium.

Chemiluminescence was performed using a modification of the Scott & Klesius [29] and the Stave et al. [30] method. Briefly, 100 μ L of cell suspension were added to each well of a white microplate (VWR/Greiner, Ref. 736-0228). Working solutions of luminol (Sigma, Ref. A8511) and zymosan (Sigma, Ref. Z4250) opsonised with chicken serum were placed in the reservoirs of the luminometer (Tristar[®] LB941, Berthold Technologies) for injection of 50 μ L of luminol and 100 μ L of zymosan in each well. All reagents were diluted in Cortland solution (7.25 g NaCl, 0.23 g CaCl₂·H₂O, 0.38 g KCl, 0.41 g NaH₂PO₄·H₂O, 1 g NaHCO₃, 0.23 g MgSO₄·7H₂O, 1 g glucose/1 L H₂O, Sigma). Light emissions were measured over 180 min, generating a kinetic curve for each sample. The reaction started as soon as zymosan was added. The proportion of phagocytic cells present in each well was determined by flow cytometry

and results were expressed as the area under the curve (AUC) of the kinetic response for each sample as determined using the Micro-win[®] software. This AUC value was then corrected to take into account the proportion of phagocytic cells present in each sample.

For the flow cytometry method, 200 μL of cell suspension were placed in a Minisorp tube (VWR, Ref. 735-0017) with 80 μL of dihydrorhodamine 123 (DHR123, 25 μM , Sigma, Ref. D 1054) and 1680 μL of RPMI medium supplemented with 2% of fish serum, 50 units/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 2 mM L-glutamine (Sigma, Ref. G7513) and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Invitrogen, Ref. 31350-010). Tubes were protected from light and incubated during 15 min at room temperature. Then each sample was split in two equal volumes. Twenty μL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma, Ref. P 8139) were added in the test tube and 20 μL of supplemented RPMI 1640 medium in the control. Measures were done with a flow cytometer (FacsCalibur[®], BD Biosciences) on 10^4 events. Parameters of size (FSC-H), complexity (SSC-H) and green fluorescence (FL1-H) were recorded. Each tube was measured every 30 min during 120 min to follow the kinetics of the oxidative burst response. For each sample, the phagocyte-related fluorescence mean of control was subtracted and results were expressed as the total AUC determined as the sum of each time interval AUC.

2.4.2. Phagocytosis

Intestine or HK leukocyte suspensions were adjusted at 2×10^7 cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 2% fish serum, 50 units/mL Penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin, 2 mM L-Glutamine (Sigma, Ref. G7513) and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Invitrogen, Ref. 31350-010). The yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) suspension was adjusted at 2×10^8 cells/mL in supplemented culture medium at room temperature. Leukocyte and yeast cell suspensions were laid on culture slides at a ratio of 1/20: 1.5×10^6 fish cells/ $3 \cdot 10^7$ yeast cells, in 1-mL supplemented culture medium. After incubation (4 h, 22 °C) in a humid atmosphere, slides were rinsed to remove the non-ingested yeasts and stained with May–Grünwald/Giemsa after fixation with methanol. Phagocyte and yeast numerations were performed by microscopic observation with a 100 \times lens under immersion. Two hundred phagocytes were

observed per sample in order to estimate the number of ingested yeasts/phagocytes and the percentage of phagocytes which ingested at least one yeast. The following formula was used to calculate the phagocytosis index (PI):

$$PI = (P/Pt) \times Y$$

where

P = the number of phagocytes containing internalized yeasts.

Pt = the total number of phagocytes.

Y = the number of ingested yeast cell.

2.4.3. Natural cytotoxicity

The activity of natural cytotoxic cells (NCC) was measured using the method described by Chang et al. [31] with some modifications. The P815 mastocytoma cell line (ATCC[®] number TIB-64) was cultured with 3 passages following ATCC recommendations. Cultured cells were harvested from one 100 mL culture flask (Nunc) and adjusted to 1×10^6 cells/mL. The P815 target cells were then labeled with 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of 3,3'-diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate (CellBrite green cytoplasmic membrane-labelling kit, Interchim, Ref. JW7330). After incubation (1 h 30 min, 37 °C, 5% CO₂) the P815 target cells were washed twice (7 min, 125 g, room temperature), adjusted to 1×10^5 cells/mL in P815 culture medium and kept at 4 °C until use. Natural cytotoxic activity was measured at three different ratios of effector (fish):target (P815) cells: 75:1, 50:1, 25:1 for HK leukocytes and 25:1, 10:1, 5:1 for intestine leukocytes. The maximum of lysis was determined with 200 μL of the $1 \times 10^5/\text{mL}$ target cells suspension + 200 μL of RPMI 1640 + 40 μL of saponin at 3 mg/mL (Fluka, Ref. 84510). The minimal lysis was determined by placing 200 μL of the $1 \times 10^5/\text{mL}$ target cells suspension in 200 μL of RPMI 1640. After incubation (2 h, 22 °C, 5% CO₂) 130 μL of propidium iodide (PI, 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, Sigma, Ref. P4864) were added and the tubes further incubated protected from light for 15 min at 22 °C. All analyses were performed on 10,000 events counted in the target cell gate using a Fascalibur[®] flow cytometer (BD Biosciences) and the Cellquest software. For that, an acquisition

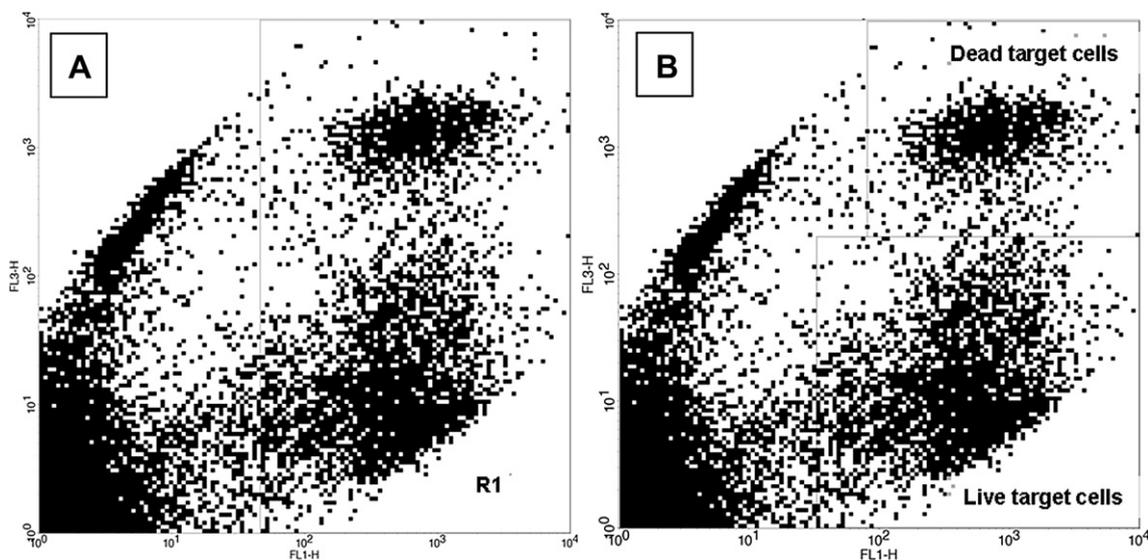


Fig. 1. A. Example of acquisition dot plot (FL1/FL3) obtained during natural cytotoxic assays. FL1-H corresponds to the green fluorescence of DiO⁺ cells and FL3-H to the red fluorescence of IP⁺ cells. Cell populations in gate R1 represent dead (DiO⁺; IP⁺) and live (DiO⁺; IP⁻) P815 target cells. Measures were done on 104 events that appeared in gate R1. B. Example of natural cytotoxicity analysis dot plot (FL1/FL3) with a gate for dead (DiO⁺; IP⁺) and live (DiO⁺; IP⁻) target cells. Percentages of target cells present in each gate were determined and used for the calculation of lysis percentages.

dot plot FL1/FL3 with a gate including only target cells was defined (Fig. 1A). Results were expressed as a percentage of lysis for each ratio (Fig. 1B) using the formula:

$$\frac{((\text{sample lysis} - \text{minimal lysis}) / (\text{maximal lysis} - \text{minimal lysis})) * 100}{}$$

where

$$\begin{aligned} \text{Maximal and minimal lysis} &= (\text{dead target cells}/\text{total}) * 100 \\ \text{Sample lysis} &= (\text{dead target cells}/\text{total of target cells}) * 100 \end{aligned}$$

Percentages of lysis obtained with the three effector/target cell ratios were plotted on a graph to ensure that there is a linear dependence of the cytotoxicity from effector/target cell ratios. This linear regression allowed the determination of the number of lytic units. Lytic units were calculated according to the method describe by Bryant et al. [32]. One lytic unit was defined as the number of effector cells required to obtain 6% of lysis. The cytotoxic activity of each individual was calculated as the number of lytic units per 10^7 effector cells.

2.4.4. Apoptosis

Apoptosis was measured according to the Annexin V kit (APC Annexin V, BD Pharmingen, Ref. 550474) protocol with some modifications. Suspensions of intestine or HK leukocytes were adjusted to 5×10^6 cells/mL in supplemented culture medium and incubated with or without 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of camptothecin (1 mM, Sigma, Ref. C9911). After incubation (4 h, 22 °C, 5% CO_2) cells were washed twice and resuspended in Annexin V binding buffer. Cells were then incubated with Annexin V-APC and propidium iodide (0.05 mg/mL) for 15 min at 22 °C with 5% CO_2 . Analyses were performed on 10^4 events based on the lymphocyte population gate using a Fascalibur® flow cytometer (Fig. 2A) to determine the percentages of apoptotic and dead cells (Fig. 2B).

2.4.5. Proliferation

Proliferative responses were studied using the Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA Sytem, version 2 kit (GE Healthcare,

Ref. RPN250). Suspensions of peripheral blood (PBL) or intestinal leucocytes at 1.5×10^7 cells/mL (200 μL) were distributed in 96 well flat bottom microplates with 200 μL of supplemented culture medium and 20 μL of mitogens: phytohemagglutinin (PHA-P at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma, Ref. L1668), lipopolysaccharide (LPS at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma, Ref. L4516) and pokeweed mitogen (PWM at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma, Ref. L8777). Cells were cultured for 72 h at 22 °C in a 5% CO_2 atmosphere. After 72 h, cells were labeled with 24 μL of 10 μM dibromodeoxyuridine (BrdU). Cells were then fixed with 200 μL of fixative solution during 30 min. Wells were blocked for 30 min with 200 μL of blocking solution and further incubated with 100 μL of peroxidase labeled anti-BrdU monoclonal antibody solution for 90 min. After three washing steps with 200 μL of washing solution, cells were incubated for 15 min with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The reaction was stopped with 25 μL of 1 M sulfuric acid. The optical density (OD) was read on a spectrophotometer (Multiscan Ascent, Thermo Labsystems). Results were expressed as proliferation indexes corresponding to the OD determined for the samples cultured in the presence of mitogens divided by the OD determined for the samples cultured without mitogen.

2.5. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from intestinal or HK leukocytes using the RNeasy mini kit (Qiagen, Ref. 74104) and RNase free DNase (Qiagen, Ref. 79254) in accordance with manufacturer's recommendations. RNA concentrations and purities were measured by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific) and the absence of RNA degradation was checked by electrophoresis on an agarose gel. PCR were performed on each RNA preparation using primer specific of 3 housekeeping genes (Table 1) to demonstrate the absence of genomic DNA contamination. One μg of each RNA preparation was reverse transcribed using random hexamers and oligodT in a final volume of 20 μL .

2.6. Real-time PCR

CD3, CD8 α , CD8 β , cyclophyllin, EF1- α , GAPDH, GATA3, IgM, IgT, IL-1 β , IL4/13A, IL-8, NKEF, Pax5, T-bet and TNF- α specific primers

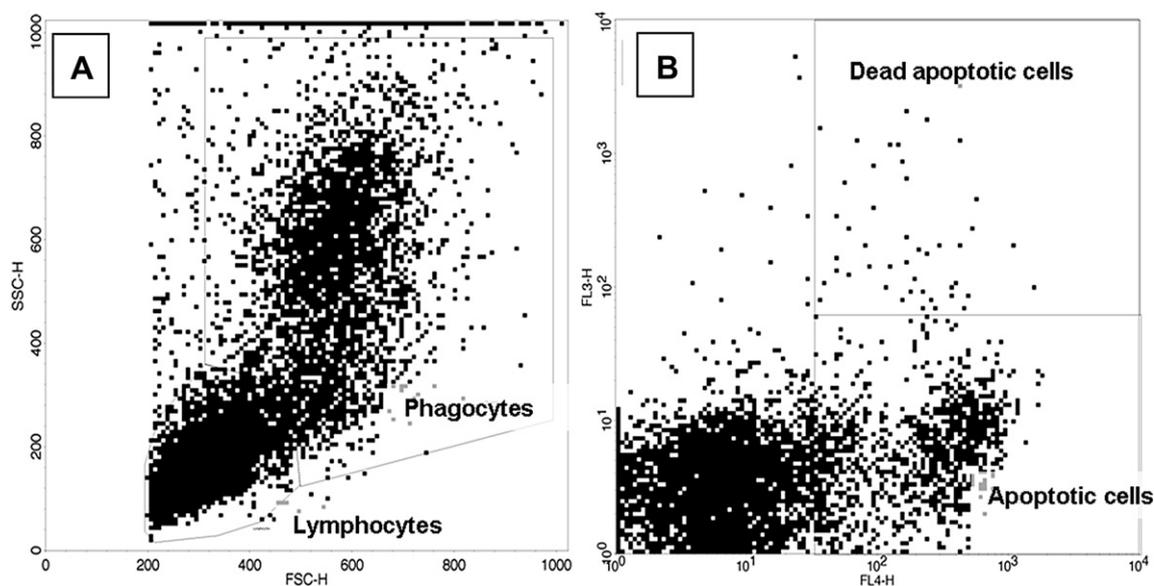


Fig. 2. A. Example of dot plot analysis showing the cellular profile (FSC/SSC) of a HK leukocyte suspension. The threshold of FSC-H was fixed at 200 to exclude cell debris. Measures were done on a total of 104 events. B. Example of apoptosis analysis dot plot (FL1/FL3) with gates for apoptotic and dead lymphocytes. FL4 and FL3 correspond to infra-red (APC^+) and red (IP^+) fluorescence, respectively. Apoptotic cells gate targets Annexin V (APC^+)/ IP^- cells and dead apoptotic cells gate targets Annexin V (APC^+)/ IP^+ cells. Percentages in these two gates indicate cells in early phase of apoptosis (APC^+ / IP^-) and in later phase of apoptosis (APC^+ / IP^+). Analyses were done on cells present in the lymphocyte gate of Fig. 2A.

Table 1
Primers used in this study to quantify various transcripts by real-time PCR.

Gene	GenBank ID	Primer sequence (5'–3')	Annealing temp
IL-1 β	AJ223954	CCTGATGAATGAGGCTATGG TTGGAGCAGGACAGGTAGAG	58
IL-8	AJ279069.1	CTCGCAACTGGACTGACAAA TGGCTGACATTCTGATGCTC	60
TNF- α	NM_001124357.1	GCCATCCATTAGAGGGTGA AAACGAAGCCTGGCTGTAAA	62
CD3	NM_001165113.1	GGAGTGTGGGACGGTTTCTA ACGAGACCGTAGAGCAGGAG	62
CD8 α	AF178054.1	AGCTGTGCATCAATCAATGG GGCCCAAACAATCAACTCAC	62
CD8 β	AY563420.1	CAGAGGTCGTACAGTGTGAG TCCCATGTCCCTTTTACTG	60
GATA3	NM_001195792.1	GCGCACAAACAGAGATTGGA TCCAAGGTCTGATCCAGTCC	60
T-bet	FM863825.1	CAGTCTCCCCCATCACACT GTTTCATGTACTGCGAGCAT	60
IL4/13A	AB574337.1	CTCCTCTCTGTTGCGATGGT TGGTGCGAGTCAAATGTGTT	62
		CGGCAGCATAGAAGTCACAA TCACCAAACGCGTCATTTT	62
		CAACCCAACCAAGATGAAGACG ^a CAACGGTGCATCTGAAGTTTC ^a	62
Pax5	NM_001124682.1	CAACGACAGTGTCCCACTG AGCTGAGCTGATTTCCAGAA	62
NKEF	NM_001124277.1	TGCCGAGGAGTTTAGGAAGA AATTTTCATGGCACCAGAG	62
IgM	S63348.1	GCGCTGTAGATCACATGGAA CTCATCGTCAACAAGCCAAG	62
IgT	AY870268.1	TGTTCTGCCATGAAGAGTGG CCACTGTCCTCCTCCACAT	62
GAPDH	AF027130.1	GCAGAAGGGAATCAAAGTCG ACGGAGATGGAGTGGTCATC	62
Cyclophilin	BG360543.1	GACAAGGGGTTTGGTACAA TGTTGCCGTAGATGGACTTG	62
EF1- α	AF498320.1	GGCAAGAACTTGAGGATGC ACAGTCTGCCTCATGTCCG	62

^a Indicates IL4/13A primers described by Takizawa et al. [19].

were designed using the primer3 software. IL4/13A primers designed by Takizawa et al. [19] were also used. To verify the specificity of the amplifications generated with our primers, PCR products were digested with various restriction enzymes. Real-time PCR were performed with the Realplex2S Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), as previously described [5] using 1 μ L of the cDNAs prepared above and the following cycling protocol: denaturation at 95 °C during 5 min, then 40 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at the annealing temperature indicated in Table 1. Standard curves were produced to ensure that amplification efficiencies were similar and in the range of 90%–110%. PCRs were performed in triplicate and repeated two times. Data were analyzed using the method of Vandesompele et al. [33]. This method revealed that cyclophilin, EF1- α and GAPDH were the appropriated housekeeping genes to normalize CD8 α , CD8 β , GATA3, IgM and T-bet expressions; GAPDH and cyclophilin should be used to normalize the NKEF and TNF- α expressions and EF1- α ; Cyclophilin should be used to normalize the expression of the other transcripts.

2.7. Statistics

Statistical analyses were performed with the Statbox Pro software (Grimmsoft) and consisted of parametric *t*-tests and non-parametric Mann–Whitney tests. Results are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences, $p < 0.05$, are indicated by different letters.

3. Results

3.1. Cell type characterization

We performed May–Grünwald/Giemsa cytospin staining to determine which cell types are present in the suspensions obtained after purification and in which proportions. These experiments indicate that PBL suspensions contained 88–97% of lymphocyte-like cells, 3–9% of monocytes, 1–3% of neutrophils and less than

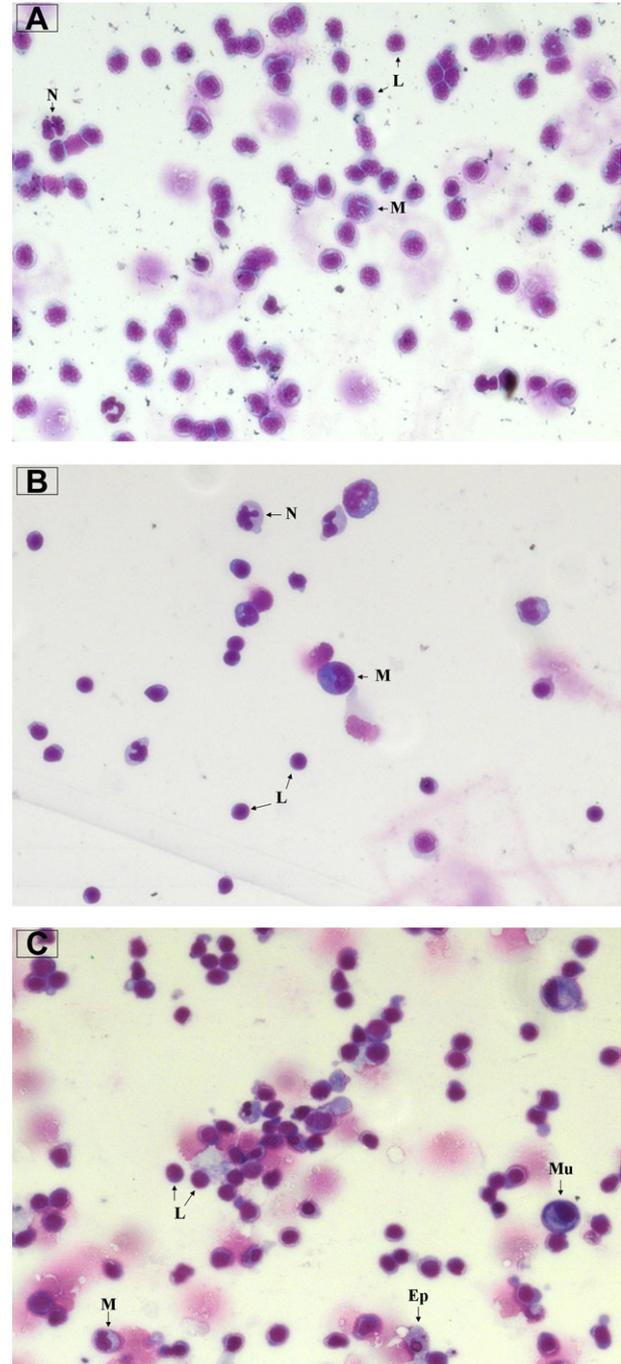


Fig. 3. May–Grünwald/Giemsa staining of purified peripheral blood (A), HK (B) and intestinal (C) leukocytes. L = lymphocyte-like cells. M = monocytes for peripheral blood or macrophages for HK and gut leukocyte suspensions. N = neutrophils. Mu = mucus cells. Ep = epithelial cells. 50 μ l of each leukocyte suspension were placed in a cytospin, fixed with methanol and stained. Observations were performed using an Axio Scope microscope (Zeiss) with a 100 \times lens under immersion.

0.4% of other cells (mostly erythrocytes) (Fig. 3A); HK leukocyte suspensions contained 49–66% of lymphocyte-like cells, 28–41% of macrophages, 5–13% of neutrophils and less than 1% of other cell types (Fig. 3B) and finally intestinal leukocytes suspensions contained 70–79% of lymphocyte-like cells, 12–16% of macrophages and 9–15% of other cells (mostly epithelial and mucus cells), (Fig. 3C). These differences are due to variations in leukocyte composition between tissues and to the different protocols used to extract leukocytes.

3.2. Innate immunity

In this study we compared leukocyte suspensions prepared from different healthy trout tissues. Functions of phagocytes and cytotoxic cells, and mRNAs coding for inflammatory molecules were studied in intestinal and HK leukocyte suspensions to improve our understanding of intestinal immune functions.

3.2.1. Functions of phagocytes

Since phagocytes represent an important line of defense against infections after skin and mucus, we studied their functions using different techniques. We first used chemiluminescence to measure the oxidative burst in HK and intestinal leukocyte preparations. The zymosan-induced production of reactive oxygen species (ROS) was measured using a specific substrate, luminol, which reacts with ROS to produce light that was quantified using a luminometer. A very low luminescent signal was produced with intestinal leukocytes using this method. The signal did not reach the background level and could therefore not be quantified, while a signal could be measured with HK leukocytes. Since this method was not

successful, we used flow cytometry to quantify PMA-induced intracellular ROS production using the dihydrorhodamine 123 (DHR 123) probe. This probe can cross the cell membrane and reacts with ROS. Unfortunately, no fluorescent peak could be registered with our intestinal leukocyte suspensions.

Regarding phagocytosis, Fig. 4A shows that HK and gut phagocytes ingested similar number of yeasts per cell. However, the percentage of cells which have ingested at least one yeast was statistically three times higher in HK than in gut leukocyte suspensions (Fig. 4B). This difference is confirmed by phagocytic indexes which were also statistically different: 113.3 ± 21.9 and 12.2 ± 1.84 for HK and intestinal phagocytes, respectively (Fig. 4C). These observations reflect true differences in phagocytosis because we analyzed the same number of phagocytes in both suspensions.

3.2.2. Expression of inflammatory cytokines transcripts

IL-1 β and TNF- α are important pro-inflammatory cytokines. These two cytokines govern the production of different molecules like enzymes and free radicals by immune cells. They are produced essentially by macrophages which also produce IL-8 involved in chemotaxis. Fig. 5 shows that the amounts of IL-8 and TNF- α mRNAs are the same in HK and intestinal leukocytes suspensions while the one of IL-1 β is three times lower in gut leukocyte suspensions. This last observation correlates with the lower number of macrophages and their lower activation in intestinal leukocyte preparations.

3.2.3. Natural cytotoxicity

Natural cytotoxic cells (NCC) are able to detect and kill xenogenic, allogenic and virus infected cells. The cytotoxic activity of

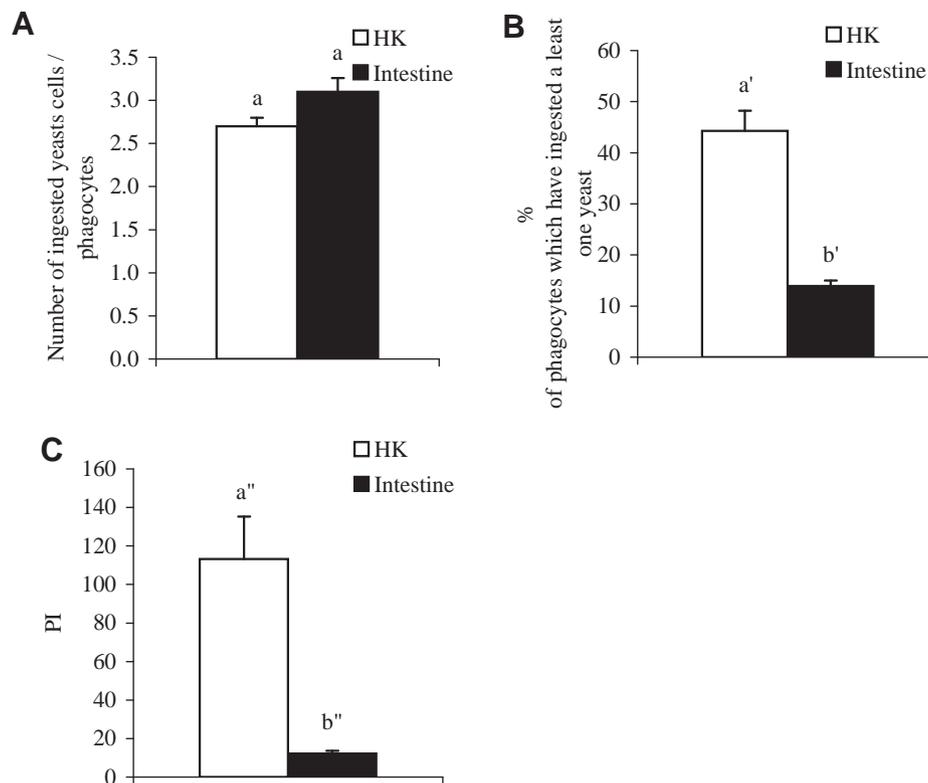


Fig. 4. Phagocytic activity of intestinal and HK leukocytes. Rainbow trout HK or intestinal leukocytes were incubated during 4 h with yeast cells (1 lymphoid cell for 20 yeasts) in the culture chamber of a microscope slide. After incubation, cells in suspension and non-ingested yeasts were removed and adherent cells fixed and May–Grunwald–Giemsa stained. Two hundred adherent cells were observed under the microscope to determine the average number of ingested yeasts/HK or intestinal phagocyte (A), the percentage of HK or intestinal phagocytes that have ingested at least one yeast (B) and the phagocytosis index (C) of both cell suspensions. Results are presented as average percentages \pm SEM of eight (HK) and nine (intestine) fish. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

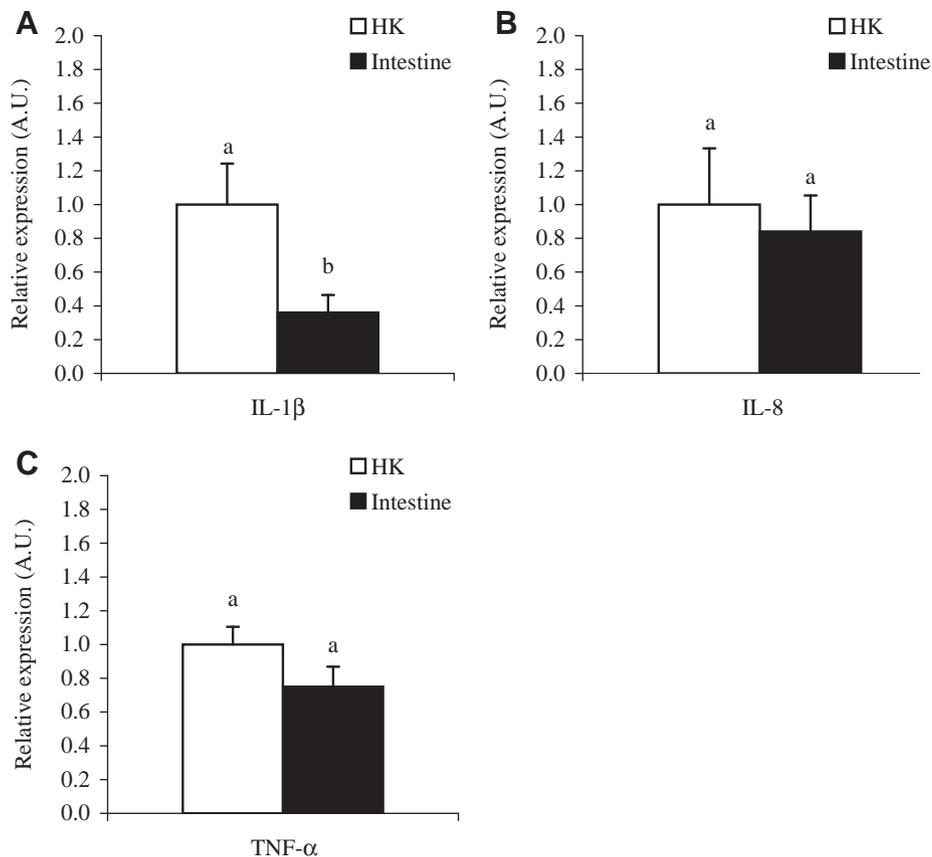


Fig. 5. Relative expression of pro-inflammatory cytokines mRNAs in intestinal and HK leukocyte suspensions, determined by qPCR. The expressions of IL-1 β (A) and IL-8 (B) were normalized by comparison to the expressions of the cyclophilin and GAPDH housekeeping genes. The expression of TNF- α (C) was normalized by comparison to that of cyclophilin and EF1- α . Relative values obtained for HK leukocytes were set to 1. Results represent average \pm SEM of 12 fish (8 fish for the expression of TNF- α mRNAs in HK suspensions). Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

trout NCC was measured at three ratios of effectors/target cells: 5:1, 10:1 and 25:1 for gut and 25:1, 50:1 and 75:1 for HK leukocyte suspensions. Different ratios were chosen because the yield of intestinal cell isolation was lower and did not allow testing ratio above 25:1. Lysis percentages of 3.79 ± 0.51 , 5.20 ± 1.28 and 13.17 ± 3.84 were obtained at the three ratios with gut leukocytes and of 6.25 ± 1.65 , 15.05 ± 3.50 and 25.91 ± 4.14 with HK leukocytes. Results were transformed into lytic units taking into account the three tested ratios. 55 ± 12.46 and 21 ± 3.52 lytic units were obtained with intestinal and HK leukocyte suspensions, respectively (Fig. 6). Thus, the cytotoxic activity present in intestinal leukocyte suspensions is two times higher than the one observed in HK suspensions. Interestingly, these results correlate with the level of transcription of the NKEF gene which is highly conserved between species and enhances the action of natural killer cells in mammals [14]. As shown in Fig. 7, the amount of NKEF transcripts is five times higher in leukocytes prepared from the intestine.

3.3. Adaptive immunity

3.3.1. Proliferative responses

The proliferative responses of leukocytes from intestinal and peripheral blood preparations were determined 72 h after stimulation with three mitogens: PHA-P, LPS and PWM. Results presented in Fig. 8 indicate that these 3 mitogens induced the proliferation of PBL but not of gut leukocytes. To check that these results were not due to cell apoptosis, we determined the level of apoptosis in our leukocyte preparations (Fig. 9). These experiments

indicate that ~80% of intestinal leukocytes were nonapoptotic. Moreover, our gut leukocyte preparations presented less than ~1% of necrosis. Thus, the lack of proliferative response of gut leukocytes was not due to an improper treatment during the purification procedure.

3.3.2. Expression of specific transcripts

Results presented in Fig. 10 indicate that the relative expression of CD3 (a marker specific of T-lymphocytes) is significantly higher in gut than in HK leukocyte suspensions while the expression of Pax5 (a marker specific of B-lymphocytes) is significantly lower in gut than in HK preparations. Given these results, we decided to quantify T-bet, GATA3, CD8 α and CD8 β transcripts as markers of Th1, Th2 and cytotoxic T-cells, respectively (Fig. 11), IL4/13A transcripts because they encode a major Th2 cytokine and IgM and IgT heavy chains transcripts as markers of B cell populations (Fig. 12). Fig. 11A and B shows that there is the same amount of the GATA3 transcripts in both leukocyte preparations and a lower amount of T-bet transcripts in gut leukocyte suspensions. Fig. 11C and D shows that there is an equivalent expression of CD8 β in both intestinal and HK leukocyte suspensions but a 10 times higher expression of CD8 α in intestinal preparations. These results suggest that there may be a higher proportion and/or activation of cytotoxic lymphocytes in intestinal suspensions and that most of these cytotoxic cells express the $\alpha\alpha$ homodimeric form of CD8. We used the primers designed by Takizawa et al. [19] to quantify IL-4/13A transcripts in intestinal and HK leukocyte suspensions. Unfortunately, the obtained Ct values were always ≥ 35 cycles thereby preventing the

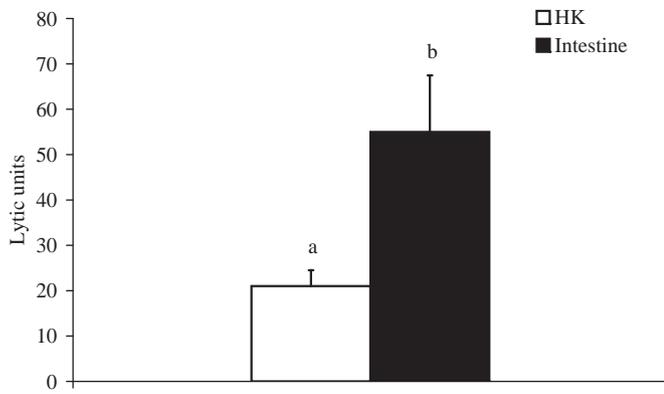


Fig. 6. Natural cytotoxicity of HK and intestinal cytotoxic leukocytes. Leukocytes were isolated from healthy rainbow trout and incubated during 2 h with DIOc-labeled P815 cells at three ratios of effector/target cells: 5:1, 10:1 and 25:1 for intestinal leukocytes, 25:1, 50:1 and 75:1 for HK leukocytes. After incubation, samples were labeled with IP and analyzed by flow cytometry. Percentages of target cells killed by effectors cells were determined for the three ratios and plotted on a graph. Linear regression calculated from this graph allowed the determination of lytic units. Results represent lytic unit averages \pm SEM of six fish. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

quantification of these transcripts with our qPCR approach. We defined two other primer pairs (Table 1) but they were not more efficient to amplify this transcript. These results indicate that very few IL-4/13A mRNAs can be found in healthy fish. Concerning B lymphocytes, our results (Fig. 12) show that there is an over-expression of IgM heavy chain transcripts in HK and an over-expression of IgT heavy chain transcripts in intestinal leukocyte suspensions, even if individual variations make this difference not statistically significant.

4. Discussion

In this paper, intestinal immune functions such as phagocytosis, natural cytotoxicity and proliferative responses have been studied in healthy rainbow trout. Moreover, we quantified various transcripts encoding factors involved in innate and adaptive immunity. The same studies were performed on HK or peripheral blood leukocyte suspensions for comparison.

Regarding innate immunity, our analyses indicate that less intestinal phagocytes are activated by yeast cells because the

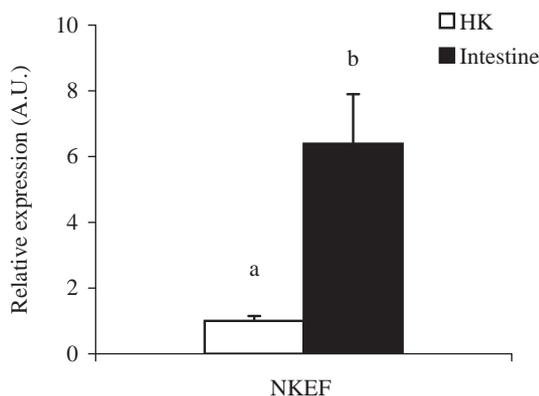


Fig. 7. Relative expression of NKEF transcripts in HK and intestinal leukocytes of healthy fish determined by qPCR. The expression of NKEF transcripts was normalized by comparison to the expressions of the cyclophilin and GAPDH housekeeping genes. The relative value obtained for kidney leukocytes was set to 1. Results represent averages \pm SEM of 12 fish (8 fish for expression of NKEF mRNAs in HK suspensions). Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

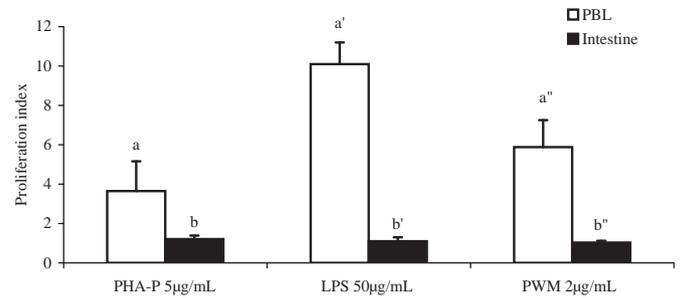


Fig. 8. Proliferative responses of peripheral blood and intestinal leukocytes from healthy trout. For each fish, these cells were cultured with or without mitogen. Results represent the proliferation indexes corresponding to the OD determined for samples cultured in the presence of mitogens divided by the OD determined for the same samples cultured without mitogen. Results were expressed as the proliferation index average \pm SEM of 4 fish for the intestine and 7 fish for HK. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

percentage of phagocytes which have ingested at least one yeast is lower (Fig. 4B) as well as the phagocytic index (Fig. 4C). However, when phagocytes are activated they ingest the same number of yeasts than HK phagocytes (Fig. 4A). Interestingly, using the same method, Clerton and al. [12] did also notice differences between HK and gut phagocytic indexes: 47.1 ± 20.8 and 8.2 ± 3.2 , respectively in their study; 113.3 ± 21.9 and 12.2 ± 1.8 , respectively in our study. In another study, Davidson et al. [11] showed that 10.5–13.5% of gut leukocytes develop a phagocytic activity against latex beads, a value close to the one observed here (Fig. 4B). Thus, it seems that intestinal phagocytes are 4–10 times less activated by yeast cells than HK phagocytes. However, when they are activated they can ingest as many yeast cells as their HK counterparts. This conclusion and the lower number of macrophages present in our intestinal leukocyte suspensions likely explain why IL-1 β transcripts are less abundant (Fig. 5A).

The oxidative burst of HK and intestinal leukocytes was studied using two approaches that did not allow detecting a response with our gut leukocyte suspensions. Using the same chemiluminescence method, Clerton et al. [12] did study the oxidative burst of HK and intestinal leukocytes. They registered a very low luminescence response of intestinal leukocytes (120 relative luminescence units (RLU)) which is ~ 600 times lower than the response of HK leukocytes (almost 70,000 RLU). Since flow cytometry was also

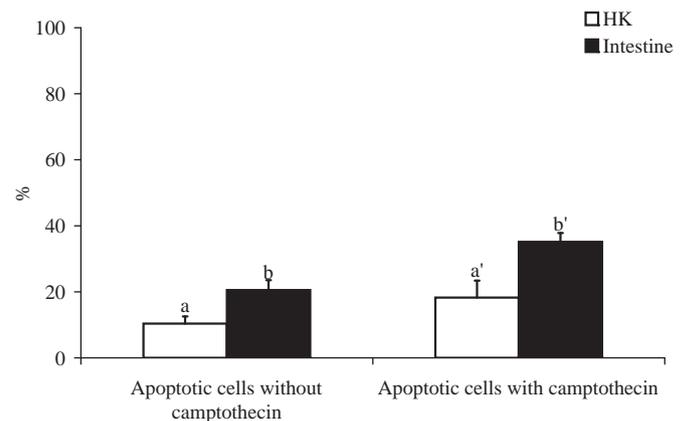


Fig. 9. Percentages of HK and intestinal leukocytes undergoing apoptosis with or without camptothecin. Analyses were performed by flow cytometry on 104 events. Apoptosis was expressed as the percentage of leukocytes located in the APC⁺ gate which were Annexin V⁺. Results represent averages \pm SEM of 6 fish. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

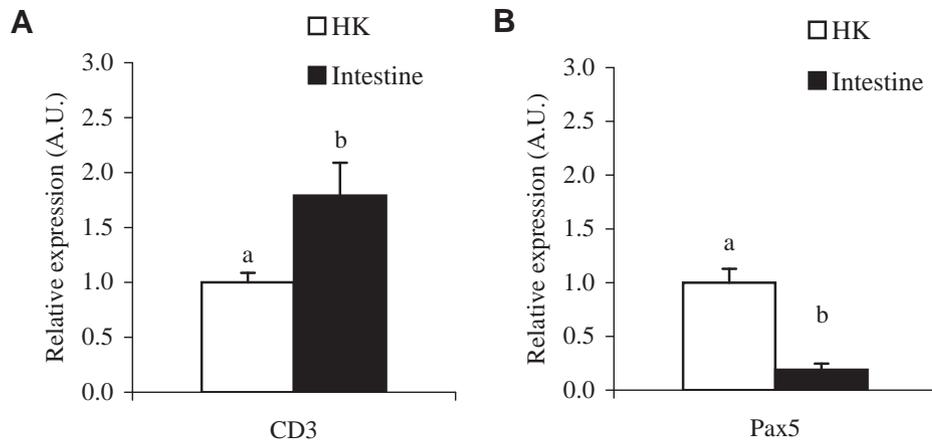


Fig. 10. Relative expressions of CD3 (T cell marker) (A) and Pax5 (B cell marker) (B) transcripts in HK and intestinal leukocytes from healthy fish. The relative expressions of CD3 and Pax5 transcripts were normalized by comparison to the expressions of the EF1- α and cyclophilin housekeeping genes. Relative values obtained for kidney cells were set to 1. Results represent relative expression averages \pm SEM of 12 fish. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

unsuccessful, we can conclude from these studies that the absence or the very low response of intestinal leukocytes is either due to a lower activation, a lower production of ROS and/or to the lower proportion of phagocytes in intestinal leukocyte suspensions as indicated by our microscopic observations of stained cytopspins (Fig. 3). Consequently, in the future, we suggest studying this function using cellular suspensions enriched in phagocytes and/or other probes for flow cytometry.

Our data indicate that the natural cytotoxic activity present in intestinal leukocyte preparations is two times higher than the one observed in HK suspensions (Fig. 6). The only study that investigated this cellular function before us [8], using the release of lactate

dehydrogenase (LDH) from EL4 target cells, showed that HK and gut intra-epithelial lymphocytes (IEL) presented approximately the same percentages of cytotoxicity (20–25%) at an effector/target ratio of 25/1 [8]. At the same ratio, we observe that natural cytotoxicity is two times higher in gut that in HK leukocyte suspensions. This discrepancy may be due to a difference in the proportion of NCC in the two types of suspensions or to a functional difference that is linked to their tissue of origin. Both hypotheses are sustained by the higher expression of NKEF transcripts in our gut leukocyte preparations (Fig. 7). In mammals, this factor enhances the action of natural killer cells [34]. This significantly higher natural cytotoxic activity observed in gut leukocyte suspension could be of great

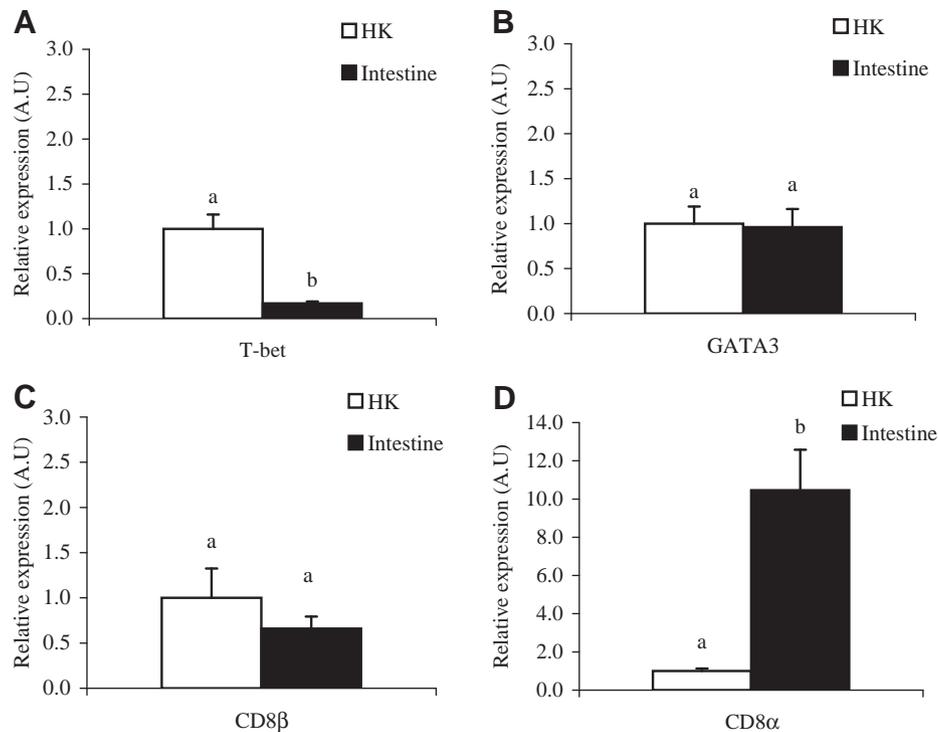


Fig. 11. Relative expressions of T-bet (A), GATA3 (B), CD8 β (C) and CD8 α (D) transcripts in HK and intestinal leukocytes from healthy fish. The relative expressions of T-bet, GATA3, CD8 β and CD8 α transcripts were normalized by comparison to the expressions of the cyclophilin, EF1- α and GAPDH housekeeping genes. Relative values obtained for kidney leukocytes were set to 1. Results represent relative expression averages \pm SEM of 12 fish. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

potential, especially in view of anti-viral protection, because mucosal surfaces are portals of entry for numerous pathogens. Indeed, Utke et al. [35] observed an over-expression of CD8 and NKEF after an infection of rainbow trout by the viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) thereby indicating that NCC and cytotoxic T cells are triggered after viral infection. Note that in this study, intestinal natural cytotoxicity was measured for the first time by flow cytometry, a method developed for mammals [31]. Using fluorescent markers of viable (Dio) or dead (IP) cells, flow cytometry allows differentiating effector from target cells and identifying precisely the population of dead target cells. Thus, even a low signal or a low difference between samples could be detected.

Intestinal leukocytes do not respond when stimulated with mitogens while PBL do. To determine whether this lack of response could be due to cellular damages induced by the chemical and enzymatic treatments used during cell isolation, we quantified apoptotic cells (Fig. 9) in our leukocyte preparations. These analyses indicate that ~20% of intestinal leukocytes were in apoptosis. This percentage does not explain the lack of proliferative response. We believe that this absence of response could be due to the lack of intestinal epithelial factors. Indeed, other studies showed that IEL from different species (rats, mice, humans) do not respond to an *in vitro* mitogen stimulation [36,37]. Furthermore, Sydora et al. [38] showed that the lack of proliferative response of mouse IELs to mitogens is not due to anergy. And finally, Brunner et al. [39] highlighted that the close interaction with epithelial cells and the cytokines produced by these cells seem crucial to sustain their *in vitro* survival and proliferation. Consequently, to further study trout intestinal lymphocytes it will be necessary to develop an adapted co-culture strategy. We initiated experiments with soluble fractions of trout gut preparations (data not shown). These preliminary experiments indicate that the optimization of such culture conditions in terms of gut preparations, concentrations at which gut preparations should be used and culture kinetics will require a lot of time and is a research project on its own.

Quantifications of transcripts encoding B- and T-cell-specific markers (Fig. 10) revealed a higher level of CD3 mRNA and a lower level of Pax5 mRNA in our intestinal leukocyte suspensions. These observations are explained by the fact that the intestine is rich in T cells [15,16,40]. However, we cannot exclude the possibility that these differences may also indicate different activation status. Similar levels of GATA3 mRNAs in HK and intestinal leukocyte suspensions and a 4 times lower level of T-bet mRNA in intestinal leukocyte suspensions were observed (Fig. 11). Results concerning GATA3 and T-bet are in agreement with the studies of Wang et al.

[18] and Takizawa et al. [19]. Both demonstrated, using the same method, that there is a higher amount of T-bet transcripts in HK than in the intestine. Thus, it seems that there are less Th1 lymphocytes and/or that Th1 cells are less activated in gut of unstimulated trout than in HK thereby suggesting a potential predominance of Th2 responses in the intestine. To test this hypothesis we tried to quantify IL13/4A transcripts, which encode a master Th2 cytokine, but our qPCR approach did not allow quantifying this rare transcript. Interestingly, very low amounts of IL13/4A transcripts were also observed by Takizawa et al. [19] in the pronephros and the intestine of rainbow trout. Thus, our results are in agreement with those obtained by these authors and are likely due to the fact that fish were not immunized. In the future, it would therefore be interesting to repeat these studies on virus-infected fish to confirm the suggestion that the intestinal environment is Th2 skewed while the non-mucosal one is Th1 skewed. This distinction is supported by the previous observation of a higher expression of IFN- δ in non-mucosal lymphoid tissues and a more prominent expression of Th2 transcription factors in mucosal tissues (including the intestine) [19].

Finally, we quantified CD8 β transcripts and observed no difference between intestinal and HK leukocyte suspensions while the amount of CD8 α mRNA was 10 times higher in intestinal leukocyte preparations. Bernard et al. [15] did also observe a high expression of CD8 α transcripts in IEL and Takizawa et al. [16] showed that 55% of intestinal leukocytes are CD8 α^+ . Taken together, these data suggest that, as in mammals, trout intestinal cytotoxic T cells express mainly the $\alpha\alpha$ homodimeric form of CD8. As expected from the literature, we also observed a low expression of IgM heavy chain transcripts and a high expression of IgT heavy chain transcripts in gut leukocyte suspensions (Fig. 12) because as shown by Zhang et al. [21], IgT $^+$ B cells represent 54.3% of intestinal against 27.8% of HK B cells.

In conclusion, this study shows that intestinal phagocytes are less activated by yeast cells than HK phagocytes but when they are activated they can ingest as many yeast cells as, their HK counterparts. In contrast, the natural cytotoxic activity present in intestinal leukocyte preparations is two times higher than the one observed in HK preparations, as confirmed by a higher expression of NKEF transcripts. We also noted that intestinal leukocytes do not respond to an *in vitro* mitogenic stimulation likely because they require the interaction with epithelial cells and the cytokines produced by these cells. Finally, our data suggest that the intestine contains a high proportion of T cells expressing the $\alpha\alpha$ homodimeric form of CD8. These data will be of great help for laboratories interested in

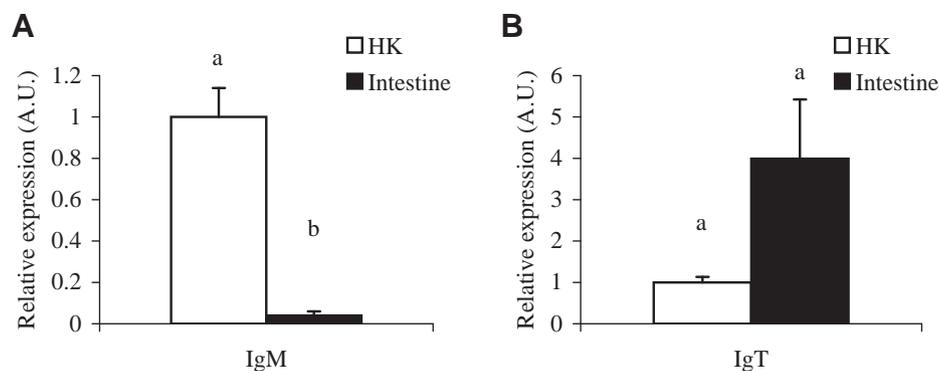


Fig. 12. Relative expressions of IgM (A) and IgT (B) heavy chain transcripts in HK and intestinal leukocytes. The expression of IgM heavy chain mRNAs was normalized by comparison to the expressions of the cyclophilin, EF1- α and GAPDH housekeeping genes. The expression of IgT heavy chain mRNAs was normalized by comparison to the expressions of the cyclophilin and EF1- α housekeeping genes. The relative value obtained for HK leukocytes was set to 1. Results represent relative expression averages \pm SEM of 12 fish. Statistically significant difference at $p < 0.05$ are indicated by different letters.

developing countermeasures to fight, for example, battery rearing-induced stresses that weaken trout immune system and therefore increase their susceptibility to diseases.

Acknowledgments

We thank all members of the aquaculture team of CRNA for their support in performing animal experimentations and cellular assays, all members of the Development and Immunogenetics laboratory for their support and their helpful advices concerning molecular analyses, DSM Nutritional Products, the French Ministry of Higher Education and Research and the University of Nancy for their supports. E.M. was supported by a CIFRE PhD fellowship of the National Association for Research and Technology (ANRT).

References

- Georgopoulou U, Vernier JM. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Developmental and Comparative Immunology* 1986;10:529–37.
- Hart S, Wrathmell AB, Harris JE, Grayson TH. Gut immunology in fish: a review. *Developmental and Comparative Immunology* 1988;12(3):453–80.
- Zapata AG, Cooper EL. The immune system: comparative histophysiology. Chichester: John Wiley and Sons; 1990.
- Cain KD, LaPatra SE, Baldwin TJ, Shewmaker B, Jones J, Ristow SS. Characterization of mucosal immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* challenged with infectious hematopoietic necrosis virus: identification of antiviral activity. *Disease of Aquatic Organisms* 12 December 1996;27(3):161–72.
- Bascove M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Fripiat JP. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB Journal* 2011;25(9):2947–55.
- Davina JHM, Rijkers GT, Rombout JHWM, Timmermans LPM, van Muiswinkel WB. Lymphoid and nonlymphoid cells in the intestine of cyprinid fish. In: Horton JD, editor. *Development of differentiation of the vertebrate lymphocytes*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1980. p. 129–40.
- Rombout JHWM, Taverne-Thiele AJ, Villena MI. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Developmental and Comparative Immunology* 1993;17(1):55–66.
- McMillan DN, Secombes CJ. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish and Shellfish Immunology* 1997;7(8):527–41.
- Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, Leven A. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* 2000;10(2):187–202.
- Hébert P, Ainsworth AJ, Boyd B. Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells. *Developmental and Comparative Immunology* 2002;26:53–62.
- Davidson GA, Ellis AE, Secombes CJ. Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 1991;14:651–9.
- Clerton P, Troutaud D, Verlhac V, Gabaudan J, Deschaux P. Dietary vitamin e and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 2001;11(1):1–13.
- Balcazar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Gironés O, Muzquiz JL. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2006;29:335–43.
- Zhang H, Evenhuis JP, Thorgaard GH, Ristow SS. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25(1):25–35.
- Bernard D, Six A, Rigottier-Gois L, Messiaen S, Chilmonczyk S, Quillet E, et al. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *Journal of Immunology* 2006;176(7):3942–9.
- Takizawa F, Dijkstra JM, Kotterba P, Korytár T, Kock H, Köllner B, et al. The expression of CD8 α discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* 2011;35(7):752–63.
- Moore LJ, Somamoto T, Lie KK, Dijkstra JM, Hordvik I. Characterisation of salmon and trout CD8 α and CD8 β . *Molecular Immunology* 2005;42(10):1225–34.
- Wang T, Holland JW, Martin SAM, Secombes CJ. Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish and Shellfish Immunology* 2010;29(5):705–15.
- Takizawa F, Koppang EO, Ohtani M, Nakanishi T, Hashimoto K, Fischer U, et al. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology* 2011;48:1360–8.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. Discovery of a unique Ig heavy-chain (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(19):6919–24.
- Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology* 2010;11(9):827–35.
- Zou J, Cunningham C, Secombes CJ. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 β gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *European Journal of Biochemistry* 1999;259(3):901–8.
- Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bols N, Hirono I, Aoki T, et al. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology* 2002;26(5):433–44.
- Laing KJ, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, et al. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . *European Journal of Biochemistry* 2001;268(5):1315–22.
- Fujiki K, Gauley J, Bols NC, Dixon B. Genomic cloning of novel isoforms of the rainbow trout interleukin-8. *Immunogenetics* 2003;55(2):126–31.
- Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, et al. Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25:713–23.
- Kim DH, Austin B. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006;114(3–4):297–304.
- Salinas I, Meseguer J, Esteban MA. Assessment of different protocols for the isolation and purification of gut associated lymphoid cells from the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biological Procedures Online* 2007;9(1):43–55.
- Scott AL, Klesius PH. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. In: *International symposium on fish biologics: serodiagnostics and vaccines, development biology standard*, vol. 49. Basel: Karger; 1981. p. 243–54.
- Stave JW, Roberson BS, Hetrick FM. Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from the pronephros of the striped bass. *Developmental and Comparative Immunology* 1983;7:269–76.
- Chang L, Gusewitch GA, Chritton DBW, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* 1993;166:45–54.
- Bryant J, Day R, Whiteside TL, Herberman RB. Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 1992;146:91–103.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002;3(7).
- Shau H, Gupta RK, Golub SH. Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells. *Cellular Immunology* 1993;147(1):1–11.
- Utke K, Bergmann S, Lorenzen N, Köllner B, Ototake M, Fischer U. Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;22(3):182–96.
- Greenwood JH, Austin LL, Dobbins III WO. In vitro characterization of human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1983;85(5):1023–35.
- Nauss KM, Pavlina TM, Kumar V, Newberne PM. Functional characteristics of lymphocytes isolated from the rat large intestine. Response to T-cell mitogens and natural killer cell activity. *Gastroenterology* 1984;86(3):468–75.
- Sydora BC, mixer PF, Holcombe HR, Egtesady P, Williams K, AmAral MC, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogenic signals. *The Journal of Immunology* 1993;150(6):2179–91.
- Brunner T, Arnold D, Wasem C, Herren S, Fruttschi C. Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes. *Cell Death and Differentiation* 2001;8(7):706–14.
- Koppang EO, Fischer U, Moore L, Tranulis MA, Dijkstra JM, Köllner B, et al. cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy* 2010;217(6):728–39.

L'impact de la nutrition sur l'immunité intestinale de la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*), un poisson d'élevage à fort intérêt économique, est encore mal connu. C'est pourquoi cette thèse avait pour objectifs, dans un premier temps, de mieux caractériser son système immunitaire intestinal et dans un second temps, d'évaluer les possibilités de modulation de la réponse immune intestinale par l'ajout de nucléotides libres dans son alimentation. Nos résultats indiquent que les phagocytes intestinaux présentent une activité de phagocytose plus faible que ceux du rein antérieur. La cytotoxicité naturelle mesurée au niveau intestinal est deux fois plus élevée que celle du rein antérieur et cette observation est corrélée à une augmentation du transcrit codant NKEF (Natural Killer Enhancement Factor). Nous avons également montré que les lymphocytes intestinaux ne répondent pas à une stimulation mitogénique *in vitro* et que ceci n'est pas due à l'apoptose des cellules. Une forte expression des transcrits codant CD8 α et CD3 a été détectée dans les leucocytes intestinaux, ce qui suggère une importante proportion de lymphocytes T exprimant la forme homodimérique $\alpha\alpha$ de CD8 dans ce tissu. Enfin, nous avons montré que l'ajout de nucléotides libres à l'alimentation de truites saines stimule la prolifération spontanée ainsi que la phagocytose des leucocytes intestinaux *in vitro*. Par contre, aucune modulation de la cytotoxicité naturelle ou de l'expression des transcrits codant les marqueurs spécifiques des lymphocytes T et B et les cytokines inflammatoires n'a été observée. Il serait à présent intéressant de renouveler ces essais en utilisant des poissons infectés afin de pouvoir observer l'effet des nucléotides sur la réponse inflammatoire et sur la réponse spécifique.

Mots clés : muqueuse intestinale, immunité, leucocytes, truite arc-en-ciel, nucléotides.