

ÉCOLE DOCTORALE SST

Lymphocytes et Immunité des Muqueuses

THÈSE

présentée par :

Benoît LEVAST

soutenue le : **29 janvier 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Immunologie

Influence du lait maternel sur l'ontogenèse de la réponse immunitaire de l'intestin du porcelet

THÈSE dirigée par :
M. SALMON Henri

Directeur de recherche, INRA, Nouzilly

RAPPORTEURS :
M. CHARLEY Bernard
Mme. URDACI Maria

Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas
Professeur, Université Bordeaux 1, Bordeaux

JURY :
M. CHARLEY Bernard
M. CHIRON Jean-Paul
Mme. LAITAT Martine
M. MARNET Pierre-Guy
M. MEURENS François
M. SALMON Henri
Mme. URDACI Maria

Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas
Professeur, Université François - Rabelais, Tours
Première assistante, Université de Liège, Liège, Belgique
Professeur, Université Européenne de Bretagne, Rennes
Chargé de recherche, INRA, Nouzilly
Directeur de recherche, INRA, Nouzilly
Professeur, Université Bordeaux 1, Bordeaux

« C'est la curiosité, l'obsession et la simple persévérance qui m'ont conduit à
mes idées » - Albert Einstein



Remerciements

Ce travail de thèse s'est déroulé à l'INRA de Nouzilly dans l'unité Infectiologie Animale et Santé Publique, dans l'équipe Lymphocytes et Immunité des Muqueuses, dirigée par le Dr Henri Salmon. Ces 3 années de recherche ont été financées par l'INRA et la région Centre.

En premier lieu, je remercie Henri Salmon pour m'avoir accueilli dans son équipe. Toujours disponible, il m'a enseigné la rigueur scientifique nécessaire à l'élaboration des protocoles et à l'analyse des résultats. Merci de m'avoir fait découvrir l'univers du *Sus scrofa* !! Les moments partagés en dehors du labo ont toujours été agréables voire excitants devant le baby-foot !

Je tiens à remercier Jean-Paul Chiron pour la présidence de cette thèse et pour avoir consacré de son temps à l'examen de ce travail.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Maria Urdaci et à Bernard Charley qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et qui ont consacré de leur temps à l'analyse et la critique de ce travail de recherche.

Je remercie Martine Laitat et Pierre-Guy Marnet pour avoir accepté de faire partie du jury et pour l'examen de cette thèse.

Merci à François Meurens, co-encadrant de cette thèse, qui a su prendre en charge certains aspects techniques de mon travail comme la qPCR mais aussi et surtout la rédaction des articles scientifiques et de la thèse. Merci pour ton fameux pragmatisme ! Merci pour le soutien scientifique et humain que tu m'as apporté. Tu m'as fait partager ou découvrir ce qu'est la passion du chocolat Belge, le bon goût de la bière...Belge aussi et la passion de l'histoire, Française cette fois !

Merci à Mustapha Berri, mon autre co-encadrant, avec qui j'ai partagé le bureau pendant mes deux premières années de thèse. Merci pour tes conseils et avis que tu as pu me soumettre ainsi que pour ton soutien pendant ces trois années. Les discussions sportives que nous avons pu avoir, venant d'un athlète de haut niveau, étaient un bon exutoire !

Le travail de thèse est souvent décrit comme un travail de « petites mains » dans le milieu de la recherche. Les miennes ont été éduquées par le savoir, la technique et la vivacité de Claire

Chevaleyre. L'énergie consacrée par Claire pour le travail de paillasse de ma thèse m'a été d'une grande aide. Merci Claire ! Grâce à toi l'élevage et les viscères du porc n'ont plus de secret pour moi ! Tu as su me donner la passion du pot de labo, base essentielle du bon fonctionnement d'une équipe. C'est pour cela que je dis vive Clairette !

Merci à Sandrine Melo aussi pour le travail de paillasse et le travail en élevage. Sa disponibilité et sa bonne humeur m'ont été d'une grande aide dans la période chargée d'une deuxième année.

Enfin un thésard dans un laboratoire, c'est comme un petit fusible, il en faut plusieurs sinon ça pète ! Je tiens donc à exprimer ma gratitude envers Galliano Zanello (avec deux « l » svp !) avec qui j'ai passé beaucoup de temps durant ces trois années. Pas trop au travail pour éviter les accidents au scalpel, beaucoup à midi et en co-voiturage ! Mais surtout beaucoup en dehors de l'INRA, merci Galli pour m'avoir amené au rugby, fait rire en VTT et parler dans les bars !

La vie entre thésard masculin pourrait aussi lâcher sans la présence féminine. Une autre thésarde a beaucoup compté dans mon intégration en Touraine, j'ai cité Marianne ! Merci pour ta bonne humeur, tes soirées (chantantes) et ton écoute.

Parmi les autres jeunes de l'INRA, je souhaite remercier Manon (parce qu'elle est Normande), Bertrand et sa petite taille, Denis et Thomas compagnons de squash, Astrid (vive Preuilly !), Vincent DJ en devenir, Salim et son fameux tajine, Audrey, Nadia (vive Grenoble !) et Fatemeh (ah ! Paris...).

Mes remerciements vont aux autres amis que j'ai pu rencontrer à Tours, les potes du rugby. Aux amis de master de Grenoble, à petit flo et enfin à mon ami d'enfance Arnaud.

Merci, pour leur collaboration scientifique, à Isabelle Lantier avec qui rime PCR et microcapillaire. De même à Patrick Dabert pour son accueil à Rennes et ses connaissances en SSCP. Merci aux unités expérimentales, Eric, Romuald, Frédéric, Eric, Gilles, Albert, Jean-Philippe. Merci aux autres personnes de IASP avec qui j'ai pu partager des moments simples au café, en congrès.

La rencontre de toutes ces personnes m'a aussi conduit à la rencontre essentielle de ma thèse. La rencontre avec Lucie m'a donné l'énergie pour remonter des abysses et surfer sur les vagues dangereuses qui font face au parcours d'un thésard. Merci mon chaton !!

Et tout naturellement, je veux remercier ma famille à qui j'ai pu régulièrement donner de mes bonnes ou mauvaises nouvelles. Merci à mes grands-parents, mes parents, à Camille, Marion, Juliette, Claire, Fanny et Rémi.

Résumé

Après la naissance, le porcelet, comme tout mammifère nouveau-né, reçoit par le lait maternel une protection contre les agressions de l'environnement. Cette protection est assurée passivement par les IgA maternelles et les facteurs lactés qui peuvent être à la fois des freins et des stimulants du développement de la réponse immunitaire intestinale (RII) IgA propre du porcelet. L'objectif de ma thèse est donc d'identifier l'influence de la durée de lactation sur la RII.

Pour réaliser cet objectif, nous avons tout d'abord comparé le transcriptome des plaques de Peyer de l'iléon et du jéjunum de porcelets allaités à 28 jours. Nous avons mis en évidence un répertoire aux antigènes des IgA (répertoire IgA) plus diversifié dans la plaque de Peyer iléale, soulignant son importance particulière dans le développement de la RII.

Nous avons ensuite procédé à des sevrages de plus en plus précoces (Groupe G1 sevré à J7, G2 à J14, G3 à J21 et G4 laissé sous la mère) et regardé leur impact sur le développement des IgA propres, le transcriptome des cytokines et le répertoire IgA associés à la RII dans le ganglion mésentérique (MLN). Les porcelets sevrés les plus précocement (G1) présentent, entre J14 et J28, une concentration en IgA sériques plus faible que les porcelets sevrés plus tardivement (G3) ou non sevrés (G4). Chez les porcelets sevrés les plus précocement, le transcriptome du MLN montre à J28 une augmentation de l'expression des cytokines et facteurs de transcription tels que IL-17 (inflammation), TGF- β et FOXP3 (Treg), et un répertoire IgA du MLN plus diversifié.

La modification de la flore intestinale des porcelets sevrés ultra précocement (G1) et non sevrés (G4) a été suivie dans les fèces par analyse SSCP des ADNr 16s à 7, 14, 21 et 28 jours. A 21 jours, les porcelets sevrés ultra précocement présentent une flore plus diversifiée que les porcelets non sevrés. La corrélation entre l'absence d'approvisionnement en IgA lactés et la diversification accrue de la flore intestinale des porcelets s'observe donc 2 semaines après le sevrage.

L'immunisation orale à J7, 14 et 21 des porcelets des 4 groupes par ingestion d'une bactérie *E. coli* recombinante exprimant le *fimbria* CS31A induit des anticorps sériques (IgG et IgA) spécifiques de CS31A. A 21 jours, les porcelets sevrés précocement (G1), voire G2, présentent des titres en anticorps IgG et IgA plus faibles par rapport aux porcelets sevrés plus tardivement (G3) ou non sevrés (G4).

En conclusion, le sevrage ultra-précoce provoque un déficit en IgA sériques totales et spécifiques, une diversification de la flore intestinale et du répertoire IgA.

Ces résultats sont conformes à la vue que les IgA maternelles freinent la diversification du répertoire IgA dans le MLN et que le lait apporte les facteurs de la maturation immunitaire IgA de l'intestin du porcelet.

Mots clés : Porcelet, lait, immunité passive, réponse immunitaire intestinale, plaques de Peyer, ganglion mésentérique, IgA, répertoire aux antigènes, flore commensale.

Summary

Comparatively to adult pigs, the piglet has an immature immune system. Intestinal immune response (IIR), which consists in a large part in the B cell secretion of IgA, mainly develops after weaning. Since poor data are available for the onset of IgA IIR in piglet weaned earlier, we decided to compare IgA response, repertory and bacterial flora in piglets conventionally weaned or weaned earlier, *ie* deprived of milk at D7 (group1, G1), D14 (G2), D21 (G3) and not weaned (G4). Blood, mesenteric lymph node (MLN), intestinal tissues and their contents were sampled at days 7, 14, 21, 28.

First, we analysed at day 28 the IgA repertoire of ileal and jejunal Peyer's patches of not weaned piglets. We observed a more diversified repertoire of ileal patch showing it essential role in the intestinal immune response.

Transcriptomic analysis of the MLN RNA expression showed a decrease of cytokines and transcription factors expressions involved in the lymphocytes development (IL-17, TGF- β , FOXP3) for piglets G2 and G3, at 28 days of age. Our results showed that G1 piglets, in comparison with G4 piglets, had less IgA in the blood while their IgA repertory was more diversified in the MLN.

In a third experiment but with the same protocol, we tried to correlate the IgA repertoire in the MLN and the gut flora composition. Analysis of faeces was performed at days 7, 14, 21 and 28, by SSCP technique on ADNr16s PCR products. At D21, flora of G1 piglets was more diversified than flora of G4 piglets.

Final part of the work was about the specific immune response on the gut. With always the same protocol, piglets were orally immunized (D7, D14 and D21) with non pathogenic bacteria *E. coli* which expressed the CS31A protein on cell surface. Anti-CS31A IgG and IgA were detected in the sera of all piglets but, around D21, G1 and G2 piglets had relatively low concentrations compare to G4 piglets.

To conclude, ultra-early weaning immune consequences are a deficiency in total and specific seric IgA around D21, a flora as well as the MLN IgA repertoire diversification. In the first month, particular cares have to be taken with piglets weaned at day 7. The aim is to avoid the deficiencies we underlined in this work.

Key words: Piglets, milk, passive immunity, intestinal immune response, Peyer's patches, MLN, IgA, repertoire, flora.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	4
Summary	5
Table des matières	6
Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Liste des annexes.....	13
Première partie : Introduction	14
1. Le modèle porcin.....	15
1.1. L'élevage porcin.....	15
1.1.1. Aspect agro-alimentaire et économique	15
1.1.2. Modèle privilégié pour la recherche médicale ?	16
1.1.3. Intérêt de l'étude.....	17
1.2. La gestation	19
1.3. La lactation	19
1.4. Le sevrage	21
1.4.1. Conséquences physiologiques et immunitaires.....	21
1.4.2. Mise en place du protocole expérimental.....	21
2. Organe cible de l'étude : l'intestin	23
2.1. Aspect anatomique	23
2.2. La digestion	23
2.3. La flore intestinale.....	25
2.3.1. Flore commensale	25
2.3.2. Flore pathogène	27
3. Le système immunitaire intestinal.....	29
3.1. Structures lymphoïdes de l'intestin	29
3.1.1. Les plaques de Peyer	29
3.1.2. La chaîne ganglionnaire mésentérique	29
3.1.3. La <i>lamina propria</i>	32
3.2. Répertoire lymphocytaire B	32
3.2.1. Génétique du lymphocyte.....	32

3.2.2.	La famille des immunoglobulines	34
3.2.3.	Diversification du répertoire	35
3.3.	Mécanisme de la migration cellulaire	35
3.3.1.	Notion de « <i>Homing</i> » (domiciliation)	35
3.3.2.	Les couples adressines / chimiokines - récepteurs	37
3.3.3.	La diapédèse	38
3.4.	Cytokines et la réponse immunitaire intestinale	38
3.5.	Le lien entéro-mammaire	43
4.	Revue bibliographique	45
5.	Objectifs de la thèse	67
Deuxième partie : Résultats - Discussions		69
1.	Répertoire IgA et profil transcriptomique des PP à J28 chez le porcelet allaité.....	70
1.1.	Introduction	70
	Article 1	71
1.2.	Discussion	89
2.	Influence du sevrage ultra-précoce sur la réponse immunitaire intestinale	90
2.1.	Introduction	90
	Article 2.....	91
2.2.	Discussion	114
3.	Résultats non publiés.....	116
3.1.	Influence du sevrage ultra-précoce sur la flore intestinale des porcelets.....	116
3.1.1.	Introduction	116
3.1.2.	Matériel et méthodes	117
3.1.3.	Résultats - discussion	118
3.2.	Influence du sevrage ultra-précoce sur la réponse immunitaire intestinale spécifique d'un antigène bactérien	122
3.2.1.	Introduction	122
3.2.2.	Matériel et méthodes	123
3.2.3.	Résultats - discussion	124
Troisième partie : Conclusions - Perspectives		128
Quatrième partie : Travail annexe.....		136
1.	CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1	137

2. Inhibition of TGF β -induced Th17 differentiation by rapamycin favors induction of regulatory T cells.....	138
Bibliographie	139
Annexes	162
Résumé	173
Summary	173

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APRIL	A PRolifération-Inducing Ligand
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAFF	B cell Activating Factor
BCR	B Cell Receptor
CCL	CC chemokine Ligand
CCR	CC chemokine Receptor
CD	Cluster de Differentiation
CDR	Complementarity Determining Region
CG	Centre Germinatif
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DC	Dendritic Cells
DDGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DO	Densité Optique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAM	Fluorescein AMidite
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
HC	HistoCompatible
HEV	High Endothelium Venule
IEL	Intra-Epithelial Lymphocyte
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Luria Broth

LB / LT	Lymphocyte B / T
LP	<i>Lamina Propria</i>
LPL	Lymphocyte de la <i>Lamina Propria</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LW	Large-White
M (cellule)	Microfold cell
MAdCAM-1	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1
MEC	Mucosal Expressed Chemokine
MLN	Mesenteric Lymph Node
MS	Meishan
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pIgR	polymeric Immunoglobulin Receptor
PP	Plaue de Peyer
RAG	Recombination Activating Gene
ROX	carboxy X-Rhodamine
RT	Reverse Transcriptase
SEM	Standard Error of the Mean
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAMRA	TetrA-Methyl-RhodAmine
TCR	T-Cell Receptor
TECK	Thymus-Expressed Chemokine
TGF	Tumor Growth Factor
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effet de la taille de la portée sur les poids moyens (Kg) des porcelets à différents jours de lactation	18
Tableau 2 : Concentration (mg/ml) en immunoglobulines IgG, IgM et IgA dans le lait de truie en lactation.	20

Liste des figures

Figure 1 : Transfert de l'immunité passive chez les mammifères.....	18
Figure 2 : Conformation du gros intestin chez l'homme et le porc.....	24
Figure 3 : Fonctions de la flore commensale.	26
Figure 4 : Organisation du <i>gut associated lymphoid tissue</i> chez la souris.....	31
Figure 5 : Gènes codant pour les chaînes lourdes (H) et légères (L) des immunoglobulines.	33
Figure 6 : Homing des lymphocytes B depuis les sites effecteurs du système immunitaire... ..	36
Figure 7 : La diapédèse : migration du lymphocyte depuis la circulation sanguine vers le site effecteur.....	39
Figure 8 : Schéma général de la réponse immunitaire intestinale.....	41
Figure 9 : Origine d' APRIL et BAFF agissant sur les cellules B.	42
Figure 10 : Lien immun entéro-mammaire.	44
Figure 11a : Analyse cinétique de la population bactérienne des fèces de porcelets LW sevrés à 7 jours (G1) ou non sevrés (G4).	119
Figure 11b : Analyse cinétique de la population bactérienne des fèces de porcelets MS sevrés à 7 jours (G1) ou non sevrés (G4).	121
Figure 12 : Schéma expérimental du sevrage et de l'immunisation des porcelets LW.....	125
Figure 13 : Cinétique de la concentration sérique en IgA chez les porcelets LW immunisés.	125
Figure 14 : Cinétique d'apparition des IgG et IgA spécifiques de CS31A.	127
Figure 15 : Conséquence globale du sevrage ultra précoce sur le système immunitaire de l'intestin.....	130
Figure 16 : Test <i>in vitro</i> de la maturation des lymphocytes B et des DC des porcelets.....	130
Figure 17 : Aspect dynamique d'une infection expérimentale lors d'un sevrage précoce ou tardif.	135
Figure 18 : Analyse par PCR des réarrangements VDJ des lymphocytes B.....	166
Figure 19 : Etapes d'identification d'une flore bactérienne complexe par SSCP.....	168
Figure 20 : Cinétique de l'expression relative en ARNm de CCR9 dans les lymphocytes circulants.	169
Figure 21 : Composition de l'aliment sevré plus donné aux porcelets autour de J21.....	170
Figure 22 : Plan d'alimentation des porcelets en fonction de leur sevrage.....	170

Liste des annexes

Annexe 1 - La PCR en temps réel.....	163
Annexe 2 - Principe de l'analyse CDR3	165
Annexe 3 - Principe de la SSCP	167
Annexe 4 - Analyse des PBMC	169
Annexe 5 - Composition et plan d'alimentation des porcelets	170
Annexe 6 - Cinétique des IgA sériques chez les porcelets LW et MS sevrés ou non	171
Annexe 7 - Liste des communications scientifiques.....	172

Première partie :
Introduction

1. Le modèle porcin

1.1. L'élevage porcin

1.1.1. Aspect agro-alimentaire et économique

Le porc, *Sus scrofa* en latin, est intimement associé à l'animal de ferme dans l'inconscient collectif. Il a été domestiqué par l'Homme (ainsi dénommé *Sus scrofa domesticus*) il y a environ 8000 ans pour sa viande et conservé grâce à la facilité de son élevage (le porc étant omnivore) et son rendement en viande. Son ancêtre est *Sus scrofa scrofa*, cousin du sanglier bien connu dans les forêts de France.

L'élevage du porc s'est intensifié comme tous les élevages pour répondre aux besoins de la société moderne. L'Homme a ainsi pu sélectionner les différentes races présentes sur les continents pour en créer de nouvelles répondant aux critères de l'élevage moderne (Lebourg, 2005). L'élevage de porcs charcutiers se fait de plus en plus par croisement de races spécifiques dont voici quelques exemples connus et élevés au sein de la porcherie de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Unité Pluri-espèces d'Expérimentation Animale (UPEA) de Nouzilly :

Large-White : (LW) race la plus répandue en France, le LW est issu du Royaume-Uni, il est la source principale des hybridations (Lebourg, 2005). Le LW a une excellente croissance et une très bonne prolificité. Les truies LW sont reconnues comme souche maternelle. La race est caractérisée par une peau blanche et des oreilles dressées.

Meishan : (MS) d'origine asiatique, cette race présente une grande précocité sexuelle et une plus grande prolificité que les LW (Lebourg, 2005). Ces porcs ont cependant des performances de croissance très inférieures. Plus petit que le LW, le MS a la peau noire et plissée et des oreilles tombantes.

Mini-porc histocompatible : (HC) ces porcs sont issus du développement de la recherche, obtenus par consanguinité (Kaeffer et al., 1991). Le Swine Leucocyte Antigen (SLA d/d) est très conservé dans l'élevage. Il faut cependant noter que ces porcs n'ont aucun intérêt agro-

alimentaire du fait de leur taille et de leur masse grasseuse importante ; leur reproduction est très difficile avec une faible fécondité. Ils sont de peau claire, poilue avec des oreilles tombantes.

L'importance du secteur alimentaire dans notre société a conféré à l'élevage porcin un impact économique considérable parmi les différents élevages d'animaux producteurs de viande. Son rendement étant important, il représente la plus grosse production animale en nombre de têtes (le cheptel mondial était de 800 millions de têtes en 2006) et la viande la plus consommée au monde (5 millions en 2005, tonnes équivalents carcasse, site internet syndicat national du commerce du porc, SNCP). Il faut cependant noter que le poulet est un marché en expansion, notamment dans les pays musulmans, dont la consommation se rapproche de celle du porc.

1.1.2. Modèle privilégié pour la recherche médicale ?

Le porc s'est aussi révélé important en médecine (Onions et al., 2000). Sa morphologie ainsi que sa physiologie en font un modèle d'étude privilégié pour la santé humaine. Le porc représente une alternative sérieuse à la souris amenant d'autres avantages comme la taille des organes et leur physiologie. Il est notamment très étudié dans le modèle de la xénogreffe (Gaca et al., 2001; Onions et al., 2000; Petersen et al., 2009; Sachs et al., 2009; Wang et al., 2009), principale solution pour les hôpitaux face au nombre toujours trop faible d'organes disponibles à des fins thérapeutiques.

Ces éléments médico-économiques font de la recherche porcine une nécessité tant pour l'optimisation de l'élevage, la santé animale que pour l'étude du système immunitaire porcin. La recherche agronomique peut s'appuyer sur les races d'intérêt mais une race de miniporc histocompatible (HC) a été développée pour améliorer les manipulations sur l'animal et la reproductibilité des observations biologiques. Le porc HC a donc été optimisé pour l'amélioration du modèle pré-clinique de la greffe. Ces animaux sont facilement greffables entre eux grâce à un complexe majeur d'histocompatibilité commun : ils sont homozygotes pour un même Swine Leucocyte Antigen (SLA), trois lignées sont distinguables aujourd'hui : SLA^{d/d}, SLA^{a/a} et SLA^{b/b}.

1.1.3. Intérêt de l'étude

En complément de la souris, modèle le plus utilisé mais aussi de plus en plus limitant quant aux extrapolations pour l'Homme à cause des variations génétiques, le porc se distingue de plus en plus comme modèle de recherche. Dans notre société, l'émancipation de la femme a fait évoluer les mœurs et notamment la gestion de l'allaitement du nourrisson. Malgré la promotion de l'allaitement pour son efficacité sur la santé du bébé, les mères ont des raisons professionnelles et pratiques de ne pas donner le sein à leur enfant. Les études médicales ont pourtant démontré l'importance du lait pour le système immunitaire du nouveau-né, en particulier concernant les allergies (Verhasselt et al., 2008). En France, seulement un enfant sur dix est encore nourri au sein à l'âge de 1 mois (site ministère de la santé). Il s'agit donc d'un sevrage précoce à l'échelle du développement humain. On peut cependant mentionner que l'immunité du porcelet et du nourrisson diffèrent à la naissance. La femme transmet des anticorps au fœtus par la circulation placentaire alors que la truie non (Figure 1). L'allaitement du porcelet est donc vital dès la naissance alors que cela peut paraître moins essentiel pour le nourrisson. Le déficit créé par un sevrage ultra-précoce après transfert des immunoglobulines du colostrum chez le porcelet peut donc être un modèle intéressant quant au déficit provoqué par un sevrage quasi immédiat du nourrisson.

L'élevage moderne et intensif nécessite une optimisation de la place dans les bâtiments mais aussi une optimisation de la reproduction. Pour cela, le critère de choix correspond au nombre de porcelets produits annuellement par la truie (Lebourg, 2005). La prolificité des truies est un critère très lié à l'individu, la sélection génétique ne garantit pas forcément le label « bonne mère » même si les aptitudes maternelles sont un critère de sélection. Un deuxième critère concernant les truies est la qualité/quantité du lait et le nombre de mamelles fonctionnelles. Ainsi, la totalité des porcelets nés doit pouvoir être rentabilisée. Dans les élevages modernes, le nombre de porcelets est souvent supérieur à la capacité nutritive de la truie (Champagne, 2003). Ceci peut engendrer une perte de productivité sur les performances des porcelets (le critère est la prise de poids par jour - Tableau 1) et par la fatigue de la mère (perte de poids). La notion de porcelets surnuméraires et leur gestion sont donc un point majeur pour le producteur de porcs (Champagne, 2003). Après évaluation du nombre de porcelets surnuméraires par portée, différentes méthodes peuvent être appliquées dont l'adoption et le sevrage avec différents plans d'alimentation.

Absences de réserves vitellines (placenta)

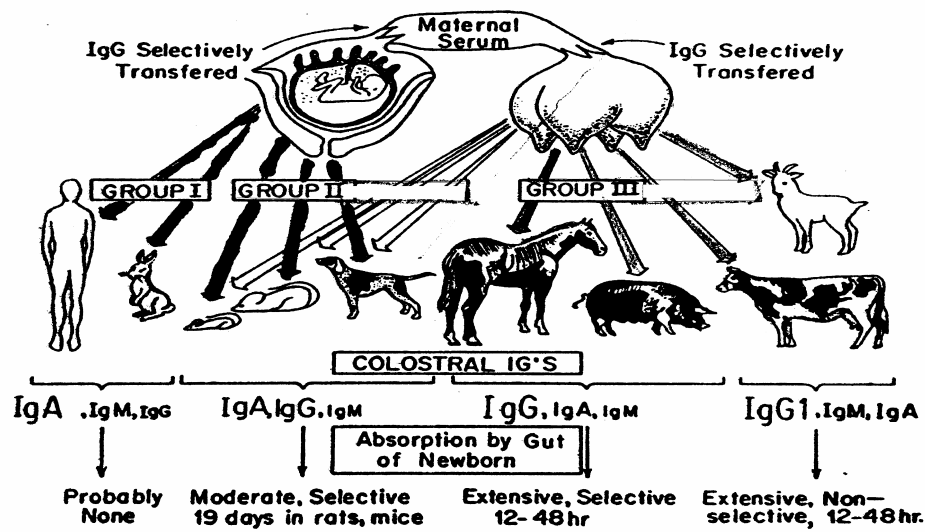


Figure 1 : Transfert de l'immunité passive chez les mammifères.

Le transfert des Ig maternelles peut se faire par voie placentaire (group I), par les sécrétions mammaires (group III) ou par les deux organes (group II). Ces différences sont reflétées par la composition des colostrums en Ig, la taille des caractères est relative aux concentrations du colostrum (Butler, 1974).

Taille de la portée	Âge des porcelets				
	Jour 3	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28
8	1,87	2,82	4,62	6,42	8,21
9	1,85	2,78	4,38	6,18	7,91
10	1,87	2,72	4,40	6,18	7,89
11	1,88	2,72	4,21	5,60	7,10

Tableau 1 : Effet de la taille de la portée sur les poids moyens (kg) des porcelets à différents jours de lactation (Klopfenstein, 2002).

Le deuxième enjeu pour optimiser la reproduction des porcs consiste à agir sur le cycle biologique des truies. Le bon déroulement de la gestation et la qualité de la lactation sont essentiels pour un producteur.

1.2. La gestation

En période de reproduction, les truies sont en chaleur toutes les 3 semaines et les chaleurs apparaissent aussi quelques jours après le sevrage d'une première portée (Lebourg, 2005). Les élevages sont conduits par bandes de truies synchronisées et les sevrages sont généralement effectués au même moment. Comme pour toute femelle, la période de gestation nécessite la plus grande attention. L'alimentation et l'installation sont essentielles dans la conduite de la truie. La période de gestation dure environ 115 jours soit 3 mois-3 semaines-3 jours. Ce temps relativement court, couplé à la taille de la portée (15 à 20 fœtus en moyenne), explique le rendement élevé des élevages porcins.

1.3. La lactation

Les durées de lactation en élevage intensif sont très courtes (3-4 semaines) par rapport aux conditions naturelles (12 semaines et plus), 8 semaines correspondant aux élevages raisonnés, en plein air (Lebourg, 2005). L'enjeu est de garder un apport nutritionnel conséquent ainsi qu'une protection immunitaire suffisante. La prise de colostrum est essentielle pour la santé du porcelet, les immunoglobulines (IgG surtout, Tableau 2) en grande quantité, vont permettre une protection systémique du porcelet. Le lait a ensuite une grande importance pour le système immunitaire de l'intestin avec le rôle protecteur, au niveau local, des IgA maternelles (Martinet, 1993). Cependant, la lactation devient moins efficace à partir de 14 jours (J14) avec des quantités de lait disponible en baisse chez la truie. Les porcelets ne sont pas égaux lors de l'allaitement, le choix de la tétine ainsi que la capacité à s'imposer pour la tétée sont déterminants pour la croissance du porcelet. Le lait a aussi un intérêt nutritif essentiel avec notamment l'apport de vitamine B et de fer, ces oligo-éléments faisant l'objet de carences entre 2 et 4 semaines d'âge. L'enjeu pour l'éleveur est d'obtenir le bon compromis entre l'intérêt de laisser certains porcelets sous une mère et la possibilité de les sevrer précocement.

Stage of lactation	IgG		IgM		IgA	
	Mean	CV ^b	Mean	CV	Mean	CV
0 h	95.6	34	9.1	49	21.2	42
6 h	64.8	31	6.9	50	15.6	43
12 h	32.1	51	4.2	58	10.1	60
18 h	21.6	65	3.2	52	6.7	60
24 h	14.2	72	2.7	46	6.3	72
48 h	6.3	47	2.7	39	5.2	55
72 h	3.5	41	2.4	32	5.4	55
5 d	1.8	40	2.1	38	5.2	46
7 d	1.5	41	1.8	44	4.8	45
14 d	1.0	37	1.5	47	4.8	36
21 d	.9	28	1.4	49	5.3	31
28 d	.8	34	1.4	56	5.6	34
35 d	.8	44	1.7	55	7.8	37
42 d	.8	31	1.8	57	9.4	33

Tableau 2 : Concentration (mg/ml) en immunoglobulines IgG, IgM et IgA dans le lait de truie en lactation.

Les valeurs sont la moyenne des données issues de 25 truies. La variation reste cependant très importante entre les truies (b, coefficient de variation supérieur à 30), (Klobasa, 1987).

1.4. Le sevrage

1.4.1. Conséquences physiologiques et immunitaires

Après la naissance, le sevrage est la deuxième période critique lors de l'élevage du porcelet. C'est un stress d'un point de vue physiologique et nutritif par le changement d'aliment (Mornet, 1982a), un stress comportemental avec la coupure de la relation truie - porcelet et un stress immunitaire avec l'arrêt de la protection immune du lait. La période de sevrage du porcelet a déjà fait l'objet de nombreuses études (Bailey et al., 2005a; Berkeveld et al., 2009; Brown et al., 2006a; Colson et al., 2006; Kraatz et al., 2006; Lalles et al., 2007; Miller et al., 1984; Vega-Lopez et al., 1995) dont le but est d'observer les perturbations dues au sevrage et de trouver les solutions de conduite d'élevage : le bien-être, l'alimentation et ses compléments et les probiotiques. La date du sevrage est déterminante en vue de l'amélioration de la reproduction mais le sevrage pratiqué précocement accroît le stress des porcelets (Orgeur et al., 2001). Le choix d'une alimentation adaptée permet aux porcelets les plus faibles d'être productifs et un arrêt de l'allaitement précoce va faire entrer la truie plus tôt dans un nouveau cycle biologique.

Pour conclure, l'élevage moderne qui nécessite une optimisation de la productivité, doit se baser sur deux aspects fondamentaux : le cycle reproductif de la truie qui doit se renouveler le plus efficacement possible ; et la gestion post-natale des portées qui comprend les porcelets mort-nés ou écrasés et l'optimisation de la croissance de la portée. Dans ce contexte, l'avantage du sevrage ultra-précoce est de reposer la truie, équilibrer la portée mais le désavantage consiste en un suivi plus rigoureux (site fédération porc Québec).

1.4.2. Mise en place du protocole expérimental

Définition des groupes : le système immunitaire des porcelets est immature, l'étude des déficits en présence peut donc se faire sur les 4 premières semaines. Les déficits en place peuvent être modifiés positivement ou négativement par un sevrage ultra-précoce. Nous avons donc choisi de décliner les dates de sevrage à partir des pratiques industrielles actuelles : un sevrage de référence à 21 jours et deux sevrages ultra-précoces à 14 et 7 jours. Un quatrième groupe sert de contrôle en restant sous la mère pendant 28 jours.

Choix des races : la ferme porcine de l'INRA possède 3 races de porcs, les LW en quantité majoritaire, les MS avec quelques truies et les HC dont la seule application est la recherche avec un cheptel modeste. Nous avons décidé dans un premier temps de travailler sur les portées HC. Le manque de fertilité et de fécondité nous a poussé dans un second temps à travailler sur les 2 autres races de l'élevage, ajoutant ainsi un paramètre secondaire dans les résultats, la race.

Conduite des porcelets : les truies sont placées en maternité une semaine avant la mise-bas. Les porcelets sont suivis dans les premières heures pour s'assurer de la prise de colostrum, la queue coupée et les dents meulées. Le choix de l'alimentation est important, en fonction de l'âge et des dates de sevrage, les aliments évoluant selon le diagramme indiqué dans l'annexe 5. Les conditions sanitaires sont classiques, le sol présente une partie en revêtement solide et une partie en caillebotis. Les porcelets ont un accès libre à la nourriture et à l'eau. Sous la mère, les tétées se font de manière naturelle et la prise alimentaire n'est de ce fait pas normalisée.

2. Organe cible de l'étude : l'intestin

2.1. Aspect anatomique

Chez les mammifères, l'intestin se présente sous 2 formes, le petit intestin et le gros intestin (colon). Depuis l'estomac, le petit intestin se décompose en 3 segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Ce dernier fait le lien avec le colon, on peut noter la présence du caecum que l'on peut assimiler à une poche de fermentation. Ces distinctions anatomiques varient en fonction des espèces étudiées. Ainsi, le porc présente un colon particulier dit « en spirale » (Figure 2) mais reste proche du colon humain par son diamètre et sa longueur (Pavaux, 1987). Le péristaltisme est très important dans la circulation du contenu intestinal ; il est assuré grâce à la contraction de muscles situés en périphérie de la paroi intestinale. Les muqueuses, situées en interne vers la lumière intestinale, permettent l'absorption des nutriments et sont le siège de la réponse immunitaire intestinale.

2.2. La digestion

L'appareil digestif est constitué par un ensemble d'organes assurant la nutrition de l'animal (Lecleire, 2008) ; il assure les étapes mécaniques et sécrétoires, ce qui permet de transformer les aliments en nutriments. La digestion des aliments est initiée dans la bouche et l'estomac avec une action mécanique, la sécrétion de sucs gastriques (pepsine) et la production d'enzymes salivaires (amylase). La digestion se fait aussi grâce aux organes annexes comme le foie et le pancréas. Elle se poursuit ensuite au niveau du duodénum avec l'arrivée des sucs biliaires et pancréatiques (lipase, trypsine) puis la digestion est complétée dans le jéjunum et l'iléon par les sucs intestinaux (maltase, lactase, lipase, peptidase) et l'intervention des bactéries. Le colon présente surtout une fonction d'absorption de l'eau.

Les bactéries participant à la digestion et à l'homéostasie de l'intestin sont de la catégorie « flore commensale ».

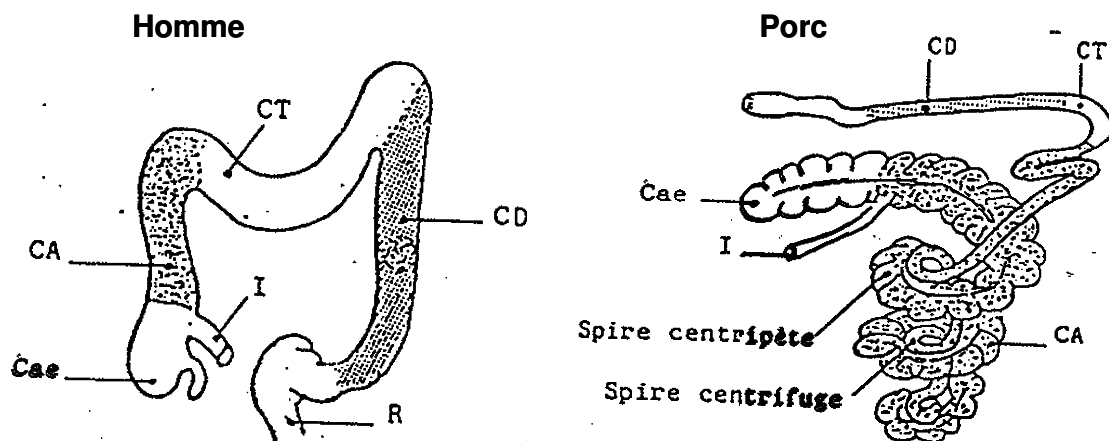


Figure 2 : Conformation du gros intestin chez l'Homme et le Porc.

Chez le porc, le colon ascendant présente un enroulement spiral. I, iléum ; CA, colon ascendant ; CT, colon transversal ; CD, colon descendant ; Cae, caecum (D'après Pavaux, 1987).

2.3. La flore intestinale

2.3.1. Flore commensale

A la naissance, le porcelet présente un tube digestif et une peau stériles. La colonisation se fait immédiatement après la naissance et en fonction de l'environnement (mère, lait, sol, élevage confiné ou extérieur) (Mulder et al., 2009). La flore commensale chez le jeune est influencée par le sevrage. En période de lactation, certaines bactéries vont coloniser le tractus intestinal pour ensuite être remplacées par d'autres espèces après le sevrage (Konstantinov et al., 2004). La composition de la flore change aussi en fonction de la zone de l'intestin et des conditions (acidité, oxygène). L'étude de la flore reste très difficile à cause des difficultés de cultures des bactéries anaérobies notamment. Ces bactéries participent aussi à l'immunité intestinale avec un rôle certain de stimulant (Figure 3) (O'Hara and Shanahan, 2006). Voici quelques exemples des principales bactéries connues :

Lactobacillus : ce genre de bactéries à gram positif est très répandu chez le porcelet via l'allaitement. Les espèces *L. acidophilus*, *L. bifidus* et *L. casei* sont les plus connues et participent au métabolisme intestinal. Elles produisent notamment la lactase permettant ainsi la digestion du lactose du lait. Ces bactéries sont situées dans l'intestin grêle et dégradent le lactose en l'absence de lactase endogène. Il faut noter que certaines bactéries fermentant le lactose dans le colon sont responsables de l'intolérance au lactose (Marquet et al., 2009).

Bifidobacterium : genre de bactéries à gram positif, il en existe une espèce ou sous groupe pour chaque espèce animale (Gavini et al., 2006). Les qualités de ce genre bactérien sont proches des *lactobacillus* et dues à l'allaitement. *Bifidobacterium suis*, pour le porcelet est très proche de la bactérie du nourrisson. Cependant, elles correspondent plutôt à la flore du colon.

Escherichia coli : Cette espèce à gram négatif, est principalement présente dans l'intestin au niveau du colon. De nombreux sérotypes sont connus (environ 157) dont une partie est classée comme commensale et l'autre en tant que pathogène (Mornet, 1982b). Cette espèce est classée selon 3 caractères antigéniques : le somatique O, le capsulaire K et le flagellaire H définissant ainsi les différents sérotypes.

Streptococcus, *Enterococcus*, *Clostridium* sont des bactéries présentes naturellement en plus faible quantité dans le tube digestif mais peuvent devenir des pathogènes opportunistes.

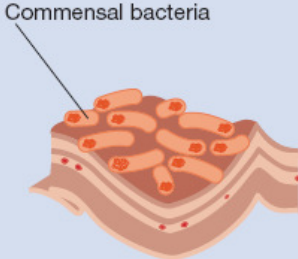
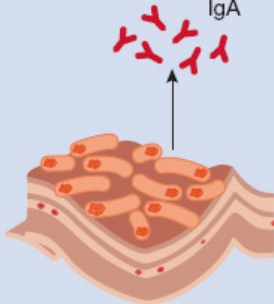
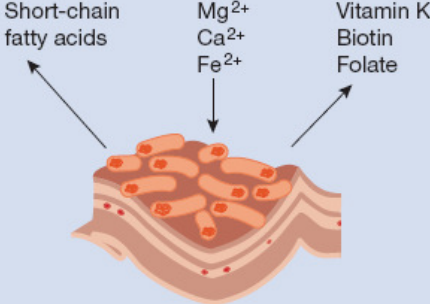
Protective functions	Structural functions	Metabolic functions	
Pathogen displacement Nutrient competition Receptor competition Production of anti-microbial factors e.g., bacteriocins, lactic acids	Barrier fortification Induction of IgA Apical tightening of tight junctions Immune system development	Control IEC differentiation and proliferation Metabolize dietary carcinogens Synthesize vitamins e.g., biotin, folate	Ferment non-digestible dietary residue and endogenous epithelial-derived mucus Ion absorption Salvage of energy
 Commensal bacteria	 IgA	 Short-chain fatty acids Mg²⁺ Ca²⁺ Fe²⁺ Vitamin K Biotin Folate	

Figure 3 : Fonctions de la flore commensale.

La flore commensale agit selon 3 critères définis : elle permet une protection de la muqueuse intestinale, agit sur sa structure et son métabolisme. (D'après O'Hara et Shanahan, 2006).

La colonisation par les bactéries commensales permet grâce à leur quantité, leur métabolisme, de limiter l'expansion de bactéries pathogènes ; c'est la flore d'exclusion.

2.3.2. Flore pathogène

Lors du sevrage des porcelets, l'apparition de diarrhées est fréquente et représente un enjeu majeur pour l'élevage. La diarrhée peut être nutritionnelle à cause du changement d'alimentation (Mornet, 1982b) mais elle est aussi due à différents pathogènes de l'intestin modifiant l'équilibre intestinal (Lebourg, 2005) et pouvant provoquer une gastro-entérite. Trois principales maladies peuvent être distinguées chez le porc ; la colibacillose, la salmonellose et la gastro-entérite transmissible (site web thepigsite.com).

Escherichia coli : de nombreuses classes de bactéries pathogènes ont été décrites pour les *E. coli* pathogènes (EC) chez l'Homme en fonction du mécanisme d'action : entéro-toxinogène (ETEC), entéro-pathogénique (EPEC) et entéro-invasive (EIEC). La colibacillose peut se déclarer après la naissance ou après le sevrage. Les souches sont classées en fonction de caractères antigéniques : antigènes somatiques O, capsulaires K et flagellaire H qui permettent de différencier les souches pathogènes. Chez le porc, l'ETEC K88 est responsable de colibacilloses post-sevrage (Mornet, 1982b), c'est un modèle infectieux très étudié (Jin and Zhao, 2000; Opapeju et al., 2009; Snoeck et al., 2006). K88 est une adhésine permettant à la bactérie d'adhérer aux villosités intestinales. La bactérie pathogène produit ensuite une entérotoxine agissant sur la perméabilité des cellules épithéliales. Les forces osmotiques sont modifiées et l'eau passe dans la lumière intestinale induisant la diarrhée. Pour lutter contre la maladie, un traitement antibiotique est pratiqué par voie orale. La prophylaxie médicale consiste à vacciner les truies et les porcelets (souches inactivées, antigène K88, fraction d'entérotoxine).

Salmonella : ce pathogène est fréquent en santé animale et cause des toxi-infections alimentaires. Cette bactérie à Gram négatif a été découverte par Salmon (Etats-Unis) en 1985 sur des porcs atteints de peste porcine. *Salmonella cholerae suis* provoque des symptômes de salmonellose intestinale chez le porc comme la diarrhée, la fièvre et la perte d'appétit. La classification est fondée sur la détection des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H). Le pathogène produit une endotoxine conduisant à la diarrhée. Une déficience en vitamine B favorise le développement de la maladie, un complément alimentaire et un traitement antibiotique à large spectre sont à prescrire. La prophylaxie est principalement sanitaire.

Virus de la Gastro-entérite transmissible (TGEV) : ce coronavirus provoque la destruction des cellules épithéliales de l'intestin grêle dans lesquelles il se réplique ; il en résulte une malabsorption et une diarrhée entraînant une forte déshydratation mortelle chez le nouveau-né. Son action peut être concomitante avec celle des bactéries citées ci-dessus. Le diagnostic repose sur la sérologie. Le virus est très contagieux et la mortalité avoisine les 100% chez le nouveau-né (Mornet, 1982b). Il n'y a pas de traitement spécifique et la prophylaxie sanitaire est limitée. Cependant, la vaccination des mères est possible (Aynaud et al., 1991). La protection par un lait immun est efficace (voir 3.5), l'induction de l'immunité lactogénique quelques semaines avant la mise bas est une bonne méthode de prophylaxie médicale complémentaire à la vaccination et permettant une protection immédiate du porcelet.

Les élevages modernes présentent une concentration d'animaux très élevée favorisant la dissémination des pathogènes. Cependant, les règles strictes d'hygiène limitent parfaitement l'apparition d'un pathogène. Les traitements antibiotiques – facteurs de croissance, utilisés en routine dans les élevages sont depuis peu (2006) interdits en Europe. L'importance de la flore commensale et les compléments alimentaires sont donc un enjeu très important pour l'élevage porcin.

3. Le système immunitaire intestinal

3.1. Structures lymphoïdes de l'intestin

L'intestin présente des structures lymphoïdes secondaires et tertiaires décrites comme des tissus avec différents degrés d'organisation, formant le *gut associated lymphoid tissue* (GALT). Les plaques de Peyer (PP) et les ganglions sont des structures organisées en follicules alors que la *lamina propria* est diffuse dans les villosités de l'intestin (Figure 4).

3.1.1. Les plaques de Peyer

Les PP sont des structures lymphoïdes secondaires de l'intestin. Elles ont été décrites par Johann Conrad Peyer, en Suisse, au cours du 17^e siècle (Peyer, 1677). Ces structures sont les sites privilégiés de l'initiation de la réponse immunitaire intestinale, elles sont colonisées par des lymphocytes T et B naïfs grâce aux *high endothelial venules* (HEV). Les PP présentent des cellules caractéristiques, les cellules M (Jang et al., 2004), qui sont chargées de capter puis présenter les antigènes. L'organisation des cellules M, des cellules dendritiques, des cellules folliculaires et des follicules de lymphocytes T permet, au sein des PP, l'activation des lymphocytes B (LB) organisés en follicules. Chez le porc, deux types de PP ont été décrits en lien avec la géographie de l'intestin : les PP jéjunales, courtes et dispersées le long du jéjunum et la PP iléale, longue, le long de l'iléon. Les PP sont irriguées par la lymphe qui permet le transport des lymphocytes B activés. Ces tissus seront étudiés et comparés dans la première partie de la thèse (Article1).

3.1.2. La chaîne ganglionnaire mésentérique

Ce tissu centralise la réponse immunitaire intestinale. Un ganglion est irrigué par une lymphe afférente qui a drainé les PP principalement ainsi que la *lamina propria*. Cette lymphe afférente transporte ainsi différents types de cellules dendritiques (caractérisées par CD11b, CD11c et CD103 chez la souris (Coombes and Powrie, 2008)), exprimant CCR7+ (Jang et al., 2006) et initiant une réponse immunitaire. Le ganglion présente une lymphe efférente permettant la mise en circulation des cellules activées (LT, LB) dans le compartiment sanguin

via le canal thoracique. Le porc semble faire figure d'exception dans ce mécanisme avec la possibilité d'une re-circulation directe dans le sang *via* un rétro-transport des HEV. Le ganglion (MLN) a donc été l'objet principal de l'étude (Article2).

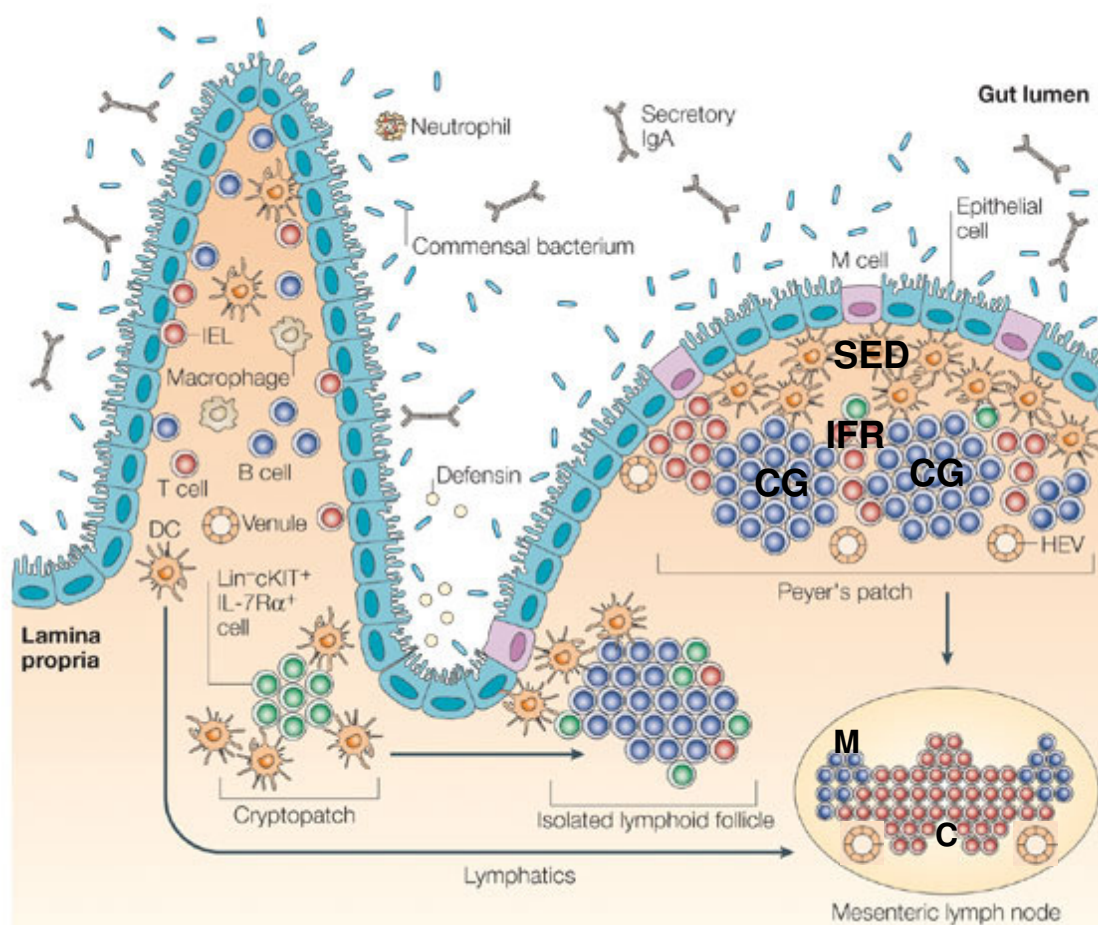


Figure 4 : Organisation du *gut associated lymphoid tissue* chez la souris.

Les lymphocytes migrent dans les structures germinatives grâce aux veinules à haut endothélium (HEV). Les cellules dendritiques de la PP sont situées dans le dôme sub-épithélial (SED) et activent les lymphocytes B (en bleu) regroupés en follicules dans les centres germinatifs (CG). Les lymphocytes T (en rouge) sont organisés en régions interfolliculaires (IFR) dans les PP jéjunales. L'organisation est similaire dans le MLN avec les follicules B présent en périphérie dans la medulla (M) et les lymphocytes T dans le cortex (C). A noter que les *isolated lymphoid follicle* n'ont pas été décrits chez le porc (d'après (Eberl, 2005)).

3.1.3. La *lamina propria*

Ce tissu diffus contient des cellules inductrices sentinelles comme les DCs, les macrophages mais aussi les cellules effectrices (plasmocytes, LT CD8+). Les LT CD4+ représentent la majorité des cellules de la *lamina propria* (LP) et sont généralement nommés LPL alors que les LT CD8+ s'insèrent dans l'épithélium (Pabst and Rothkotter, 1999). Ces lymphocytes intra-épithéliaux sont nommés IEL et ont une activité cytotoxique. Le tissu est irrigué par la circulation sanguine permettant l'acheminement des cellules activées. C'est le lieu final de la réponse IgA. Les lymphocytes y migrent, différenciés en plasmocytes IgA+ qui excrètent les IgA.

3.2. Répertoire lymphocytaire B

La description des mécanismes de la diversité des lymphocytes B a été rendue possible par l'étude du modèle murin. Le mécanisme est proche chez le porc même si les gènes diffèrent en nombre (Butler et al., 2009a; Butler et al., 2009b).

3.2.1. Génétique du lymphocyte

Les lymphocytes B ou T sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire spécifique. Chaque antigène a une spécificité de séquence, de conformation ou de structure. Il existe ainsi des milliards d'antigènes différents dans la nature et leur contrôle nécessite que l'organisme puisse les différencier. Les récepteurs des lymphocytes doivent donc être sélectionnés pour leur spécificité d'interaction avec un antigène et doivent être produits en grand nombre (10^{12} à 10^{15}). Pour cela, le récepteur des cellules B (BCR) est codé par plusieurs gènes formant un homodimère à 2 sous-unités (Figure 5). La petite sous-unité, ou chaîne légère (L), est codée par un gène variable (V) et un gène de jonction (J). Il existe deux locus kappa et lambda ; la grande sous-unité, ou chaîne lourde (H), est codée par un gène V, un gène de diversité D et un gène J plus un gène codant pour la partie constante de l'immunoglobuline (C). Chez le porc, il existe environ 20 gènes V_H , 2 gènes D_H et un seul gène J_H pour la chaîne lourde (Butler et al., 2009a; Butler et al., 2009b). Ceci est très faible par rapport au nombre observé chez l'homme (87 V_H , 28 D_H et 9 J_H) ou la souris. De même, les gènes C ne sont pas classés de la même manière, le porc présente 1 gène Delta, 1 Mu, 3 Gamma, 1 Epsilon et 1 Alpha (1, 1, 4, 1 et 2 respectivement chez l'homme).

REGIONS VH



Ces régions sont contrôlées par les gènes:



REGIONS VL

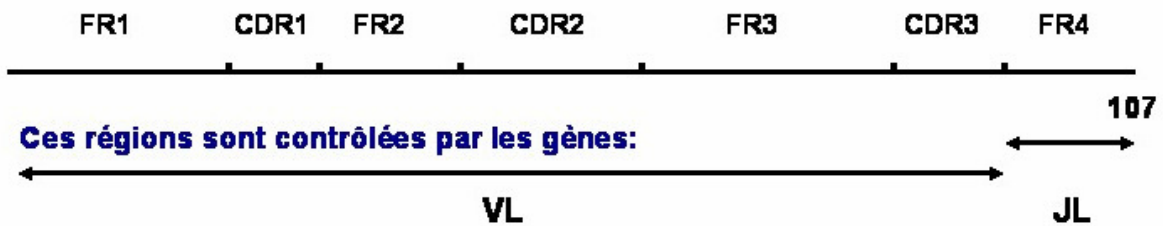


Figure 5 : Gènes codant pour les chaînes lourdes (H) et légères (L) des immunoglobulines.

Les chaînes peptidiques présentent deux types de régions : FR pour *Frame Region*, région très conservée au contraire des *Complementarity Determining Region* (CDR) qui sont la cible des mutations somatiques.

3.2.2. La famille des immunoglobulines

Le terme « immunoglobuline » regroupe toute protéine présentant un domaine spécifique. En immunologie, ce terme peut être relié à une forme libre, l'anticorps ou une forme membranaire, le récepteur du lymphocyte B (BCR). La famille des immunoglobulines diffère génétiquement entre le porc et l'homme mais les fonctions restent conservées (Butler et al., 2009a; Butler et al., 2009b). Les immunoglobulines :

IgD (Delta) : l'expression de IgD est sujette à controverse chez le porc (Butler et al., 2009b). Cette protéine, monomère et membranaire, est présente seulement lors de l'activation du lymphocyte B IgM+. Il y aurait, comme chez l'homme et la souris, une phase de double expression IgM/IgD (Butler et al., 2009a).

IgM (Mu) : le gène mu est exprimé par défaut par les lymphocytes B naïfs et lors de l'initiation d'une réponse immunitaire. Cet anticorps est le marqueur d'une réponse anticorps précoce, il est le principal représentant des anticorps naturels. L'anticorps est sous forme pentamérique et particulièrement efficace pour l'activation du complément (réponse précoce). Le pentamère se forme grâce à une chaîne de jonction (chaîne J) et peut se trouver sous forme sécrétée sIgM dans l'intestin grâce au récepteur basal des cellules épithéliales, le pIgR dont un fragment formera la pièce sécrétoire.

IgA (Alpha) : c'est l'anticorps de la défense mucosale, comme les IgM, les IgA présentent une chaîne J. Ils sont produits sous forme dimérique dans l'intestin et sécrétés par les cellules épithéliales en sIgA. Il est beaucoup moins efficace pour l'activation du complément, ce qui permet la préservation de la muqueuse. La pièce sécrétoire lui donne une meilleure résistance à la protéolyse des enzymes bactériennes. Les IgA, issues du lait ou sécrétées dans la lumière intestinale, ont un rôle dans l'homéostasie de la flore intestinale par fixation des bactéries commensales, un rôle d'exclusion des antigènes et un rôle dans la présentation de ces antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

IgG (Gamma) : les IgG sont des monomères, il y a différentes sous classes variables suivant les espèces. Les IgG sont très importantes pour le porcelet nouveau-né et pour l'immunité mucosale des rongeurs. C'est l'anticorps le plus représenté dans le sang avec un rôle important dans l'opsonisation, l'activation du complément. Il est fortement exprimé dans le cadre de la réponse secondaire systémique.

IgE (Epsilon) : cette classe d'anticorps est très peu représentée, en quantité, dans l'organisme des mammifères. C'est un monomère impliqué principalement dans la réponse aux parasites. Cette classe est aussi impliquée dans les phénomènes d'allergie.

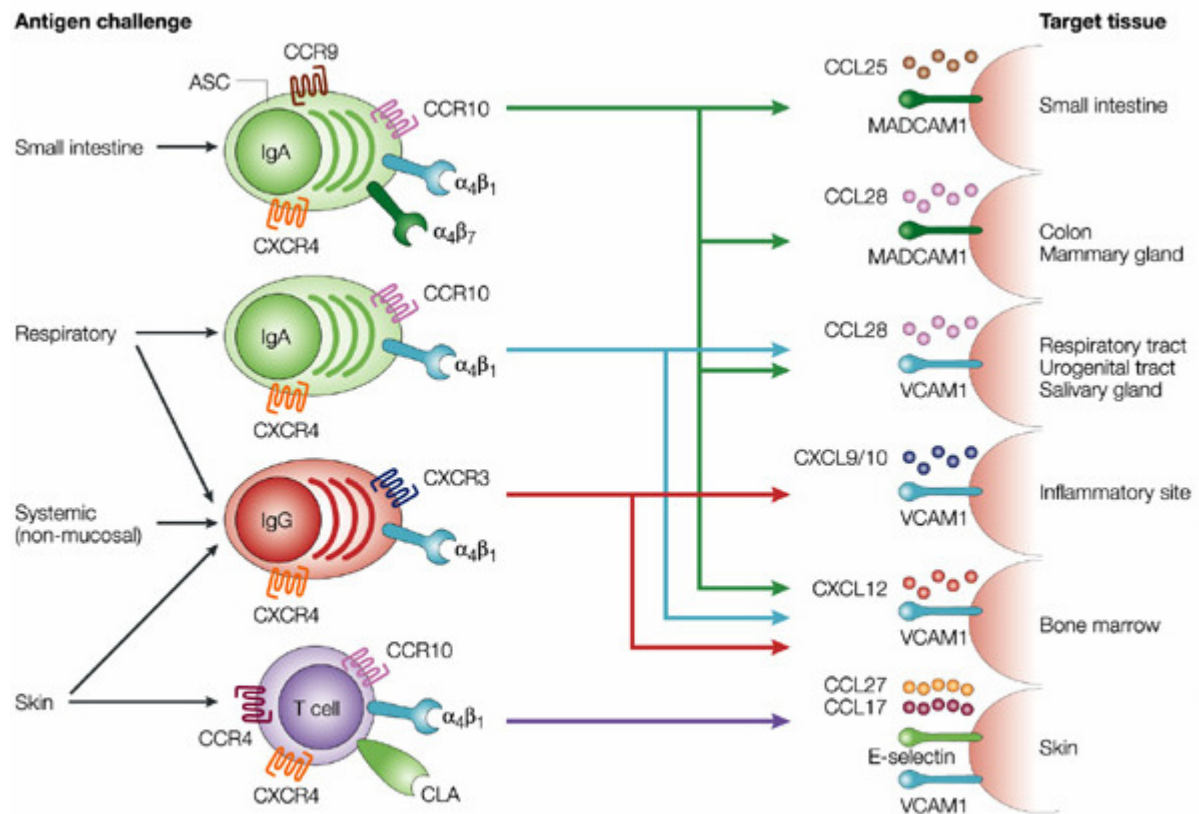
3.2.3. Diversification du répertoire

Face à la quantité d'antigènes présents à l'extérieur, l'utilisation des gènes se fait de manière aléatoire et avec différents degrés de diversification (Voir Annexe 2). Le premier degré de diversité est le produit de l'assemblage des sous-unités L et H. Le second degré de diversité est valable pour les deux chaînes avec le produit des différentes combinaisons V(D)J possibles. La recombinaison des gènes VDJ se fait par activité enzymatique avec les enzymes *Recombinase-Activating Gene* (RAG) (Matthews and Oettinger, 2009). Les deux derniers degrés de diversification sont des phénomènes enzymatiques aléatoires concernant plus particulièrement la chaîne lourde. La jonction des segments V-D et D-J est l'occasion d'ajout ou de suppression, par l'enzyme *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT), de nucléotides appelés P et N nucléotides (Komori et al., 1993). Cette région est nommée *Complementarity Determining Region 3* (CDR3) et est l'objet privilégié, dans un quatrième temps, de mutations somatiques. Ces mutations ponctuelles (SHM) peuvent être simultanées au switch isotypique (CSR), ces deux phénomènes étant assurés par une enzyme commune, la *Activated-Induced cytidine Deaminase* (AID) (Butler et al., 2009a; Kuraoka et al., 2009).

3.3. Mécanisme de la migration cellulaire

3.3.1. Notion de « *Homing* » (domiciliation)

Après l'activation des cellules B des PP ou du MLN, ces dernières migrent depuis le site inducteur vers le site effecteur (Figure 6). Le transport est assuré par la lymphe et le sang. Face à un antigène présent dans l'intestin, l'organisme doit faire produire des Ig dans l'intestin en priorité mais il peut aussi disséminer des plasmocytes dans d'autres muqueuses (muqueuse bucco-nasale, génitale ou mammaire) de manière spécifique en plus de l'intestin, d'où le terme *homing* (Butcher and Picker, 1996).



Nature Reviews | Immunology

Figure 6 : Modèle de *homing* des lymphocytes depuis les sites inducteurs du système immunitaire vers les tissus cibles.

Le recrutement des cellules lymphoïdes vers les tissus cibles nécessite l'expression de chimiokines et d'adresses ainsi que leurs récepteurs respectifs. Dans ce modèle, les lymphocytes IgA⁺ induits dans le petit intestin peuvent migrer vers tous les sites muqueux. Les couleurs des récepteurs correspondent à celles de leurs ligands (Kunkel and Butcher, 2003).

3.3.2. Les couples adressines / chimiokines - récepteurs

MAdCAM-1 / $\alpha 4\beta 7$: (*Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule 1*) est l'adressine vasculaire de la muqueuse digestive. Chez l'homme et la souris, MAdCAM-1 est exprimée par les HEV des PP et MLN et par les vaisseaux de la *lamina propria* intestinale (Briskin et al., 1997). MAdCAM-1 est aussi exprimée par les HEV des ganglions périphériques du fœtus et du nouveau-né, ceci reste à démontrer chez le porc. L'ARNm de MAdCAM-1 peut subir un épissage alternatif de son exon 4 chez la souris (Schiffer et al., 1995). Les deux formes sont reconnues par l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée par les lymphocytes d'origine intestinale. L'état d'inflammation d'un tissu peut modifier le profil d'expression de MAdCAM-1. En effet, le TNF- α (via NFkB), l'IL-1 et le LPS induisent *in vitro* l'expression de MAdCAM-1 sur une lignée murine de cellules endothéliales (Sikorski et al., 1993).

V-CAM-1 / $\alpha 4\beta 1$: (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) est exprimée par les cellules endothéliales et mésenchymateuses du tractus pharyngal (Bourges et al., 2004). Son rôle dans le recrutement des lymphocytes a été décrit au niveau des sites extra-intestinaux. Cependant, dans les cas d'inflammation (dont la protéine peut être un marqueur), son expression peut être située au niveau du colon notamment (Kawachi et al., 1999). Cette adressine fonctionne en couple avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ exprimée par les lymphocytes circulants.

CCR9 / CCL25: (*Chemokine Receptor 9 and Chemokine Ligand 25*) sont particulièrement exprimés dans le petit intestin (Meurens et al., 2006). CCR9 appartient à la famille des protéines G alors que CCL25 est une petite protéine au motif C-C (1 liaison Cystéine) caractéristique des chimiokines. Le récepteur est exprimé par les lymphocytes circulant vers le site effecteur, l'intestin, dont les cellules épithéliales expriment CCL25. Le gradient de la chimiokine permet le *homing* des lymphocytes effecteurs ainsi que des lymphocytes intra-épithéliaux IEL (Ericsson et al., 2004). CCL25 est essentiel dans le développement des lymphocytes issus du thymus, d'où son autre désignation : *Thymus-expressed Chemokine* (TECK).

CCR10 / CCL28: la chimiokine CCL28 est aussi nommée *Mucosae-associated Epithelial Chemokine* (MEC). Ce couple appartient à la même famille que le précédent mais les expressions sont situées au niveau du colon et autres muqueuses. La redondance des molécules s'observe pour CCR10 qui interagit avec CCR3 aussi. De plus, CCL28 possède des propriétés antimicrobiennes (Hieshima et al., 2003).

3.3.3. La diapédèse

Après activation et mise en circulation, les lymphocytes doivent quitter la circulation sanguine et ainsi arriver sur le site effecteur. Pour cela, les adhésines sont exprimées au niveau de l'endothélium vasculaire du site effecteur et leurs récepteurs exprimés par les lymphocytes (Kunkel and Butcher, 2003). Ces interactions vont permettre un passage en quatre temps (contact, roulement, adhésion et traversée de l'épithélium) du lymphocyte circulant vers le tissu conjonctif. Le relais est ensuite pris par les chimiokines diffuses dans le tissu et exprimées en grande partie par les cellules épithéliales de la muqueuse. Les récepteurs exprimés par les lymphocytes permettent la détection du gradient de chimiokines qui va induire la migration dans le sens opposé (Figure 7).

3.4. Cytokines et la réponse immunitaire intestinale

Depuis la migration des cellules naïves dans les centres germinatifs jusqu'à la migration de ces mêmes cellules dans les sites effecteurs, des dizaines de cytokines interviennent dans les interactions cellulaires. Nous avons vu le rôle des chimiokines dans le phénomène de *homing*, nous allons nous intéresser ici aux étapes de différenciation cellulaire impliquant les interleukines principalement.

La voie Th2 : elle symbolise la réponse humorale, aboutissant principalement à la production d'anticorps. Chez le porc, la description des cytokines impliquées est encore controversée mais les molécules d'intérêt sont les suivantes : IL5, IL13, (IL4), GATA3 (Johansson et al., 2003).

La voie inflammatoire : les cytokines inflammatoires ont un rôle essentiel dans l'initiation d'une réponse cellulaire (Th1) mais peuvent aussi intervenir en complément sur la production des IgA intestinaux (Figure 8). Il s'agit principalement de l'IL1, IL6, IL8 (Lammers et al., 2005). L'IL17 est une interleukine nouvellement décrite (Aujla et al., 2007) qui pourrait, en plus d'être un marqueur d'inflammation, être essentielle dans la réponse allergique.

Cytokines et tolérance : au niveau de l'intestin, la tolérance orale est un mécanisme essentiel permettant au système immunitaire d'ignorer une grande quantité d'antigènes. Cette tolérance est induite par les lymphocytes sous l'effet de différentes cytokines comme l'IL10 et le TGF β mais aussi par les oligo-éléments de l'alimentation comme la vitamine A transformée par l'organisme en acide rétinoïque (von Boehmer, 2007).

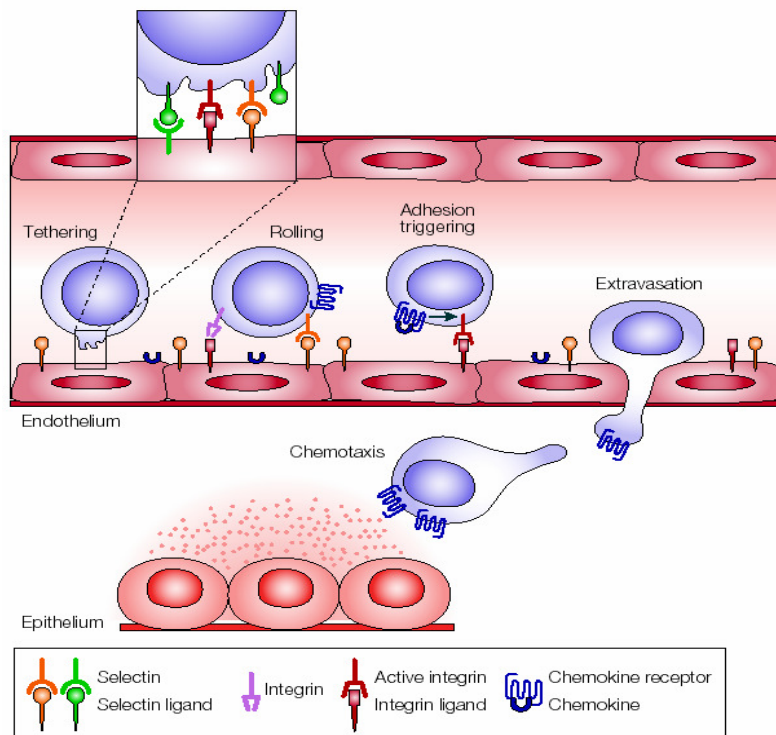


Figure 7 : La diapédèse : migration du lymphocyte depuis la circulation sanguine vers le site effecteur.

Le lymphocyte (en bleu) interagit avec l'endothélium en 4 phases (*Tethering*, *Rolling*, *Adhesion*, *Extravasation*) : le contact avec l'endothélium se fait par interaction sélectines/carbohydrates permettant ainsi le roulement du lymphocyte. Les interactions sont ensuite renforcées par les intégrines/adressines pour finalement permettre l'extravasation du lymphocyte. La dernière étape est la migration vers l'épithélium sécrétant des chimiokines spécifiques formant un gradient de concentration (Kunkel and Butcher, 2003).

APRIL, BAFF : (*A proliferation-inducing ligand and B cell activating factor*) ces deux membres de la famille des TNF-ligand agissent sur le développement et la prolifération des lymphocytes B (Chu et al., 2007). Chez l'homme et la souris, ces protéines induisent de manière T-indépendante le *Class Switch Recombination* (Figure 9).

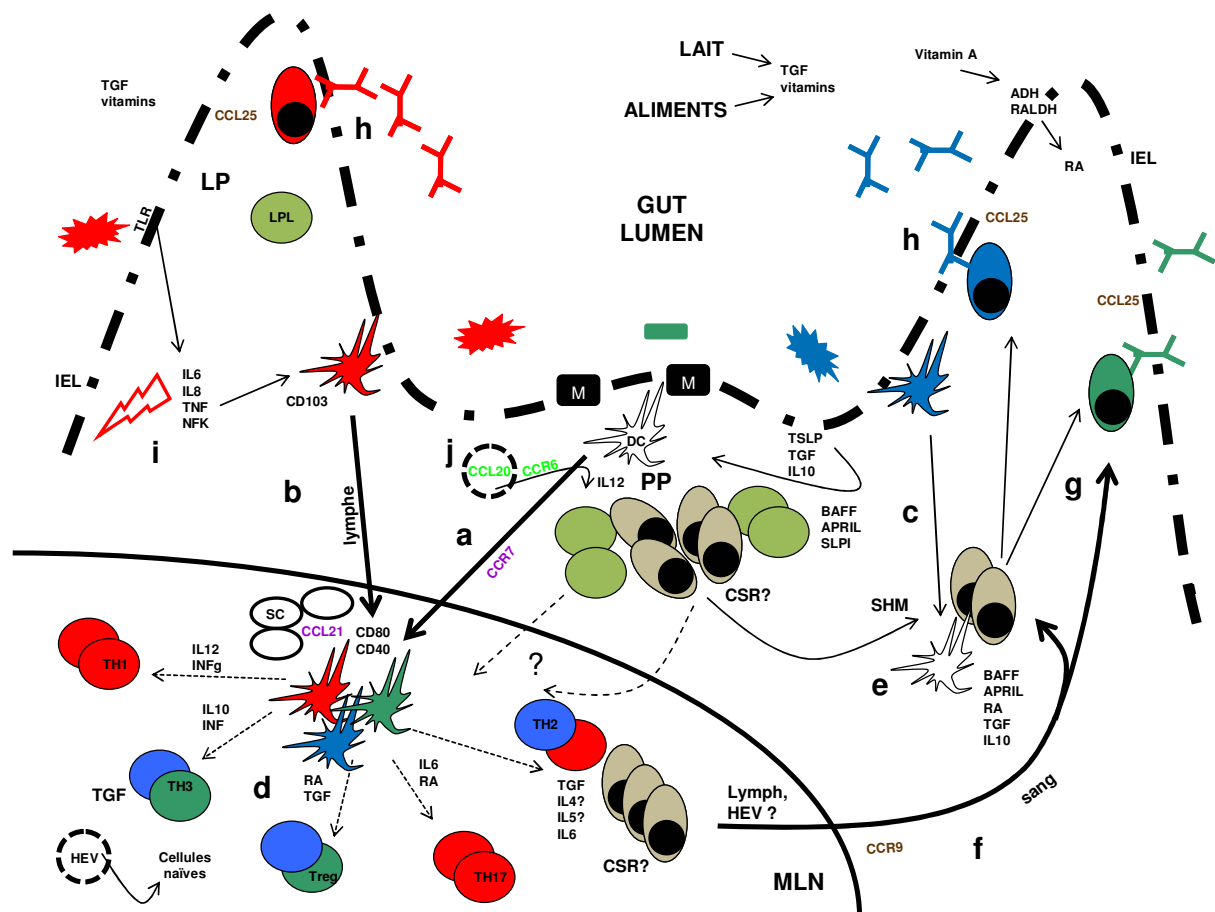


Figure 8 : Schéma général de la réponse immunitaire intestinale.

a,b et c : initiation de la réponse par trois voies possibles, la PP (a), la LP (b et c). Les DCs CCR7⁺ migrent dans le MLN (d), les CCR7⁻ migrent dans la LP (e). Dans la PP, les LB sont activés et migrent (par circulation lymphatique puis sanguine) dans la LP. Dans le MLN, les DCs orientent les Th qui activent les LB en fonction de la nature des antigènes. Le mécanisme d'activation des LB est donc T-dépendant (d) ou T-indépendant (e). Les LB expriment CCR9 et migrent vers la LP (f). Dans la LP, les cytokines produites par les DCs et les cellules épithéliales permettent le SHM s'il n'a pas eu lieu dans les PP et le MLN. Les plasmocytes peuvent finalement produire des anticorps (g) qui seront sécrétés dans la lumière (h). Le schéma symbolise trois types d'antigènes : bactérie commensale en bleu, protéine alimentaire en vert et bactérie pathogène en rouge. La bactérie pathogène, traversant la barrière épithéliale est détectée par les DCs CD103⁺ et induit l'expression de cytokines inflammatoires agissant sur les jonctions cellulaires de l'épithélium (i). Le renouvellement des lymphocytes naïfs (CCR6⁺) dans les CG se fait grâce à leur migration depuis la moelle osseuse jusqu'aux HEV exprimant CCL20 (j). ADH : Alcohol DeHydrogenase ; CSR : Class switch Recombinaison ; HEV : High Endothelium Venule ; IEL: Intra Epithelial Lymphocyte (carré noir) ; LPL : *Lamina Propria* Lymphocyte ; M : cellule « Microfold » ; MLN : Mesenteric Lymph Node ; PP: Plaque de Peyer; RALDH : Retinol Acid Dehydrogenase ; SHM : Somatic Hyper-Mutation. Les mécanismes cellulaires décrits sont issus de la littérature de la souris principalement, d'après (Akira et al., 2006; Cerutti, 2008; Cerutti and Rescigno, 2008; Coombes and Maloy, 2007; Cortes, 2007; Ilijev et al., 2007; Macpherson et al., 2001; Mora et al., 2006; Mowat, 2003).

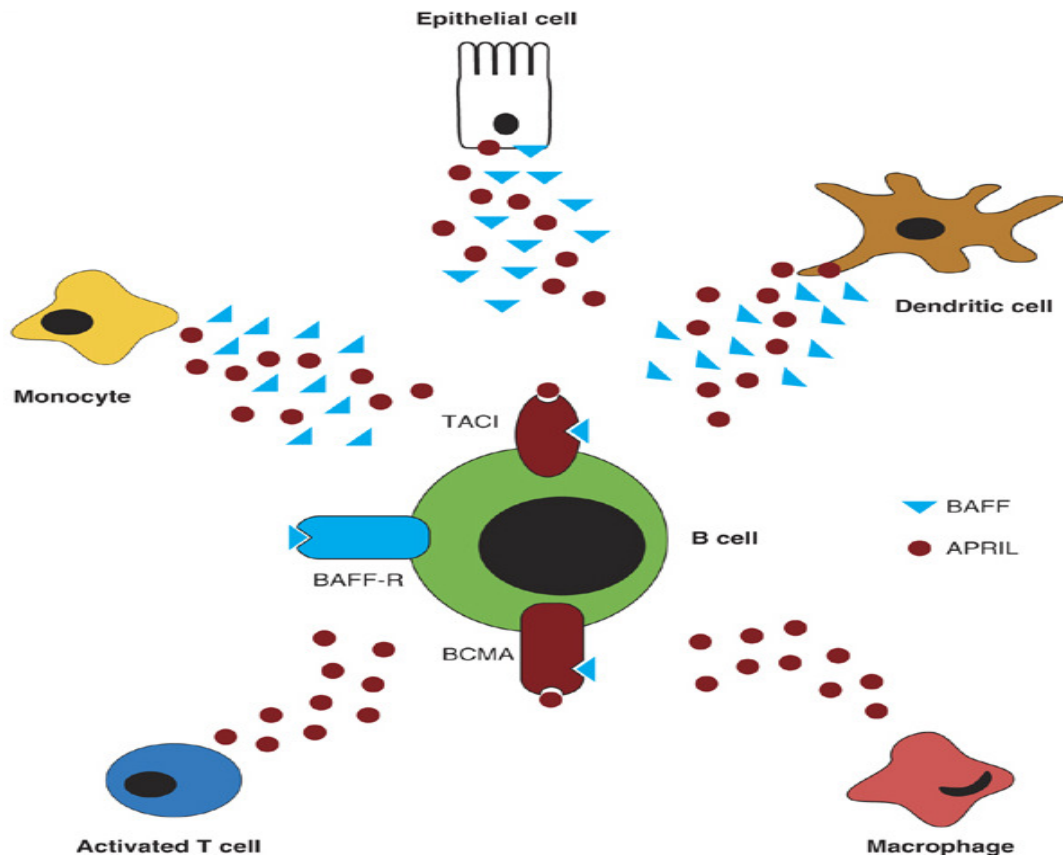


Figure 9 : Origine d' APRIL et BAFF agissant sur les cellules B.

Les deux cytokines sont produites par les cellules dendritiques, les cellules épithéliales et les monocytes. Les cellules B présentent des récepteurs spécifiques (BAFF-R et TACI) et le BCMA interagissant avec les deux protéines. TACI : *Transmembrane Activator and Cyclophilin-ligand Interactor*, BCMA : *B Cell Maturation Antigen*. (Mucosal Immunology, 2007).

3.5. Le lien entéro-mammaire

Dans les premiers mois de vie du porcelet, le système immunitaire intestinal doit développer les caractéristiques aperçues ci-dessus (Figure 8), celles d'un système mature (voir Revue ci-après). Pour cela, l'intestin est aidé par les facteurs de développement du lait et dans le même temps le porcelet est protégé. Toute réponse immunitaire de l'intestin chez la mère génère des plasmocytes à IgM, IgA et IgG spécifiques des antigènes présents dans l'environnement de la truie et de ses petits (Figure 10). Ces plasmocytes, par le jeu du *homing*, présentent pour certains des récepteurs plus spécifiques de la glande mammaire (CCR10, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$). Ils migrent donc vers l'épithélium mammaire et les Ig produites sont sécrétées par les cellules épithéliales dans le lait (Salmon et al., 2009b). Des cellules épithéliales et des lymphocytes sont aussi retrouvés dans le lait, attirés par les chimiokines (CCL28). Cette protection potentielle (Ig + cellules) est donc transférée au porcelet lors de l'allaitement. La protection passive est ainsi efficace grâce au lien entéro-mammaire qui permet au porcelet d'être protégé contre le même environnement que la mère. La question est de savoir si cette protection n'empêche pas le porcelet d'initier son propre système immunitaire.

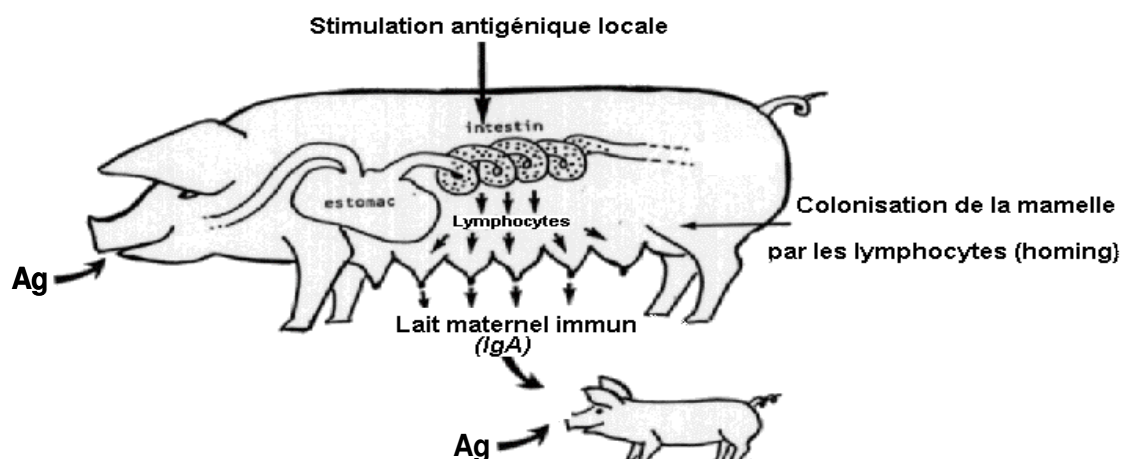


Figure 10 : Lien immun entéro-mammaire.

L'ingestion d'un antigène (Ag) par la truie donne lieu à une stimulation du système immunitaire intestinal (PP, MLN) avec activation de lymphocytes spécifiques. Des lymphocytes B migrent par le sang pour atteindre les mamelles et sécréter des anticorps IgA spécifiques du même Ag présent dans le tractus du porcelet qui est ainsi protégé.

4. Revue bibliographique

Mucosal immunity: Development of gut Immunoglobulin A production in piglet post-natal period and influence of environment factors

Benoît Levast¹, Mustapha Berri¹, François Meurens¹, Henri Salmon^{1*}

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380, Nouzilly, France.

- *Revue à soumettre* -

*Corresponding author: Email: hsalmon@tours.inra.fr. Phone: +33-247427891; Fax: +33247427779.

Short Running Title: Influences on IgA intestinal response in piglets

SUMMARY

The current review focuses on the development of intestinal immunoglobulin A (IgA) production in pig. The ontogeny is influenced by two types of factors: intrinsic genetic factors present in the foetal period opposed to extrinsic factors associated with environment characteristics which appeared during post-natal period. At birth, piglets suckled maternal colostrum and are in contact to the environment microbiota with new antigens leading to the development of the gut immune system with IgA response or oral tolerance. Weaning represents the second critical period for young animals and for their intestinal immune system development as well. The gut environment is affected as secretions alimentary antigens are present in the intestine lumen and immune protection provided by milk ends up because of Ig supply lack.

Here, we focused our review, in a first part, on the foetal and post-natal intestinal immune system development. In the second part, two major extrinsic developmental factors, the flora and maternal secretions will be discussed.

KEYWORDS: Pre- and Post-natal period, mucosal immunity, IgA, gut flora, milk

1. INTRODUCTION

In all species, neonates present an immaturity of their immune system. Some species, like horse and pig, do not present placenta immunoglobulin transfer from mother to foetus including absence of gut antigenic stimulation. For this reason, these species are an interesting model to study the ontogeny of mucosal immune system in absence or presence of environmental stimulations. Intestine is the most important mucosal tissue in mammals presenting a single epithelial cells layer.

1.1. Functions of the intestine: The intestine is an organ having several functions. i) The first one is characterized with the ingestion of the bowl nutrients including colostrum and milk for neonates as the enterocytes have developed a selective permeability to peptide food (Gardner, 1978; Gardner et al., 1983). ii) The intestine wall represents a physical barrier between the organism and the intestinal lumen which contains digestive bowl and microorganisms. Nevertheless, during the first 36 hours, the pig neonatal intestine presents permeability to proteins including immunoglobulin (Ig). iii) Finally, the intestine is a centre of mucosal immune response against luminal antigen. To develop a specific protective mucosal immune response against pathogens, the local immune system of gut has to discriminate between

harmful and non harmful antigens, such as antigens from the food and from the commensal flora.

1.2. Anatomy, cellular and humoral compartments of IgA intestinal immune response in pig adult: The intestinal immune response is mainly related to the anatomy of gut immune system. In adults, the lymphoid system is divided into two organized and diffuse lymphoid tissues. These secondary lymphoid structures, called gut associated lymphoid tissue (GALT), comprise jejunal and ileal Peyer's patch (PP), mesenteric lymph node (MLN) and the diffuse tissue (Mowat, 2003; Yamamoto et al., 2004). i) The organized lymphoid tissue is defined by the aggregates of different types of cells (LT, LB, DC) clearly separated into distinct zones in PP and MLN. ii) The diffuse lymphoid system represents the *lamina propria* (LP) of the intestinal mucosa infiltrated mainly by naïve lymphocytes, macrophages and DCs. Among lymphocytes, CD8+ T-cells predominate in the epithelium (IEL) and CD4+ T-cells in the villus of *lamina propria* (LPL).

Pig presents some differences comparing to human intestinal lymphoid structures (Hoorweg and Cupedo, 2008) such as a continuous PP present in pig ileum. PP and MLN represent the inductive sites of the intestinal immune response opposed to effector site, the *lamina propria* (Rothkötter et al., 1999). However, there is increasing evidence that in healthy animal, the diffuse tissue in the gut LP has also an important role in immune regulation (Bailey and Haverson, 2006) and that early environmental events can affect its long-term function.

The study of immune system ontogenesis in pre- and post-natal period has to be compared to the components of mucosal immune system in mature adult. The description of the IgA intestinal immune response mechanism in the adult is presented in three parts :

a. **Ag detection and DCs location:** Ag is located in the intestinal lumen and different systems of their detection are present on the intestinal epithelium. i) DCs of PP: In PP, epithelium is not constituted of ciliate enterocyte but specialised M cells are observed (Jang et al., 2004). The luminal gut Ag is captured by M cells (Beier and Gebert, 1998), then transferred to underlying dendritic cells (DCs) of the sub epithelial dome (SED). These DCs convey Ag to T CD4 and B cells of PP follicles resulting in B cells activation which could be either T-dependant (mainly in jejunal PP, MLN as described in the mouse (Macpherson et al., 2000)) or T-independent (ileal PP in the pig (Butler et al., 2002)). ii) Interdigital DCs of epithelium: DCs, outside of PP, are located in the *lamina propria* underlying epithelial cells. DCs can cross enterocytes barrier by disjunction of cells membranes with their dendrites and interact with the luminal content. Thus, exposed to the luminal content, dendrites can

endocytose the antigen, process it and migrate to inductive site (see below 2). iii) DCs of *lamina propria*: Pathogen or antigen can cross the intestinal epithelium between epithelial cells or penetrate through the enterocytes which present luminal antigens with major histocompatibility complex (MHC) class I molecule at their surface. DCs, in *lamina propria*, are therefore in direct contact with MHC-antigen complex and can initiate a cellular T CD8 cytotoxic immune response. In conclusion, different sub-populations of DCs exist and correspond to different location. Nevertheless, because of the nature of the antigen, some DC could be tolerogenic and induce tolerance while other give rise to IgA production (Coombes and Powrie, 2008; Macpherson and Uhr, 2004; Mora et al., 2006; Worbs et al., 2006).

b. **Initiation of IgA immune response:** whatever their location, DCs are the principal antigen presenting cells (APC) that initiate the immune response (Coombes and Powrie, 2008; Johansson and Kelsall, 2005). After antigen recognition, matured DCs process and present Ag to lymphocytes (Mora et al., 2006) of PP and MLN follicles. B lymphocytes are activated after the random V(D)J rearrangement and clonal selection of Ag specific B lymphocytes. Diversification of the repertoire is randomly created by complementary determining region (CDR) 3 length modification via the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) activity. Activated B cells can proceed the class switch recombination (CSR) from IgM to IgA in the presence of IL10 and TGF- β as described in the mouse (Fagarasan and Honjo, 2004; Shikina et al., 2004) and somatic hyper mutation (SHM) to specifically diversify the IgA repertoire (Butler et al., 2006c; Spencer et al., 2009). CSR and SHM are performed by the activating induced cytidine deaminase (AID). In pig, some IgA + lymphocytes are processed in the foetus with precocious TdT activity and class-switch rearrangement (Fig. 2) independently of repertoire diversification.

c. **Dissemination of IgA:** Then, B cells migrate to effector site, LP, where they differentiate into effector plasma cells. The domiciliation of cells homing (Butcher and Picker, 1996; Kunkel and Butcher, 2003) is determined by the interactions between membrane receptors and adrenergic/chemokines. Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1 (MAdCAM-1) is expressed by the endothelial cells of the gut *lamina propria* while CCL25 and CCL28 chemokines are expressed by epithelial cells (Bourges et al., 2004; Bowman et al., 2002; Hieshima et al., 2004). The preferential homing mechanism of T and B cells in the small intestine is governed by the interaction between MAdCAM-1, CCL25 chemokine and their respective receptors integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 expressed by lymphocytes. In large intestine, the homing presents an identical mechanism. The couple chemokine/receptor change to CCL28/CCR10 (Meurens et al., 2006), with possible redundant role as shown in the

mice (Feng et al., 2006). The same interaction mechanism has been shown to be involved in IgA B cells migration in sow mammary gland (Bourges et al., 2008).

d. **IgA secretion:** The last stage of IgA immune response is the secretion of antigen specific IgA. In the pig, gut plasma cells are around the crypts (Bailey et al., 2005a) like in human (Tang et al., 2006). Dimeric IgA are endocytosed *via* polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) present on epithelial cells (Brandtzaeg, 2007, , 2009), resulting in pIgR cleavage. After this processing, IgA present a “secretory piece”. IgA are excreted at apical pole of epithelial cells, in the intestinal lumen. Finally, IgA with specific repertoire bind the antigen which has initiated the immune response and the IgA-Ag complex is eliminated with intestinal peristalsis.

1.3. IgA compartment of the response: Intestinal immune response (IIR) is a humoral and cellular mechanism and this review will only focus on IgA response. Growing evidences indicate that IgA secreted in the intestinal lumen use a high affinity binding system to neutralize microbial toxins and pathogens, and a low affinity binding system to prevent commensal bacteria from breaching the mucosal surface (Macpherson and Uhr, 2004) and avoid the activation of systemic immune response (Sait et al., 2007). IgA may harbour other function like facilitation presentation of antigen (Ag) to immune cells of PP via the IgA-Ag complex (Corthesy, 2007).

1.4. Functions of the commensal flora: Commensal flora plays an important role in the gut physiology and in the homeostasis of the bacteria population. Indeed, microflora maintains its homeostasis by metabolic and spatial competition against pathogens. For example, avirulent *Salmonella enterica* preinoculation in gnotobiotic piglets completely prevent the intestinal invasion by wild type (WT) salmonella enterica F98 (Foster et al., 2003). Moreover, commensal flora could stimulate the host immune system (IS) development as largely described in the mouse (Suzuki and Fagarasan, 2008). In pig as in mouse, epithelial cells, *via* receptors TLRs, produce chemokines in response to bacterial products, leading to antigen non-specifically DC and T cell recruitment (Marodi, 2006; Oswald, 2006).

Here we focused onto intrinsic (*i.e* genetically determined) and extrinsic factors (environment) of the mucosal IgA immune response (IR) in gut of piglets (Fig.1).

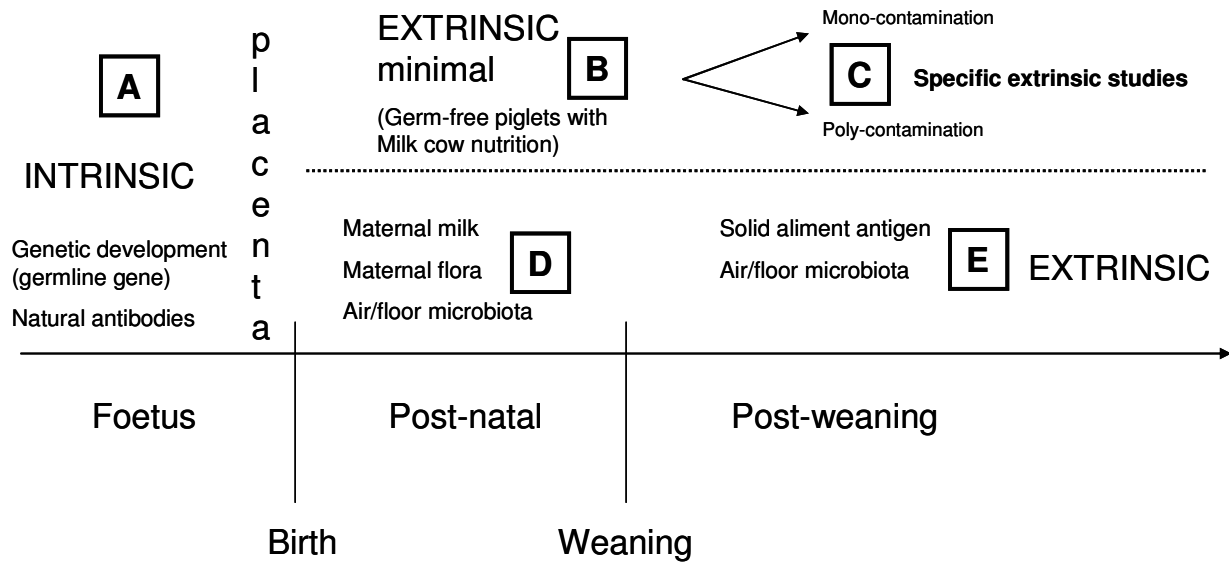


Figure 1: Schematic representation of the intrinsic and extrinsic factors present during gut immune system ontogenesis.

Studies of foetal state enable the analysis of intrinsic factors involved in the GIS development (A). Study of intrinsic factors could be approached at the post-natal state with germ-free animals (B, only cow milk factors could have an effect) and at the opposite, specific extrinsic effects analysis could be performed by bacteria oral contamination (C). After birth, extrinsic factors appeared for the neonate (D) and could evolve after weaning (E).

2. INTRINSIC FACTORS: Development of intestinal immune system in foetus, at birth and in post-natal germ-free piglets

Young animal have innate capacities to eliminate a pathogen but need to develop their cognate gut immune system. This first part will describe the situation and evolution of the gut immune system in foetus (Fig. 1A) and in germ-free piglets (Fig. 1B).

2.1. Development of lymphoid intestinal immune structure

2.1.1 Lymphoid development in foetus and newborn: lymphoid structures established in the foetal age of piglets' spleen, MLN (but not PP) with formation of a few small follicles at day 50 of gestation. Then, primary PP appear at days 60-80 of foetal age (Chapman et al., 1974), intestinal lymphoid follicles appear gradually and their size steadily increase. First IgM containing cells appear at 55 days in the spleen but only around 65 days in the MLN. At birth, foetuses present discrete jejunal PP (jPP) with interspaced T and B follicles. No data are available regarding ileal PP (iPP) presence in foetus until it appears at birth. At 1 day of age, MLN and the two PP were analysed (Solano-Aguilar et al., 2001), showing that the lymphocytes, in the MLN, present a low expression of CD8 and CD21 comparing with more aged MLN tissue but CD25 was highly expressed indicating lymphocytes activation. However, low level of CD25 expression was observed for IEL and LPL ileal lymphocytes in the first day of birth.

2.1.2 Post-natal lymphoid development in germ free piglets: GF are bred in sterile conditions and deprived of colostrums although they receive bovine milk (Fig. 1B). However, no additional post-natal developments appeared in germ-free animals as IEL, for example, conserved a constant number (Rothkotter et al., 1999) close to the baseline expression of CD25 (Solano-Aguilar et al., 2001) in absence of bacteria. In 24 days GF piglets, a total lack of DC (CD163) and T cells (CD2/CD3) was observed in the diffuse lymphoid tissue of villi and crypts of the jejunum (Haverson et al., 2007). The GF piglets have shown a cytokine serum concentration deficiency such as IL-12, TGF- β as compared to suckling piglets (Nguyen et al., 2007), showing a poor immune system development. Germ-free animals fed with sterile milk may present a bias because of the maturation of gut immunity (stimulation of LPL, IEL and sIgA production) by food protein showing the importance of diet composition on gut immune system stimulation (Menezes et al., 2003; Shimoda et al., 1999).

2.2. Development of mucosal B cell repertoire

2.2.1 Pre-immune repertoire in foetus and at birth: In swine, antibody repertoire development has been studied by analysing the CDR3 diversity and estimating V_H gene usage. Some data showed the influence of gut colonization (poly-contamination) in the development of the primary repertoire (Butler et al., 2000a). V_H usage, *ie* the proportion of rearrangement of V_{HA}, V_{HB}, V_{HC} or V_{HE} gene on the total VDJ rearrangement, was quantitatively monitored by differential PCR product hybridization (DPPH). VDJ diversification was analysed, with usage of V_H genes and somatic mutation evaluations, by measuring the hybridization of specific V_H probes. In pig, recent studies on the mucosal lymphoid development focused on the IgM-IgA antibody repertoire. B cells repertoire is polyclonal in the foetus around 50 days, with addition of N/P nucleotide in the CDR3 due to terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) activity during the VDJ rearrangement, while there is no diversity by somatic mutation (Butler et al., 2000b). This indicates that piglet repertoire is diversified very early in immune system development (Fig.2) but unfortunately no study of IgA plasma cells in the gut *lamina propria* has been done. As the polyclonal repertoire is observed in the parotid gland even of post-natal germfree piglets, the phenomenon is thus antigen independent and naturally acquired during foetal development. Nevertheless, recombination possibilities in piglets are very restricted with only one J_H gene, two D_H genes and four principally used V_H genes (Sun et al., 1998a). 80% of the VDJ heavy (H) chains diversity originates from VDJ combination. Compared to human and mice, whose diversity is associated to a lot of V, D and J genes rearrangement (45 V_H, 23 D_H and 6 J_H in human), diversity generation in piglets is potentially poor and relatively more dependant on N addition than in other species (Butler et al., 2009a).

The pre-immune repertoire in the pig differs from the classic representation of repertoire diversification described in human and mouse. CSR occurs early in foetal life, in the absence of environmental Ag, independently of SHM mechanism suggesting CSR is not coupled through activating induced cytidine deaminase (AID, Fig. 2) (Butler et al., 2009b). The resulting innate response skills of neonate will differ too. The polyreactive antibodies contribute to the broad anti-bacterial activity of immune system (Zhou et al., 2007) preventing the microbial pathogens spread in the lumen (Wijburg et al., 2006).

The pentameric IgM isotype represent the main natural antibody and productive plasma cells in mice are derived from B1-cells (Merino and Gruppi, 2006). B1-cells are phenotypically and functionally distinct subset of B cells poorly characterized in pig.

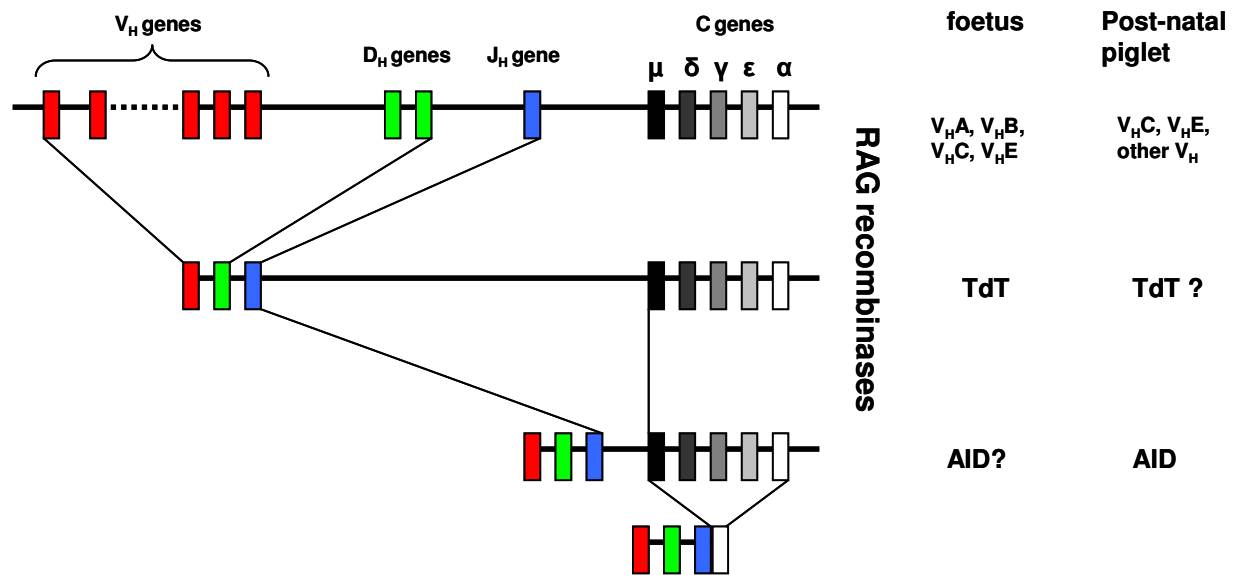


Figure 2: Schematic representation of the VDJ rearrangement during B cells ontogenesis in pre and post natal piglets.

B cells VDJ rearrangements occur in foetus and post-natal piglets. Combinatorial diversity is potentially poor but perhaps compensate by early TdT activity in foetus and AID activity in young piglet. V_H usage change between the 2 stage, this underlines the development of a specific B cells population after antigen stimulation.

RAG: Recombianison Activating Gene; TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase; AID: Activation-Induced Cytidine Deaminase.

Adapted from (Butler et al., 2006b).

Nevertheless, pig present a majority of IgM+ and IgA+ cells weakly diversified at birth. The presence of the IgA class in foetus could be an advantageous for the post-natal development of piglets in compensation of maternal immunity transfer lack through the placenta.

2.2.2 Postnatal repertoire diversity in germ free piglets: Use of germ-free animals as extrinsic minimal model allows the development study of IgA repertoire in absence of environmental factors (fig. 1C). At birth, in order to provide a protection to the newborn, the organism synthesized IgM and IgA independently of any antigen stimulation allowing a broad action to exclude bacteria principally. Two distinct repertoires are described in piglets (McAleer et al., 2005). There is a primary porcine IgA repertoire in thymus independent of colonization which differs from both MLN and blood B cells repertoire. GF piglets presented a poor diversity of Ig repertoire (IgG, IgA, IgM) in MLN and peripheral blood mononuclear cells (McAleer et al., 2005). The MLN Ig repertoire diversified with post-natal aging and bacterial gut colonization by VDJ rearrangement and isotype switch (IgM-IgA and IgM-IgG) unlike thymic B cell repertoire. The authors presented this thymic B cell repertoire as a vestige of the lymphocyte library development which could be correlate to the lymphocyte B1 population described in human and mice (Dono et al., 2003; Merino and Gruppi, 2006) even if differences persist between markers of pig B1 cells with other species (Wilson and Wilkie, 2007). The question is whether or not this repertoire is refined in the effective site to improve the bacterial exclusion. In conclusion, germ-free piglets present a poor post-natal development of their intestinal immune system and the IgA repertoire diversification in gut is poorly stimulated (Butler et al., 2002).

Pre-immune (natural) repertoire is restricted to functional diversity of Ig gene recombination near the germline sequences even if TdT activity seems to be particularly important in the piglet foetus and neonate (Fig.2). These antibodies could be passively acquired by neonate with the colostrum and mother milk (see next chapter of extrinsic factors) or intrinsically produced by the foetus/neonate (see repertoire antibody in foetus).

3. INFLUENCE OF EXTRINSIC FACTORS

As germ-free piglets present no pre-immun IgA repertoire diversification, this review focuse on two main extrinsic factors, microflora (including commensal and pathogen) and mammary

gland secretion factors (colostrum and milk containing Ig and immunomodulatory molecule). That have important influences on the gut development of young animals and particularly on the gut IgA immune response. These extrinsic factors are dependant of the environment (Figure1-B,C,D,E).

3.1. Post-natal GALT development in conventional breeding

3.1.1 Structural development: At birth, the newborn pig presents characteristic seen at the end of gestation like small number of T-cells and APC in the gut. Postnatal development of gut lymphoid structure in the pig is mainly occurring in the first 8 weeks (Bailey et al., 2005a; Bailey et al., 2001; Makala et al., 2001; Vega-Lopez et al., 1995). In this period, several steps have been defined:

- During the first 2 weeks, there is a development of jejunal PP (Makala et al., 2000) follicle containing T cell. CD4+ T-cells appear in the gut LP and APC cells appear with a constant augmentation of MHC II.
- At weeks 2-4, IgM+ B cells are present in crypt areas and their number decrease while the development of IgA pre-immune population occurred principally in an antigen-dependant mechanism manner. T cells continue to proliferate with expression of CD2 (Brown et al., 2006b). CD4 T lymphocyte expansion occurs around 3 weeks of life to the Th dependant immune response with a memory CD4+ T-cells population in gut *lamina propria*. However, experimental data obtained recently, showed a decrease of CD4+ T cells in the MLN (Stepanova et al., 2007). Seric immunoglobulins (IgM, IgA and IgG) concentrations increased illustrating the development of GALT (Vaerman et al., 1997).
- After 6 weeks of life, lymphocyte T CD8 population is activated with memory cells to eliminate infected cells in the gut LP. In crypt areas, IgA+ plasma cells are predominant over IgM+. Double positive CD4+ CD8+ lymphocytes appeared in peripheral nodes, blood and spleen (Stepanova et al., 2007).

Finally, the architecture of both MLN and PP follicles is mature at 8 weeks, *i.e.* response to an intestinal antigen is developed as in the adult with T and B cells activation and IgA production. But quantitative differences such as the number and the size of jPP follicles, the proportion of Ig secreting cells in MLN and PP remain between neonate and adult pig (Bianchi et al., 1999; Solano-Aguilar et al., 2000). Pig present in addition, a continuous iPP without T follicles (artiodactyls); the iPP structures developed particularly in the first four

month of life (Pabst and Rothkotter, 1999) and then decreased in a age-dependant manner until four years.

In comparison with pig, mice present some differences in post-natal development of IgA+ cells. Under normal breeding conditions and until weaning, no IgA+ plasma cells appear in jejunal LP of 20 days old pups (Harris et al., 2006). Piglet development is not on the same time scale but piglets IgA are already present at birth and IgA secreting cells appear around 3 weeks of life.

3.1.2 Primary immune response: As the immune system is naïve, all the starting response will have the primary characteristic. Newborns are in contact with environmental antigens for the first time as the foetus was developed in a sterile environment. As shown above, B cell repertoire development is different between pig and both human and mice. In mice, during the development of the first specific immune response, the generated antibody repertoire is relatively poor. The main isotype present in gut neonate is the natural IgM isotype developed at the foetal stage. It is known that the majority of plasma cells present in neonatal gut pig are IgM+ (Allen, 1977) until 4 weeks of age. With antigen stimulation, the diversification and IgA switch appear to produce more specific antibodies. In contrary, Butler et al suggested that the predominance of IgM+ over IgA+ B cells in the LP of conventionally reared piglets, until weaning, is an antigen selected element of the mucosal immune response and not merely the consequences of an undiversified primary immune response that, later, switches to IgA (Butler et al., 2000a). Antigen-specific IgA seems to be produced by B2 cells (Thurnheer et al., 2003) in intestine of mice. B2 cells may present the AID activity and the first somatic mutation appeared. Nevertheless, this phenomenon is described in mice peritoneal cavity for a B1b cell sub-population (Kaminski and Stavnezer, 2006; Roy et al., 2009). The localisation and the mechanism differences between B1 and B2 cells in the pig remain unclear. However the presence of foetal IgA+ cells underlines a second possible mechanism of primary response development. The generation of immune repertoire could be initiated directly from IgA+ cells, simply by the proliferation and/or SHM mechanisms. Consequently, molecular class switch mechanism and IgA+ cells proliferation in parallel explain the IgA+ cells predominance after 3 weeks in piglets. All these data showed that the immune system is able to shunt B cell development and TdT activity, perhaps with a gain of time, and with secondary response characteristic (IgA predominant, SHM).

3.1.3 Secondary immune response: Installation of the secondary response appears when the antigen is recognized for the second time. Antibodies produced in mucosal tissue are mainly IgA resulting from the IgM to IgA switch. Secondary response corresponds to a second repertoire development.

The two-stage development of the repertoire is seen for the heavy chain V-D-J rearrangement (Wilson et al., 2007) and SHM on the CDR are accumulating on B cells of MLN and PP follicles. These SHM events lead to a new interaction possibility with the antigen and lymphocytes with good B-cells receptor (BCR) affinity are positively selected and the repertoire diversity is enriched as well. Finally, the second and further contacts with antigen rise up the diversity of BCR expressed on the lymphocyte and participate to a better elimination of the antigen. This mechanism would not differ between mammals' species.

The process of Ig diversification can be influenced particularly by two factors, the intestinal microbial colonization and the food, that will be developed later in the review.

3.2. *Response to dietary protein and oral tolerance*

There are poor data regarding oral tolerance in pig, but the studies performed on mice as model will allow us to extrapolate the mechanism in the pig.

After birth, neonates' piglets are immunologically naive, even against oral antigen knowing that the *in utero* environment was not antigenic. Thus, the immune system has to develop a tolerance against food antigen (Figure1-B/C). The oral tolerance is an active mechanism which controls immune response by suppression or inhibition of T cells subpopulation (systemic tolerance) and by stimulation of B cells subpopulation for IgA synthesis and gut homeostasis (Mowat, 2003). This regulatory mechanism prevents allergic processes as inflammatory bowel diseases. The basis of oral tolerance relies on gut DCs and their interaction with lymphocytes present in the MLN (Mowat, 2003). At birth, pig exposure to oral OVA antigen presented, after systemic challenge, a reduction of anti-OVA IgG production and MLN cells proliferation (Haverson et al., 2009).

3.2.1 Cellular mechanism: The migration of DC from gut (PP/LP) to MLN is essential for oral tolerance induction (Worbs et al., 2006) as shown in the study consecutively to tests in lymphadenectomy and CCR7-deficient mice models. The obtained results showed that the transport of DCs via afferent MLN lymph and the DCs "homing" via CCR7, are very

important to induce oral tolerance. Very recently, the coculture of mice CD4 T cells with DC cells led to the Foxp3+ Treg generation (Sun et al., 2007).

3.2.2 Cytokines, vitamins: There is an increasing interest in the study of retinoic acid (RA) as an agent of oral tolerance induction (von Boehmer, 2007) but most data were obtained in the mouse. RA is a common regulation factor of pro and anti-inflammatory immunity (Mucida et al., 2007). With TGF- β , RA induces the T CD4+ conversion to Treg cells whereas IL-6 induces the T CD4 to differentiate into pro-inflammatory IL-17 producing cells (T_H17). Other vitamin such as folic acid (vitamin B), seems to play important role in Treg homeostasis via Folate Receptor 4 in the mice (Yamaguchi et al., 2007). This result opens the search about the development of complementary aliment.

3.2.3 Intestinal Epithelial Cells: These cells have an additional function in food tolerance for neonates. In mice, intestinal epithelial cells (IEC) acquired a LPS tolerance via TLR4 after activation at birth. This absence of LPS responsiveness is due to a down-regulation of TLR4 signalisation (Lotz et al., 2006). This mechanism permits a stable microbial colonization in the absence of pathogen signal (toxins, inflammation). Epithelial cells, in contact with lumen bacteria, can prime DC in the LP via their TLR. The immunomodulation occurs *via* the TLR to produce TGF, Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) and induces tolerogenic DC in a transwell model (Zeuthen et al., 2008).

The development of oral tolerance is reinforced by both gut flora (Bailey and Haverson, 2006) and milk factors. A study performed with lactating mice showed that breast milk induced antigens transfer and specific induction of oral tolerance (Verhasselt et al., 2008).

3.3. Gut flora influence onto Gut Immune System

Vertebrates develop a large repertoire with lymphocyte population specific to non pathogen or pathogen micro-organisms. These micro-organisms could be involved in the expansion and diversification of B lymphocytes (Lanning et al., 2005). In pre-suckling piglets, TLR2 and TLR9 are expressed by epithelial cells of the immature GALT system providing a defence to the newborn (Tohno et al., 2006) and the possibility to interact with bacteria. Post-natal gut immune system development depends of the intestinal flora as shown in the mouse (Kelly et al., 2007; Suzuki and Fagarasan, 2008). In order to study the role of commensal bacteria,

germ free pigs were used (Butler et al., 2009a; Butler and Sinkora, 2007), and bred with a selected flora (gnotobiotic animals). All the data are compared with conventional breeding animals (Fig. 1C).

3.3.1 Gnotobiotic flora: To analyse intestinal flora influence on gut, *Escherichia coli* (*E. coli*, gram-) and *Lactobacillus fermentum* (gram+) are usually used in comparison to the controls (GF animals).

A study with monoassociated non pathogen *E. coli* (G58-1) or enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC, 933D) combined with an immunization protocol (T-dependant or T-independent antigens intraperitoneal injection) of newborn piglets showed that colonization was required to produce specific serum antibody (IgG, IgA and IgM) against T-dependant and T-independent antigens and colonizing bacteria (Butler et al., 2002). Surprisingly, secondary responses, after a boost, were restricted to piglets immunized with T-dependant antigen. IPP follicles were expanded comparing to GF piglets independently of bacteria but antigen dependant systemic response against bacteria was only observed in EHEC, suggesting the importance of T-dependant antigen translocation to the peritoneum.

Colonisation of GF piglets in the 4 first days (analysed at 24 days) by commensal strains (O83 and O86) of *E. coli* (Haverson et al., 2007) led to higher recruitment of DC and T cells to *lamina propria* compared to GF controls which do not have any DC. Intestinal immune development is dependent on colonisation with probably TLR stimulation, the recruitment of lymphocytes would be illustrated by specific cytokine expression modification. In pig, inoculation of GF by a non pathogenic *E. coli* was studied by analysing the expression of two epithelial chemokines CCL25, CCL28 and their respective receptors (Meurens et al., 2007a). CCL25/CCL28 and CCR9/CCR10 mRNA are more expressed in *E. coli* group compared to the GF group. This could explain the higher migration of B lymphocytes in intestinal epithelium induced by commensal bacteria.

The inoculations with enteric pathogens would induce different gut modification. *In vitro* test showed an augmentation of inflammation cytokine expression (Skjolaas et al., 2006), the contact of *Salmonella enteritica* with epithelial cells can triggered expression of IL-8 and CCL20, thus neutrophil and DC cells recruitment.

3.3.2 Complex flora studies: Another approach is to use poly-contamination of gnotobiotic piglets as exclusion flora. A defined exclusion flora (10 different bacteria species like *enterococcus*, *clostridium* and *bacteroides*) was used to colonize GF piglets after birth

(Butler et al., 2000a). Colonized piglets present higher serum IgM concentration at 2 weeks of age. IgA and IgG serum concentrations steadily increase between 2 and 6 weeks unlike GF piglets that presented very low serum Ig concentrations.

Other study was performed using an inoculation of unknown complex flora (Che et al., 2009). Flora species origin influence was studied comparing human fecal versus porcine fecal suspension inoculation to GF piglets. The results showed a better intestinal immune development of piglets inoculated with human flora associated (HFA) than with pig flora. HFA piglets presented more IgA+ and CD4+ lymphocytes in the jejunum. The importance of flora composition was demonstrated but specific bacteria involved could not be determined.

3.3.3 Conventional and specific pathogens free (SPF) breeding: At birth and during classical or restricted breeding conditions such as SPF animals, flora colonizes the young mammals and will evolve with time and with the composition of the diet. In this context, the weaning is a crucial period knowing that the diet changes induces the alteration of bacteria flora composition. The bacterial flora population can be studied using molecular biology tools (Konstantinov et al., 2004; Konstantinov et al., 2006; Mackie et al., 1999). Analysis of 16S ribosomal RNA expression provided information regarding the composition of gut flora. It has been shown that a shift occurred following the weaning and along the life of the animal. In human for example, after weaning, there is the emergence of *Clostridia* species and *E. coli* (Palmer et al., 2007). In piglets (Konstantinov et al., 2006; Pieper et al., 2008) the predominant population after birth are the *Lactobacillus* in majority with *E. coli*, *Shigella flexneri* presence. Following weaning, Lactobacilli present lower level in the ileum and emergence of clostridia and *E. coli* occurred in the entire gut compartments.

The flora have a positive effect on GALT stimulation (Cebra, 1999) and the interactions between gut flora and intestinal mucosa are important for epithelium development and integrity (Schiffrin and Blum, 2002). Gut epithelial TGF- β induced by immune-regulatory non pathogenic bacteria protects the intestinal barrier by activation of cell division. Interaction between epithelial cells and bacteria via TLRs results in the secretion of cytokine A proliferation-inducing ligand (APRIL) (Macpherson and McCoy, 2007), which is required for IgA T-independent switch (Castigli et al., 2004).

Conventional pigs were used for the development of probiotics, because of the exclusion flora function and to validate biologic effects in classical conditions. In pig, *Escherichia coli* have been tested as probiotic to stimulate gut immunity (Vijtiuk et al., 2002) as F4- non ETEC strain primed T-lymphocytes from PP and MLN. *Enterococcus faecium* strain, was also

studied after ingestion by sows and piglets (Scharek et al., 2005) and no influence was seen on immune response as Ig levels in sera and feces did not change. But a lower number of cytotoxic T-cells were observed in piglet jejunum. Moreover no modification of flora was observed, showing the difficult control of an inoculation with pre-established flora. This is an important point which has to be considered for the development of probiotics. Induction of anti-commensal IgA flora could be T-cell independent (Macpherson et al., 2000) since mice with deficient TCR present the same *E. cloacae* specific IgA profile than wild-type mice.

Several data provided in the literature showed that gut flora is important for the integrity and development of intestinal lymphoid structure and for natural and acquired response as well. Moreover, the studies performed on germ free piglets have demonstrated the importance of bacteria in the diversification of IgA repertoire (Butler et al., 2000a). Similar results were obtained in the germ-free rabbit appendix (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Rhee et al., 2004). Noteworthy, the bacteria represent the principal source of immunogenic molecule comparing to food antigens (Wold et al., 1989). But orally administered food antigens (hen egg lysozyme) induced IgA, IgM and IgG response with IgA and IgM (but not IgG) polyreactive antibodies cross-reacting with luminal antigens like *E. coli* (Shimoda et al., 1999). Probably, mammary secretion protein could have the same function.

3.4 Mammary secretion (colostrum and milk) influence onto GIS

In the first hours of life, important amounts of IgG cross the intestinal barrier *via* colostrum permitting a systemic protection of piglets. 24-48 hours *post-partum*, colostrum is replaced with milk very rich in IgA.

Developmental factors can be provided by the nutritional bowl such as TGF- β which is present in the maternal secretions (Salmon et al., 2009b). Studies on milk fractions have show an up-regulation of the first response to different antigens as well as second response (Garofalo and Goldman, 1998; Goldman, 2000; Shimamura et al., 2003). To study colostrum and milk factors influence, several KO mice were used with deficiencies in lymphocytes or in IgG receptor FcRn.

3.4.1 Influence of non-antigen specific factors: these factors could be divided into two classes. i) A family of cytokines that participates positively to the immune response such

as IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β and stimulate the lymphocytes development. In pig, peak cytokines concentration in suckling piglet serum occurred at post-partum days 1-2 (Nguyen et al., 2007). IL-4 and TGF- β transferred by mother colostrum have a potential role in Th2-biased IgA response, with different effects due to TGF- β concentrations (Nguyen et al., 2007). Deficiency in TGF- β signalisation (smad2^{-/-} mice) impaired class-switch and homeostasis of B cells (Klein et al., 2006). Bacterial fermented milk supernatant (devoid of cells) could promote non-specific gut mucosal immunity in mouse (Vinderola et al., 2007) with a large variety of cytokines (IL-2, IL-10, TNF, growth factors and chemokines) as bioactive factors (Goldman, 2000; Salmon et al., 2009b). ii) The milk contains also defensins that act directly on the pathogen. This innate response is enhanced by the capacity of milk to up-modulate TLR-mediated responses via TLR4 signalisation, thus influencing neonatal microbial recognition (LeBouder et al., 2006). Recently, the protease activity of sIgA (present in human milk) was shown to activate PAR-2 receptors gene and to induce β -defensin-2 secretion (Barrera et al., 2009). This result confirmed the tight relation between breastfeeding (passive immunity) and innate immunity.

3.4.2 Influence of antibodies: The entero-mammary link has been well described (Salmon et al., 2009b). Mother transmits, through the milk, immune factors specific to the environmental microbiota including various antigens and pathogens, present in the mother gut lumen, allowing the neonates to be passively protected. This enteromammary link is due to the migration of gut lymphocytes to the mammary gland using specific homing receptors (Macpherson et al., 2008). Plasma cells produce IgA specific to the gut antigen related either to microbes or alimentation (Rumbo et al., 1998). After their secretion in the milk *via* epithelial cells polymeric receptor, pIgR, dimeric IgA protect the neonate intestine after suckling through so called the passive immunity. The milk lacking Ig does not protect the neonates against the microbiota. Several data have been reported regarding milk antibodies influence:

- A study using Rag-2^{-/-} mice (Shimamura et al., 2003) has shown, by absence of immunoglobulin in the milk, that neonates (Rag-2^{+/-}) suckling these mice showed lower concentrations of serum antibodies than neonates suckling wild-type (WT) mice. Noteworthy, in this model, milk is deficient in antibodies but probably in lymphocytes T and B factors too like the cytokines.
- However, milk antibodies were also involved in delaying the development of the neonate immune response. This observation has been originally described with a

$J_H^{-/-}$ mice model. Pups receiving a normal milk from $J_H^{+/+}$ mice didn't present IgA secreting plasmocytes in the ileum at 20 days of age unlike pups nursed with $J_H^{-/-}$ mother whose milk is lacked of IgA (Harris et al., 2006). In these $J_H^{+/+}$ or $J_H^{+/-}$ pups, IgA+ plasmocytes with natural repertoire appeared earlier. IgA complex the bacteria to avoid their translocation through gut mucosae; the gut immune system is consequently not stimulated and did not present IgA secreting cells.

- This result was also previously observed in scid mice model (Kramer and Cebra, 1995), using the process of litters swapping between WT and scid/scid mothers (absence of maternal antibodies). Pups gut germinal centers (PP and MLN) were more developed with an early appearance in PP and MLN of natural IgA in scid/+ pups born from scid or WT mice and nursed by scid/scid mice. These results showed the importance of post-natal versus pre-natal Ig transfer in the mice model and confirm the milk IgA inhibition on pups' intrinsic IgA plasma cells development.

However, an other experience was performed using conventional ultra-early weaned piglets and different results were obtained (Helm et al., 2007). The casein-based diet reduced B lymphocyte development of weaned piglets in comparison to suckling piglets, underlining influence of flora, milk and diet composition.

3.4.3 Weaning strategy: The published data using a mice model (Harris et al., 2006), (Shimamura et al., 2003) have shown that the mechanism of IgG translocation through intestinal mucosa could be performed in two directions (Ig translocation and retrotransport *via* FcRn). FcRn function is less known in piglets but this observation allowed to develop hypothesis as follow for piglet gut immune response:

a. **The mother primo-infection:** when the mother is naïve for a pathogen, there is no immune memory response. It is worth mentioning that milk could present natural antibodies with efficient protection (Bouhlal et al., 2005). However, the absence of natural antibodies protection will compel the neonate to develop its own immune response. The quality of this response depends on the maturation level of the neonate IS. Weaning represents a critical event in this process and when the same breeding is infected (around day 21 for example), the piglets weaned at different ages could present very different course face to the infection. i) In the case of suckling piglets, the passive lactogenic protection is essential for the piglet health knowing that if pathogenic bacteria are not targeted by the milk IgA antibodies, suckling piglets have at one's disposal milk factors to develop their immune response around days 21-

28. ii) Regarding early-weaned piglets, the hypothesis is that weaning would have already boosted the intestinal immune system by bacteria translocation or interaction with epithelium, permitting a better response than in the first case *ie* suckling piglets (Orgeur et al., 2001). If early weaning results in an early maturation of the IS, this strategy can be considered as beneficial since the response against the pathogen would be better. The question is to know if maturation of GALT by weaning would be qualitative or quantitative.

b. **Immunised mother (specific antibody in milk):** IgA in milk are specific to the pathogen encountered by the sow before *partum*. We considered that all antigens are neutralized. Our hypothesis regarding piglets gut immune response is when both the mother and the neonates are infected, the piglets are protected by the mother milk but they will not develop specific plasma cells. This could be considered as a beneficial short term delay but dangerous at the time of weaning when new infections can occur.

However, three mechanisms have been described showing the importance of milk immunity.

i) The retrotransport mechanism shown in mouse model (Harris) will allow to the mother IgG present in the blood to be retransported to the newborn gut lumen during one or two weeks and may be a source of gut protection after weaning. ii) According to our hypothesis, antibodies could delay neonate's gut immunity. In opposition, in mouse, maternal antibodies specific to the vesicular stomatitis virus promote the future specific B cell repertoire development of pups (Fink et al., 2008) showing the long-term benefit of breastfeeding. iii) Third possibility is the cellular immune transfer demonstrated for a long time but always controversial (Goldman and Goldblum, 1997). Recent publications, using vaccinal strategy (Bandrick et al., 2008; Reber et al., 2008a, 2008b), showed a functional transfer of specific maternal lymphocytes to the neonates immune system. This shows the importance of lactation but underlines the problematic of adoptive transfer: are mother milk lymphocytes accepted by adoptive newborn? If yes, are these cells effective? Probably not, because of the leucocyte antigen histocompatibility.

These hypothesis underline the consequences of early weaning and at least the interest to diversify the diet of neonates in the first weeks of life by suckling and food complement (Lalles et al., 2007; Menezes et al., 2003).

4. CONCLUSION

The aim of this review was to describe in detail the establishment of the mucosal immunity in the young with a special attention to the environmental influence. The piglet was chosen as principal description model. One important aspect was the influence of extrinsic factors like commensal flora and milk. These two factors could not be separated because of the link between flora colonization and nutrition.

Classical pig weaning (3-4 weeks) would modify behaviour, physiology and immunity as well. Post-weaning perturbations and their limitations are an other important point for pig breeding (Berkeveld et al., 2009). In this review, among extrinsic factors, we have discussed the influence of delaying weaning, ie increasing or decreasing duration of passive protection by maternal colostrum/milk onto the neonatal gut IgA immune response. Ultra early weaning at seven days is a solution for surnumerary piglets, but perturbations have to be well documented as weaning has important consequences on the gut immunology (Pie et al., 2004; Wang et al., 2008) and tractus integrity (Brown et al., 2006a; Le Gall et al., 2009).

5. Objectifs de la thèse

Le but de mon travail de thèse était d'explorer l'influence qualitative et quantitative de l'allaitement sur la mise en route de la réponse immunitaire, principalement IgA, de la muqueuse intestinale du porcelet face à la colonisation bactérienne et autres antigènes alimentaires. Cette étude se décomposait en 4 étapes :

- 1) Dans un premier temps nous voulions comparer les circuits de migrations des sites inducteurs aux sites effecteurs à différents moments du sevrage par la révélation des récepteurs de domiciliations (adresses et chimiokines) en cytométrie de flux.
- 2) Puis nous avons prévu d'isoler du lait maternel les facteurs de maturation et de recrutement des cellules lymphoïdes.
- 3) Nous voulions ensuite juger de la maturité des cellules lymphoïdes (DC, LT et LB) par l'expression des molécules de classe II et de costimulation (cytométrie de flux) et par un test fonctionnel d'induction *in vitro* de la réponse IgA.
- 4) Enfin la dernière partie était l'évaluation du système immunitaire *in vivo* par l'étude de la réponse immune IgA globale puis spécifique d'un antigène et par l'étude de l'étendue du répertoire des lymphocytes B.

Ces objectifs ont évidemment évolué durant la thèse en fonction des résultats et des difficultés techniques qui sont apparues. Ces différents points seront détaillés dans ce rapport de thèse. Les problèmes rencontrés en cytométrie de flux m'ont conduit à me focaliser sur la quatrième partie de ce projet.

Afin de mieux comprendre l'ontogenèse de la réponse immunitaire intestinale en fonction du sevrage, nous avons donc privilégié les expérimentations *in vivo* pendant cette thèse. L'hypothèse de travail était l'existence d'un déficit dans la production d'IgA en fonction de la date de sevrage. Ce déficit peut trouver son origine dans les sites inducteurs ou les sites effecteurs. Dans les sites inducteurs, une moindre stimulation des précurseurs de plasmocytes à IgA pourrait être due soit à un déficit du répertoire soit à un déficit en facteur de maturation de la réponse IgA.

1. Dans un premier temps, le travail bibliographique nous a conduit à analyser, au niveau transcriptomique, les deux types de plaques de Peyer présentes chez le porc (article 1). Les PP ont potentiellement un rôle différent en fonction de la nature de l'antigène, la PP iléale étant supposée présider au développement du répertoire IgA.

2. Nous avons dans un second temps identifié les conséquences d'un sevrage ultra précoce sur le système immunitaire intestinal du porcelet (article 2). Le travail a été accentué sur un site inducteur de la réponse immunitaire intestinale, le MLN. Nous avons analysé par biologie moléculaire les cytokines exprimées ainsi que l'étendue du répertoire des lymphocytes B. Le principal déficit d'un porcelet sevré précocement a ensuite été identifié par analyses sériques des Ig.

3. Ces résultats nous ont conduits à deux autres expérimentations. La flore ayant une influence sur l'ontogenèse de la réponse immunitaire intestinale, une troisième partie de ce travail de thèse s'intéresse à l'influence du sevrage ultra précoce sur la composition de la flore bactérienne de l'intestin. Enfin, les derniers résultats présentent l'influence de la date de sevrage dans le contexte d'une immunisation. La réponse immunitaire intestinale spécifique d'un antigène bactérien a ainsi pu être étudiée.

Deuxième partie :
Résultats - Discussions

1. Répertoire IgA et profil transcriptomique des PP à J28 chez le porcelet allaité

1.1. Introduction

Le porc présente des plaques de Peyer jéjunales comme tous les mammifères mais aussi une plaque de Peyer iléale, particularité des artiodactyles. Avant d'étudier l'influence du lait maternel, il nous est apparu important de bien connaître les structures en présence et leur rôle potentiel. Nous avons donc analysé les tissus des porcelets en condition d'élevage normale, sous la mère. Le suivi des porcelets se faisant sur les 4 premières semaines, les tissus analysés ont été prélevés à 28 jours. Le but est de connaître les caractéristiques de chaque type de PP. Les plaques de Peyer favorisent le développement de la réponse immunitaire intestinale par leur structure. En effet, les centres germinatifs (GC) permettent de faire interagir de manière privilégiée les cellules dendritiques, porteuses de l'antigène, avec les cellules T helper pour finalement activer les cellules B. Les PP sont de ce fait les zones d'initiation privilégiées de la réponse immunitaire intestinale ; le mécanisme d'initiation, par interaction cellulaire, sélectionne le récepteur des lymphocytes B (BCR) et met en jeu de nombreuses cytokines (Weinstein and Cebra, 1991).

Article 1

- Article publié dans la revue Developmental and Comparative Immunology -

- B.Levast et al. 34 (2010)102-106 -

Differences in transcriptomic profile and IgA repertoire between jejunal and ileal Peyer's patches

Benoît Levast¹, Michèle De Monte², Sandrine Melo¹, Claire Chevaleyre¹, Mustapha Berri¹, Henri Salmon¹, François Meurens^{1*}

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, 37380, Nouzilly, France.

² Unité INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires », IFR 135, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, Tours, France.

*Corresponding author: Email: meurens@tours.inra.fr. Phone: +33-247427865; Fax: +33247427779.

Short Running Title: Piglet Peyer's patches transcriptomic profile

Summary

In many species such as sheep and pig, there are two types of Peyer's patch (PP): Several discrete patches in the jejunum and a long and continuous patch in the ileum. Most of the immunoglobulin A in the gut is generated by B-cells in the germinal centers of PP. Moreover, swine like ovine ileal PP might be important for antigen independent B-cell repertoire diversification. In the current report we analyzed some VDJ rearrangements to assess immunoglobulin repertoire diversity in jejunal and ileal patches from weaned piglets. Then, we examined, by quantitative real-time PCR, the expression of 36 transcripts of antimicrobial peptides, chemokines, cytokines, toll-like receptors and transcription factors from both PP and we highlighted the differences by a principal component analysis. Ileal PP was characterized by a higher expression of CCL28, IL5, IL10, TLR2 and TLR4 mRNA while jejunal PP showed higher expression of antimicrobial peptides, CCL25, FOXP3, IL4, T-Bet, TSLP and SOCS2 mRNA. The IgA and IgM repertoires were more diverse in ileal than in jejunal piglet patches. These results could be related to the rarefaction of interfollicular T-cell zone and the presence in ileal *versus* jejunal lumen of a more diversified microflora. Our findings shed a light on the study of the functional differences between both structures.

Keywords

Piglets, Peyer's patches, cytokines, Ig repertoire

1. Introduction

Peyer's patches (PP) are diffuse lymphoid tissues which have been described for the first time by Johann Conrad Peyer in the 17th century in Schaffhausen (Switzerland) in human, goat, pig, sheep, horse and cat (Peyer, 1677). Peyer's patches, which are gut-associated lymphoid tissues (GALT), play a critical role in host defense and oral tolerance (Artis, 2008; Mowat, 2003; Mowat and Viney, 1997). These lymphoid structures contain lymphocytes (defined B and T lymphocyte areas), dendritic cells, macrophages, villous epithelium and specialized follicle-associated epithelium. The PP lack an overlying brush border, mucoid glycocalyx and hydrolytic enzymes typical of absorptive gut epithelium. In many species, such as sheep and pig, there are two types of PP found in two separate locations: Several discrete patches in the jejunum and a long and continuous patch in the ileum just above the ileo-caecal junction (Binns and Licence, 1985; Chu and Liu, 1984; Rothkotter, 2009). These patches show obvious structural and functional differences in pigs (Barman et al., 1997; Binns and Licence, 1985; Chu and Liu, 1984). For example, more T-

cells are observed in the jejunal than in the ileal PP as interfollicular zones are a drastically less developed in these patches (Barman et al., 1997). Ileal PP which are already detectable during pregnancy and at birth can produce all the three major isotypes although IgM predominates prior to exposure to colonizing microflora (Butler et al., 2006a; Butler et al., 2002).

To be a relevant model for human diseases, animal species must simulate human condition in both disease and health. Over the years, pig has been one of the most frequently used model resembling humans in almost all analyzed aspects. These mammals are similar in size, feeding patterns, immune system, skin structure, renal, cardiac and pulmonary physiology and anatomy to man (Pastoret, 1998; Tumbleson, 1996). Moreover, there is a clear need for translational immunological research applying the knowledge acquired from research in mouse to both human and veterinary research (Summerfield and McCullough, 2009). A better understanding of porcine PP clearly contributes to this requirement.

The production and the secretion of immunoglobulin A (IgA) by the host is critical for the maintenance and the control of a huge community of commensal micro-organisms in the intestinal lumen with a minimal penetration of the epithelium (Macpherson, 2006; Tsuji et al., 2009). Most of the IgA synthesis in the intestine requires germinal center formation in PP (T-cell-dependent). Peyer's patches and particularly jejunal PP consist of collections of large B-cell follicles and intervening T-cell areas (Mowat, 2003). Immunoglobulin diversification is essential for the immune system to establish protective humoral response. B-cells diversify their antibody repertoire through three main genetic alterations that take place in two distinct phases of B-cell development (Cerutti, 2008; Schlissel, 2003). In the antigen-independent phase, B-cell precursors generate antigen recognition diversity by assembling the exons that encode immunoglobulin heavy (H) and light (L) chain variable regions from individual variable (V), diversity (D) and joining (J) gene segments through V(D)J gene recombination (Cerutti, 2008; Schlissel, 2003). Productive assembly of V_HDJ_H and V_LJ_L exons allows the expression of IgH and IgL chains as cell-surface IgM by newly generated B-cells (Cerutti, 2008; Schlissel, 2003). After other differentiation and expression of IgD or swine equivalent, B cells from the bone marrow migrate to secondary lymphoid tissues, where they initiate the antigen-dependent phase (Cerutti, 2008; Schlissel, 2003). In the presence of antigen, mature B-cells diversify their antibody repertoire through somatic hypermutation and class switching (Cerutti, 2008; Kaminski and Stavnezer, 2006; Odegard and Schatz, 2006). These events take place in the germinal centers of secondary lymphoid follicles (Cerutti, 2008; MacLennan, 1994). The process of somatic hypermutation introduces mutations at high rates into V_HDJ_H

and V_LJ_L exons (Cerutti, 2008; Odegard and Schatz, 2006). Class switching substitutes the IgH constant region μ (C _{μ}) and C _{δ} genes encoding primary IgM and IgD isotypes with C _{γ} , C _{α} or C _{ϵ} genes through a process known as class-switch recombination (Cerutti, 2008; Chaudhuri and Alt, 2004). This molecular event generates secondary IgG, IgA and IgE isotypes with the same antigen specificity as IgM and IgD. IgA class switching can be T-cell-dependent in germinal centers as PP or T-cell-independent mainly in the *lamina propria*. In the current report, we decided to analyze some VDJ rearrangements to assess B-cell repertoire diversity in both porcine patches. Then, we examined the expression of various transcripts of antimicrobial peptides, chemokines, cytokines and toll-like receptors from porcine isolated ileal and jejunal PP and identified two distinct expression patterns. The study of the mRNA expression of these molecules in both patches and the immunoglobulin repertoire analysis can facilitate for a better understanding of the difference between both structures in mammals. In pigs, few transcriptomic studies have been carried out in PP (Dvorak et al., 2005; Machado et al., 2005). However, to our knowledge, our report is the first to compare transcriptomic profiles and immunoglobulin repertoire between jejunal and ileal PP and to use in that context a principal component analysis (PCA). This approach involves a mathematical procedure that transforms a number of potentially correlated variables into a smaller number of uncorrelated variables named principal components. The first principal component accounts for as much of the variability in the data as possible and each succeeding component accounts for as much of the remaining variability as possible.

Two distinct expression patterns have been identified. Ileal PP were characterized by a higher expression of CC Chemokine Ligand 28 (CCL28), Interleukin 5 (IL5), IL10, Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 mRNA while jejunal PP showed higher expression of antimicrobial peptides, CCL25, FOXP3, IL4, T-Bet, Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) and Suppressor Of Cytokine Signaling 2 (SOCS2) mRNA. The immunoglobulin repertoire analysis showed a more diversified IgA repertoire using CDR3 spectratyping in the ileal than in the jejunal patches.

2. Material and methods

2.1. Animals and tissues collection

Weaned piglets (n=7) aged of 32 days (4 days after weaning at day 28th) were used for the experiments. The pigs were healthy and raised in the experimental unit of INRA (Nouzilly, France). Piglets were euthanized and samples (jejunal and ileal Peyer's patches) were collected. Then, the tissues were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored

at -80°C until use. Animals were cared for in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use committee at INRA (France).

2.2. Messenger RNA preparation and reverse transcription assay

Peyer's patches were cut open in three (3 x 3) mm pieces and laid flat. Total RNA was extracted from the tissue using Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with ceramic beads (Bertin technologies, St Quentin en Yvelines, France). Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. Then, RNA samples were treated with DNase I Amp Grade (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (1 U/μg of RNA). The absence of genomic DNA contamination was verified by using prepared RNA as template for quantitative real-time PCR (qPCR, see below). RNA was quantified by determining optical density at 260 nm (OD₂₆₀) and the OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio was calculated to assess RNA purity. RNA quality was further assessed by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer). To generate the cDNA, 2 μg of RNA sample were incubated in a final volume of 20 μl containing 2 μl dNTP (0.25 mM final each), 1.3 μl oligo dT (133 pmoles/μl), 0.8 μl MuMLV reverse transcriptase (25 U/μl) (Eurogentec, Liège, Belgium), 4 μl 5X buffer MuMLV and 1.9 μl of ultra-pure water (Gibco, Paisley, Scotland). The reaction was allowed to proceed for 90 min at 37°C and then heat-inactivated at 93°C for 5 min. The generated cDNA was stored at -80°C until use.

2.4. Messenger RNA expression analysis using real-time PCR

Many mRNA sequences have already been identified in pig (Table 1). When genes were not described in this species, tBLASTn searches of the GenBank and PEDEblast ESTs databases (Uenishi et al., 2007; Uenishi et al., 2004), using known human and murine amino acid sequences, have been performed. This methodology enables the identification of porcine expressed sequence tags (EST) corresponding to human and murine sequences (Table 1). Then, primers (Table 1) were designed using Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, NC, U.S.A.) and were purchased from Eurogentec company (Liège, Belgium).

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using cDNA synthesized as previously described (Meurens et al., 2007b). Diluted cDNA (10X) was combined with both primer/probe sets and IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The qPCR conditions were 98°C for 30 s, followed by

37 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/elongation for 30 s (annealing temperature, Table 1). Real time assays were run on a Bio-Rad Chromo 4 thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The specificity of the qPCR reactions was assessed by analyzing the melting curves of the products and size verification of the amplicons. To minimize sample variation, we used identical number of cells and high quality RNA. Samples were normalized internally using simultaneously the average cycle threshold (C_q) of Hypoxanthine PhosphoRibosyl-Transferase 1 (HPRT-1) (Nygard et al., 2007), Ribosomal Protein L 19 (RPL-19) (Meurens et al., 2009b) and Tata Box Binding Protein 1 (TBP-1) (Nygard et al., 2007) as references in each sample. These genes were selected as the reference genes because of their stability between samples (geNorm) (Vandesompele et al., 2002). A standard curve was generated using diluted cDNA. The correlation coefficients of the standard curves were >0.995 and the concentrations of the test samples were calculated from the standard curves, according to the formula $y = -M * C_q + B$, where M is the slope of the curve, C_q the point during the exponential phase of amplification in which the fluorescent signal is first recorded as being statistically significant above background and B the y-axis intercept. Only C_q values <40 were used for calculation of the qPCR efficiency from the given slope according to the equation: $\text{qPCR efficiency} = (10^{[-1/M]} - 1) \times 100$. All qPCRs displayed efficiency between 90% and 110%. Expression data are expressed as relative values after Genex macro analysis (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) (Vandesompele et al., 2002).

2.5. B-cell repertoire diversification analysis using CDR3 spectratyping

The CDR3 length is analyzed by nested PCR. The cDNA is produced as described before (Meurens et al., 2007c) and analyzed with specific primers (Butler et al., 2001; Sun et al., 1998a). The first PCR reaction targets the CDR1 (5' external, located before CDR3) V_H region (FR1 GAGGAGAAGCTGGTGGAGT) and the constant region (3' external, located after CDR3) alpha ($C\alpha$) or mu ($C\mu$) (primer antisense GAGCCCAGGAGCAGGTCT and CGGGAAGTCCTGGATGTT, respectively). The PCR conditions were 2 min at 94°C followed by 30 cycles with denaturation at 94°C for 30 s, hybridization at 61°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s. Then a final elongation at 72°C for 10 min was carried out. The second PCR (nested) targets intern V_H regions (McAleer et al., 2005) in sense (primer FR3-sense TGAGAACCGAAGACACGGC, V_{HA} -TGGCAGCTATTAGTACTAGT, V_{HB} -GCCATTGCTAGTAGTGAC, V_{HC} -TGGCAGGTATTTATAGTAGT, V_{HE} -GGTATTGATAGTGGTAGTTA) and the unique J_H region in antisense

(TGAGGACACGACGACTTCAA-FAM coupled primer). The PCR conditions were 2 min at 94°C followed by 20 cycles with denaturation at 94°C for 30 s, hybridization at 58°C for 30 s and elongation at 72°C for 60 s. Then a final elongation at 72°C for 10 min was carried out. PCR products were incubated in formamide with length marker (TAMRA fluorescence) and the migration was performed at 60°C in capillary of ABI 310 bioanalyser (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA). Primers were purchased from Eurogentec (Liège, Belgium).

2.6. Principal Component Analysis

Data, *i.e.* mRNA relative expression of different genes expressed in jejunal and ileal Peyer's patches of 7 piglets, were subjected to a Principal Component Analysis (PCA) using the SPAD[®] software as previously described (Dubus et al., 2005; Levast et al., 2009). PCA is a descriptive multivariate analysis that rapidly identifies groups of observations (*i.e.* two types of Peyer's patches) according to their scores in different variables (*i.e.* different gene mRNA levels of expression).

2.7. Statistical analysis

Paired, non normally distributed (Shapiro-Wilk test) data from qPCR (relative expression) were also analyzed using the Exact Permutation Test with General Scores (StatXact-3 software, version 3.0.2, Cytel Software Corporation, Cambridge, MA, USA). In differences between jejunal and ileal PP, a $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Analysis of transcriptomic profile of Peyer's patches

To compare jejunal and ileal PP, the expression of more than 35 transcripts has been assessed by qPCR in seven 28-day-old piglets. Transcript levels of expression and comparison between both PP are presented in details in Table 2. Messenger RNA of both CCL25 and IgA were highly expressed while mRNA of A Proliferating-Inducing Ligand (APRIL), B-cell Activating Factor BAFF, CCL20, CCR9, IL23p19, NK-lysin, Porcine β Defensin 2 (PBD-2), SOCS2, Transforming Growth Factor beta (TGF β), TLR2 and TLR4 (Table 2) were moderately expressed. The mRNA levels of expression were low for other genes such as CCL28, CCR10, CCR11, PMAP-37 (cathelicidin) and PR-39 for example (Table 2). Some transcripts were clearly more expressed in the jejunal than in the ileal PP

while some others were more expressed in the jejunal PP (Table 2). Indeed CCL25, FOXP3, IL4, NK-lysin, PMAP-37, PR-39, SOCS2, T-Bet and TSLP mRNA were significantly more expressed ($P < 0.05$) in jejunal than in ileal PP (Table 2) while IL5, IL10, TLR2 and TLR4

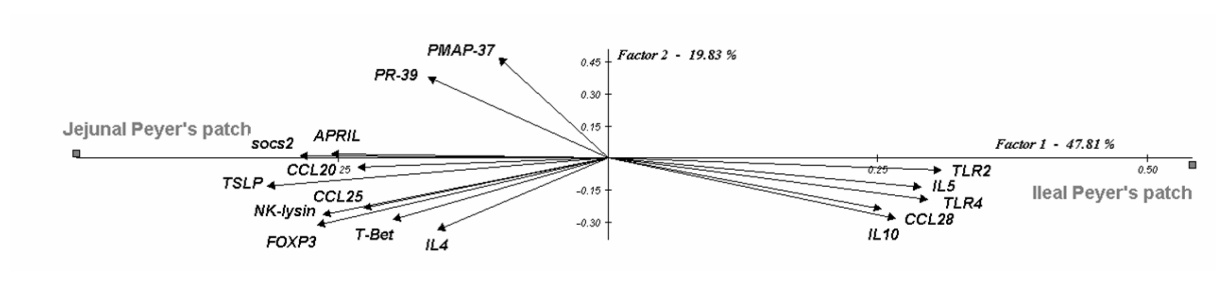


Figure 1: Principal Component Analysis (PCA) graph of transcriptome.

The PCA graph is a two-dimensional representation of a 16-dimensioned space corresponding to 16 quantitative variables. These variables, *i.e.* mRNA expression levels of 16 genes, in the two selected tissues are represented by vectors. The proportion of global variance explained by F1 and F2 factors (in italic characters) is indicative of the 2-dimentional quality of representation of the space. The 2 other qualitative variables (Peyer's patches) are represented by bold squares which correspond to the gravity center of each piglet's PP. All genes analyzed are presented in Table 1.

mRNA were more expressed in ileal PP (Table 2). Transcript expressions were very similar for BAFF, CCR10, CX3CL1, IgA, IL13, TGF β and TGF β -R in both tissues (Table 2). In the multivariate analysis, the cloud of observations constructed by the PCA was projected on a plane of two orthogonal factors (F1 and F2; Fig.1). These factors corresponded to 67.64% (47.81% for F1 and 19.83% for F2) of the global variance of the cloud allowing a good representation of these observations. On the PCA graph, the main opposition was on F1, between observations related to the jejunal PP that clustered by their gravity center on the left, and the observations related to the ileal PP whose gravity center was on the right. The vectors corresponding to mRNA expressions of TLR2, TLR4 and IL5 were clearly directed to the right, towards ileal PP observations, indicating that these observations were characterized by the higher levels of mRNA expression of the 3 genes. In contrast, APRIL, CCL20, CCL25, SOCS2 and TSLP mRNA vectors pointed towards the gravity center of jejunal PP observations, demonstrating that the higher levels of mRNA for these genes were in that tissue (Fig. 1).

Thus, this analysis clearly showed differences between PP with APRIL, CCL20, CCL25, SOCS2 and TSLP mRNA strongly associated to jejunal PP while TLR2, TLR4 and IL5 mRNA were more linked to ileal PP.

3.2. Diversity of IgA and IgM repertoires using CDR3 spectratyping

Immunoglobulin repertoire diversity assessment in both PP has been carried out following CDR3 length analysis (Fig. 2). At 28 days, IgM and IgA repertoires of the piglet using CDR3 spectratyping showed approximately ten picks in their spectra indicating already an important diversification of recombinant VDJ genes (Fig. 2). Jejunal and ileal patches did not differ for their IgM repertoire as observed in one representative piglet among the seven (Fig. 2). In contrast, IgA spectra did not present a similar profile for both patches. Indeed, extra picks were observed on the left side of the spectra (shorter PCR products) in the ileal patch (dotted circles, Fig. 2). These picks, corresponding to longer PCR products, were not observed in the jejunal patch (Fig. 2). IgA repertoire was observed more diversified in the ileal than jejunal patches for piglets (Fig. 2). Consequently, V_H gene has been further analyzed with specific primers for V_HA, B, C and V_HE. No differences were observed for V_HA and V_HB (data not shown). Only the V_HE subset confirmed the previous observation of a more diversified repertoire using CDR3 spectratyping for ileal than jejunal PP with more picks on the left side of the spectra (Fig. 2). For V_HC gene, a trend similar to that observed for V_HE was identified (data not shown).

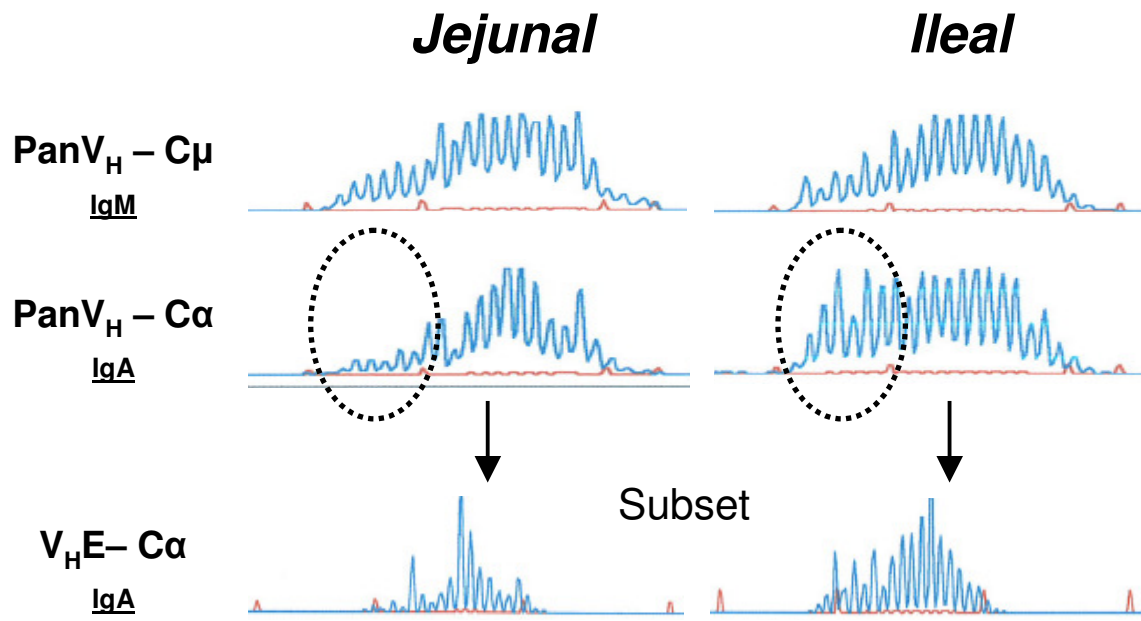


Figure 2: B-cell repertoire diversification analysis using CDR3 spectratyping.

Total mRNA were analyzed by nested-PCR with panVH and C_α or C_μ specific primers for global IgM or IgA repertoire and VHE-C_α for a more specific VH gene. PCR products length diversity is represented by spectra (blue) and analysis is normalized with length marker (red).

4. Discussion

The mRNA expression pattern of 36 transcripts including antimicrobial peptides, chemokines, cytokines and toll-like receptors has been analyzed, for the first time, in piglet ileal and jejunal PP (Table 1 and 2). The aim of the current study was to relate the observed transcriptomic profiles with the functions of both patches. It is known that most of the IgA (T-cell-dependent) in the gut is generated by B-cells in the germinal centers of PP (Mowat, 2003). Moreover, swine like ovine ileal Peyer's patches might be important for antigen independent B-cell repertoire diversification (Barman et al., 1997; Binns and Licence, 1985; Chu and Liu, 1984; Gerdts et al., 2001). For that reason, IgA and IgM repertoires using CDR3 spectratyping have been also assessed in both patches.

Regarding chemokines in the transcriptomic analysis, CCL25 (also known as TECK) mRNA was significantly more expressed in jejunal than in ileal PP. This result confirmed previous data showing a lower mRNA expression of CCL25 in the distal than in the proximal intestine (Meurens et al., 2007b; Stenstad et al., 2007). Furthermore, it has been shown that CCR9, CCL25 receptor, plays a more dominant role in effector T-cell recruitment to the proximal (duodenum and jejunum) compared with the distal (ileum) small intestine, correlating with higher CCL25 expression at this site (Agace, 2008; Stenstad et al., 2007). Additionally, the lower development of interfollicular zones in ileal PP could also correlate with the less dominant role of the CCL25/CCR9 axis in the distal intestine.

Ileal PP were characterized by a higher expression of CCL28, IL5, IL10, TLR2 and TLR4 transcripts (Fig. 3). CCL28 mRNA were highly expressed in the colon and the rectum (Berri et al., 2008; Kunkel et al., 2000) and the higher mRNA expression of this chemokine observed in ileal comparatively to jejunal patches could be related to the obvious proximity between the ileum and the large intestine. Indeed, bacterial microflora is known to be more developed and diversified in the jejunum than in the ileum (Ahmed et al., 2007; Sawaki et al., 2007). This observation could explain the higher expression of CCL28 mRNA in ileal *versus* jejunal PP as an antimicrobial peptide activity has been described for this chemokine (Hieshima et al., 2003). Similarly, the higher expression of TLR2 and TLR4 mRNA in the ileal than in jejunal PP is most probably related to the important amount of bacteria residing in the ileal lumen. TLR4 detects a variety of ligands but is mostly known as the lipopolysaccharide receptor while TLR2 recognizes bacterial lipopeptides, yeast zymosan, parasites, viral proteins and lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria as well (Albiger et al., 2007). Furthermore, it is known that some T-cell-independent antigens, such as LPS, can activate B-cells through TLR and particularly TLR4 (Tang et al., 2006). IL10, generally

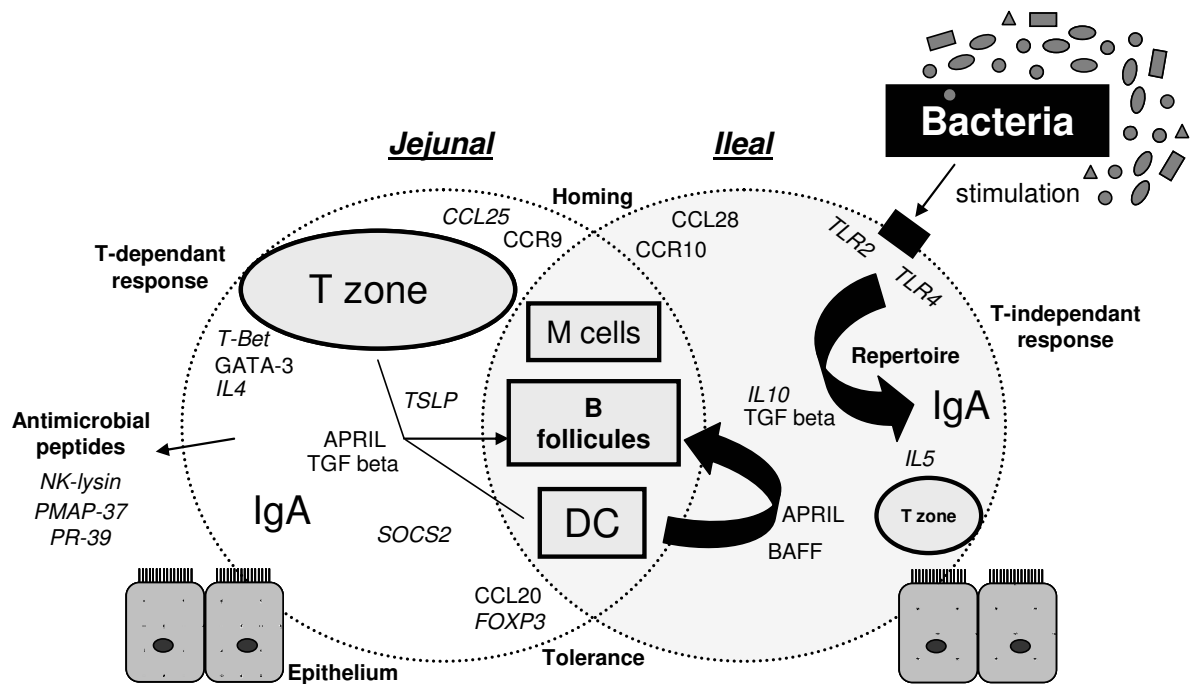


Figure 3: Schematic representation of the transcriptomic differences and similarities between ileal and jejunal patches.

In *italic*, transcripts where significant differences have been observed ($P < 0.05$). CCL25, FOXP-3, IL4, NK-lysin, PMAP-37, PR-39, SOCS2, T-Bet and TSLP mRNA were strongly associated to jejunal PP while IL5, IL10, TLR2 and TLR4 mRNA were strongly associated to ileal PP. T-cell zone predominates in jejunal PP while these structures are rare in ileal PP. DC: Dendritic Cells.

described as an anti-inflammatory cytokine, presented also a higher transcriptional expression in the ileum than in the jejunum and could consequently be involved in the regulation of the immune response to the bacterial microflora in this tissue. IL5, a Th2 cytokine, was also up-regulated at mRNA level. This observation might be associated to the “more” B profile of ileal PP with their smaller interfollicular structures comparatively to jejunal PP.

Jejunal PP were associated with higher mRNA expressions of CCL25, FOXP3, IL4, NK-lysin, PMAP-37, PR-39, SOCS2, T-Bet and TSLP (Fig. 3). For CCL25, this observation is consistent with previous reports showing that CCL25 mRNA were expressed in porcine PP (Meurens et al., 2006). The higher expression of these chemokine transcripts in jejunal than in ileal PP might be associated to the more developed interfollicular T-cell structures in this tissue. Antimicrobial peptide mRNA (NK-lysin, PMAP-37, PR-39) were more expressed in jejunal than ileal PP. One potential explanation could be the structure of PP in both section of the intestine. Indeed, PP are discrete and numerous in jejunal PP while ileal PP is long and continuous. Consequently, due to its structure, jejunal PP could be more susceptible than ileal PP to pathogen invasion, requiring a strong and reliable local protection by antimicrobial peptides. TSLP, a dendritic cell-conditioning IL7 like cytokine derived from epithelial cells, can induce T-cell independent B-cell alpha class switch recombination indirectly after the stimulation of APRIL secretion by *lamina propria* dendritic cells and the promotion of the formation of non-inflammatory T-cells with IgA-inducing functions (Liu, 2009; Rimoldi et al., 2005). IL4 as well as TSLP is generally considered as an IgA-inducing cytokine. The higher production of FOXP3, T-Bet and SOCS2 mRNA in jejunal PP is yet puzzling. FOXP3 and T-Bet are transcription factors involved in Treg and Th1 responses, respectively, and SOCS2 is a suppressor of cytokine signaling pathway implicated in the control of inflammatory process and fetal development (Yoshimura et al., 2007).

Regarding immunoglobulin repertoire, our findings show more diversity for IgA repertoire in ileal *versus* jejunal PP while for IgM, we did not observe any difference. The microflora which is richer in ileal environment (Ahmed et al., 2007; Sawaki et al., 2007) could be one potential explanation of these findings (Fig. 3). To go further in the analysis of this finding, a study about combinatory diversity mechanisms should be performed. In the process of diversity generation, CDR3 length fluctuates as a consequence of N-addition to the sequence. N-addition is regulated by the terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT) enzyme (Komori et al., 1993) and the activity of this enzyme is under the control of Ikaros factor (Kirstetter et al., 2002). Molecular analysis targeting this enzyme and its regulation factor would undoubtedly clarify observed differences between both patches.

In conclusion, the expression of various antimicrobial peptides, chemokines, cytokines, toll-like receptors and transcription factors from isolated ileal and jejunal PP has been measured and two distinct expression patterns have been identified after statistical analysis. Ileal PP were characterized by a higher expression of CCL28, IL5, IL10, TLR2 and TLR4 mRNA while jejunal PP showed higher expression of antimicrobial peptides, CCL25, FOXP3, IL4, T-Bet, TSLP and SOCS2 mRNA. Additionally, the immunoglobulin primary repertoire analysis showed more diversified IgA repertoire in the ileal than jejunal patches for the 28-day-old piglets. All these findings are in accordance with the structure of both PP and the subsequent predominance of T-cell-dependent IgA class switching in jejunal PP while T-cell-independent IgA class switching predominates in ileal PP.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the Conseil Régional du Centre. We are thankful to UEPAO and UE PRC staff for their invaluable help with housing animals and collecting tissues. We thank Isabelle Lantier for her precious help for the spectratyping analysis.

Table I. Primer sequence, annealing temperature of primer set (°C), expected PCR fragment size (bp) and reference

Primer Name	Primer sequence	Annealing temperature (°C) of primer set	cDNA PCR product (bp)	NCBI or PEDE blast accession number and EST
APRIL/TNFSF13	(S) TGCTCACCCGTAACAGAAAG (AS) TAAACTCCAGCATCCCAGAC	60	172	BP170456
BAFF/TNFSF13B	(S) GAGAGCAGCTCCATTCAAAG (AS) GCATGCCACTGTCTGCAATC	60	103	NM_001097498
CCL20/MIP3 alpha	(S) GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC (AS) CATTGGCGAGCTGCTGTGTG	66	146	NM_001024589
CCL25/TECK	(S) ACCTGCCTGCTGTGATATTC (AS) TCCGATTGTCCAGGATCTTC	65	105	NM_001025214
CCL28/MEC	(S) CTGCTGCACTGAGGTTTCAC (AS) CAGCAGCCAAAGTCACAATCC	66	101	NM_001024695
CCR9	(S) TACGGCTATGACGCCACACC (AS) ACGGCACCCACGATGAACAC	69	143	NM_001001624
CCR10	(S) GCCCGCAGAGCAGGTTTCC (AS) CAAAGAGACACTGGGTTGGAAG	67	136	NM_001044563
CCR11/CCX-CR	(S) ACAGATACTGGGCAGTAAAG (AS) CACACCTCGCTTTGTGATTG	61	147	NM_001097430
CX3CL1	(S) GCAGCTCCTAGTCCATTAC (AS) CACCATTCTGACCCAGAAG	58	167	CK464144
FOXP3	(S) GGTGCAGTCTCTGGAACAAC (AS) GGTGCCAGTGGCTACAATAC	65	148	AY669812
GATA3	(S) CCCGTCCTACTACGGAAAC (AS) GTGGTGGATGGACGTCTTG	62	193	BW971285
HPRT-1	(S) GGACTTGAATCATGTTTGTG (AS) CAGATGTTTCCAAACTCAAC	60	91	DQ815175
IFN gamma	(S) GCTCTGGGAAACTGAATGAC (AS) TCTCTGGCCTTGGAAACATAG	63	167	NM_213948
IgA (heavy chain)	(S) ACCGCCACCATCACCAAACC (AS) AGCCATCGCACCAGCACATC	64	152	AB194101
IL2	(S) GCCATTGCTGCTGGATTAC (AS) CCCTCCAGAGCTTTGAGTTC	63	159	NM_213861
IL4/BCGF	(S) CAACCTGGTCTGCTTACTG (AS) CTCTCCGCTCGTGTCTCTG	65	173	NM_214123
IL5/EDF	(S) TGGAGCTGCCTACGTTAGTG (AS) TCGCCTATCAGCAGAGTTCG	64	105	NM_214205
IL10/B-TCGF	(S) ACCAGATGGGCGACTTGTG (AS) TCTCTGCCTTCGGCATTACG	65	123	NM_214041
IL12 p35	(S) GGCCTGCTTACCACTTGAAC (AS) GCATTTCATGGCCTGGAATC	64	180	NM_213993
IL12 p40	(S) CTGAAGAAGACGGCATCAG (AS) AGGAGTGACTGGCTCAGAAC	62	148	NM_214013
IL13	(S) TGGCGCTCTGGTTGACTCTG (AS) CCATGCTGCCGTTGCATAGG	67	159	NM_213803
IL23 p19	(S) CTCCTTCTCCGCTCAAGATCC (AS) TTGCTGTCTCATGGGCGAAGAC	70	82	20050322S-038657
NK-lysin	(S) GCATTTCATGGCCTGGAATC (AS) GTGTCTCTGTTGGGTTGTG	60	156	X85431
NOD2	(S) GAGCGCATCTCTTAACTTTC (AS) ACGCTCGTGATCCGTGAAC	63	66	NM_001105295
PBD-1	(S) ACCGCCTCTCTTGTATTTC (AS) CACAGGTGCCGATCTGTTTC	63	150	NM_213838
PBD-2	(S) TTGCTGCTGCTGACTGTCTG (AS) CTGGCCTTGCCACTGTAAC	62	180	NM_214442
PMAP-37/cathelicidin	(S) GCAGTCCTCGGAAGCTAATC (AS) CCCGTTCTCTTGAAGTCAC	62	166	L39641
PR-39	(S) TAATCTCTACCGCTCTCTGG (AS) CCCGTTCTCTTGAAGTCAC	62	151	NM_214450
RPL19	(S) AACTCCCGTCAGCAGATCC (AS) AGTACCCTTCCGCTTACCG	60	147	AF435591
SOCS2	(S) CTGCGCATCGAATACCAAG (AS) TGTAGAGCGGTTTGGTCAG	58	130	NM_001097461
SOCS3	(S) CTTACGCTCAGCGTCAAG (AS) CTTGAGCACGCAGTCGAAG	60	130	NM_001123196
T-Bet	(S) TCAATCCTACTGCCACTAC (AS) TTAGGAGACTCTGGGTGAAC	62	151	CJ014895
TBP-1	(S) AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA (AS) AGATGTTCTCAAACGCTTCG	60	153	Nyqard et al. 2007
TGF beta	(S) GAAGCGCATCGAGGCCATTTC (AS) GGCTCCGGTTCGACACTTTC	67	162	NM_214015
TGF beta-R	(S) AGTGGACTTGCCCATCTTC (AS) GTTCCCACTCTGTGGTTTG	58	134	AB182259
TLR2	(S) ACGGACTGTGGTGCATGAAG (AS) GGACACGAAAGCGTCATAGC	62	101	NM_213761
TLR4	(S) TGTGCGTGTGAACACCAAGAC (AS) AGGTGGCGTTCCTGAAACTC	62	136	NM_001113039
TLR5	(S) CCTTCCTGCTTCTTTGATGG (AS) CTGTGACCGTCTGTATGTAG	61	124	NM_001123202
TSLP	(S) AGGGCTTGTGCTAACCTAC (AS) ATCCGGCTATCATCACAG	58	154	20050322S-029626

Table II. Statistical comparisons between mRNA levels of expression. Levels of expression are shown in the second column (High: Amplification over the threshold around 15-20 cycles, Moderate around 20-25 cycles, Low around 25-30 cycles and Very Low more than 30 Cycles. Paired, non-normally distributed data were analysed using the permutation Test (Exact). Significant *P* values are in grass with star annotation (*= *P*<0.05). NA: Not Available.

Messenger RNA	Level of expression	<i>P</i> value	Highest tissue expression: Jejunal vs ileal patches
APRIL	Moderate	0.062	jejunal
BAFF	Moderate	0.960	equal
CCL20	Moderate	0.078	jejunal
CCL25	High	0.015 (*)	jejunal
CCL28	Low	0.062	ileal
CCR9	Moderate	0.828	jejunal
CCR10	Low	0.125	equal
CCR11	Low	0.078	jejunal
CX3CL1	Low	0.671	equal
FOXP3	Low	0.031 (*)	jejunal
GATA3	Low	0.718	jejunal
IFN gamma	Low	0.515	jejunal
IgA	High	NA	equal
IL2	Low	0.156	jejunal
IL4	Low	0.031 (*)	jejunal
IL5	Low	0.015 (*)	ileal
IL10	Low	0.015 (*)	ileal
IL12 p35	Low	0.078	ileal
IL12 p40	Low	0.515	ileal
IL13	Very low	NA	equal
IL23 p19	Moderate	0.094	jejunal
NK-lysin	Moderate	0.015 (*)	jejunal
NOD2	Low	0.1	jejunal
PBD-1	Low	0.125	jejunal
PBD-2	Moderate	0.5	jejunal
PMAP-37	Low	0.031 (*)	jejunal
PR-39	Low	0.015 (*)	jejunal
SOCS2	Moderate	0.015 (*)	jejunal
SOCS3	Very low	0.078	jejunal
T-Bet	Low	0.031 (*)	jejunal
TGF beta	Moderate	0.540	equal
TGF beta-R	Low	0.859	equal
TLR2	Moderate	0.015 (*)	ileal
TLR4	Moderate	0.015 (*)	ileal
TLR5	Low	0.187	jejunal
TSLP	Very low	0.015 (*)	jejunal

1.2. Discussion

La discussion présente s'inscrit en complément et dans la continuité de la discussion de l'article.

Nous avons pu confirmer les différences entre les deux types de PP : différence dans la diversité du répertoire des IgA, supérieure dans la PP iléale et différences dans le profil transcriptomique en relation avec une réponse T-indépendante dans la PP iléale. La population bactérienne très riche à ce niveau de l'intestin sera l'objet d'une analyse lors de ce travail de thèse. Ces observations sont valables pour les autres espèces artiodactyles et peuvent être extrapolées au lapin. En effet, le lapin présente lui aussi une zone de diversification du répertoire IgA dans un organe secondaire, le *sacculus rotundus* (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007). Le développement de cet appendice est lui aussi dépendant de la flore, après inoculation de bactéries chez des lapins *germ-free*, les lymphocytes B prolifèrent avec apparition de mutations somatiques dans les réarrangements VDJ (Rhee et al., 2004). D'un point de vue mécanistique, la question est de savoir quelle est la nature de la diversification du répertoire chez le porc : ajout de nucléotides, mutation somatique, ou bien les deux ? La réponse peut être apportée par séquençage des produits PCR. La question est aussi de savoir si des précurseurs IgA sont déjà présents dans ces sites secondaires, lors de l'initiation d'une réponse intestinale primaire.

En complément de l'analyse moléculaire, l'immunohistochimie nous aurait permis une analyse plus fine des CG, leur nombre, taille, composition et organisation. De même, le manque de certains prélèvements nous a empêché de multiplier le nombre de porcelets étudiés et notamment de différencier les races des porcelets. L'effet race est un critère que nous n'avons pas étudié dans le fond mais reste un aspect d'importance que nous discuterons pour les résultats non publiés de ce manuscrit.

Cette première étude traduit l'évolution des PP en 28 jours dans les conditions optimales de lactation, elle établit ainsi un contrôle « non-sevré » pour la suite de mon travail de thèse. Après avoir étudié un aspect de l'immunité intestinale du porcelet de 28 jours, en l'occurrence les PP, nous nous sommes par la suite intéressés à l'objet propre de cette thèse qui est l'influence du lait maternel.

2. Influence du sevrage ultra-précoce sur la réponse immunitaire intestinale

2.1. Introduction

Comparée à la précédente, l'étude présente un aspect cinétique (de 7 à 28 jours) et une analyse plus large des tissus prélevés. De plus, 4 groupes de sevrage ont été constitués, avec des sevrages à 7, 14 et 21 jours. Le sevrage peut avoir des conséquences sur plusieurs tissus impliqués dans la réponse immunitaire intestinale. Le MLN, les PP, principaux sites inducteurs, peuvent selon une première hypothèse être déficients dans l'activation des LB naïfs. Une seconde hypothèse serait une perturbation de la réponse en aval de l'activation des LB, avec un déficit en plasmocytes dans la *lamina propria*. Après analyse des Ig sériques, le profil transcriptomique de ces tissus a été étudié pour les cytokines de la réponse immunitaire intestinale. Les résultats préliminaires ont ainsi montré, pour les PP comme pour le jéjunum, qu'il n'y avait pas de différences entre les différents groupes de porcelets. Seul le MLN présente un profil transcriptomique différent entre les groupes. Nous avons donc approfondi l'analyse du MLN, en particulier au niveau du répertoire IgA des lymphocytes B.

J'ai choisi de conduire l'expérimentation sur les portées dans un élevage classique, ainsi les conséquences du sevrage potentiellement observées sont directement transposables à un élevage de production conventionnel.

Article 2

- Article corrigé pour la revue Veterinary immunology and immunopathology le 16 février 2010 -

- VETIMM-09-1778 -

Piglet ultra-early weaning and its immune consequences: Serum IgA low concentrations and diversification of the IgA mesenteric lymph node repertoire

Benoît Levast¹, Michèle de Monte², Claire Chevaleyre¹, Sandrine Melo¹, Mustapha Berri¹, Françoise Mangin¹, Galliano Zanello¹, Isabelle Lantier¹, Henri Salmon¹, François Meurens^{1*}

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380, Nouzilly, France.

²Unité INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires », IFR 135, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, Tours, France.

*Corresponding author: Email: meurens@tours.inra.fr. Phone: +33-247427865; Fax: +33-247427774.

Short Running Title: Piglet ultra-early weaning immune consequences

Abstract

In domestic pigs raised for meat production, the weaning is a critical period because of related physiological disturbs and negative consequences on animal performance. Conventional weaning is usually undertaken around 3-5 weeks of age while ultra-early weaning, extensively used in some countries such as the USA, is undertaken earlier (7-14 days of age). We propose here a protocol to study the effect of the weaning age on the intestinal immune system development. Three groups of piglets, weaned at 7, 14, 21 days of age and the not weaned control group, were created, and at 28 days various intestinal tissues were collected. The immune parameters such as interleukin transcriptomic profiles and immunoglobulin A (IgA) repertoire diversity were assessed. Serum Ig concentration comparisons between groups identified an IgA deficiency in ultra-early weaned piglets at 21 days. However, the IgA repertoire in the mesenteric lymph node (MLN) was more diversified in ultra-early weaned piglets compared to other groups. In parallel, in the MLN, the mRNA expression of cytokines (IL17a and TGF beta) and transcription factor (FOXP3 and ROR gamma-t) was significantly different between groups. IL17a and ROR gamma-t mRNA were mainly detected in ultra-early weaned piglets while FOXP3 and TGF beta mRNA were found in suckling piglets. In conclusion, we found indications suggesting that ultra-early weaning has a negative impact on IgA synthesis and triggers inflammatory pathways. These findings strengthen the importance of endogenous milk factors onto the onset of IgA synthesis, and adapted management conditions for successful ultra-early weaning.

Keywords

Piglets, weaning, mesenteric lymph node, IgA, cytokine, repertoire

1. Introduction

In swine and other mammals, weaning occurs spontaneously. After a few weeks of lactation, sow milk supply is progressively reduced whilst concurrently the young animal has become able to find food on its own. In the feral pig, the suckling phase naturally ends when the piglets are around 3 to 4 months of age. In domestic pigs raised for meat production, economic considerations have led through the years, and especially since the beginning of the seventies in many European countries, to the shortening of the lactation phase (Jensen et al., 1997). Conventional weaning is usually undertaken around 3-5 weeks of age while ultra-early weaning, extensively used in some countries such as the USA, is undertaken at 7-14 days of age. However, most European countries have actually increased weaning age over the last 15

years or so. European legislation advises against weaning at less than 21 days (Council Directive 91/630/EEC) (Jensen et al., 1997).

Weaning is characterized by drastic changes in piglet environment and diet with the decline of maternal derived immunoglobulins and the withdrawal of milk protective elements (Curtis and Bourne, 1971; Salmon et al., 2009a; Vega-Lopez et al., 1995). This critical period is associated with reduced nutrient intakes and growth, and increased susceptibility to diarrhoeas. In response to weaning, the expression of inflammatory cytokines by enterocytes has been reported (Oswald, 2006; Pie et al., 2004) as a possible consequence of suckling protection deprivation. Indeed, maternal milk is known to contain various nutrients required for piglet development and antibodies conferring passive immune protection (Salmon et al., 2009a). Porcine colostrum, extremely rich in IgG, brings systemic protection to the piglet and milk IgA allows local protection (Cebra et al., 1977; Salmon et al., 2009a). This passive immunity is then gradually replaced by the piglet active immune response (Curtis and Bourne, 1971; Salmon et al., 2009a). A study in large-white piglets weaned at one week reported boosted immunologic parameters (Orgeur et al., 2001), higher density of T and B cells in the gut epithelium and *Lamina propria* (LP), underlying potential positive effects of ultra-early weaning in piglet protection. Even if piglet weaning has already been extensively studied (Bailey et al., 2005a; Berkeveld et al., 2009; Colson et al., 2006; Le Gall et al., 2009), some questions remain about its potential consequences on mucosal immune development especially when ultra-early weaning is considered (Orgeur et al., 2001).

The immaturity of the neonatal immune system of mammals has been well demonstrated (Brown et al., 2006a; Morein et al., 2002; Steidler et al., 2003). Responses induced by immunization early in life differ both quantitatively and qualitatively from those induced in adults (Forsthuber et al., 1996; Hu et al., 1992; Sarzotti et al., 1996; Weeratna et al., 2001). Quantitatively, responses in young animals are slower and weaker; qualitatively, responses are distinctly Th2 biased with predominantly IgM and IgG1 antibodies (Forsthuber et al., 1996; Hu et al., 1992; Sarzotti et al., 1996; Weeratna et al., 2001). IgA repertoire develops and diversifies mainly in Peyer's patches (PP) and mesenteric lymph node (MLN) before production by mature LP B cells, secretion through epithelium in the gut lumen and subsequent interactions with luminal antigens (Butler et al., 2006a; Butler et al., 2009b). B and T cell tissue-specific migration is governed by a combination of adhesion molecules, chemokines and their respective receptors (Berlin et al., 1993; Butcher and Picker, 1996). The migration of T and IgA+ B cells to the intestinal tract is mediated firstly by mucosal addressin cellular adhesion molecule 1 (MAdCAM-1)/ $\alpha 4\beta 7$ interaction, then by CCL25/CCR9 and

CCL28/CCR10 (Bourges et al., 2007; Kunkel and Butcher, 2003). Intestinal mature B cells can then secrete immunoglobulins in response to adequate stimuli. Direct correlation between B cell IgA production in the intestine and serum IgA concentrations has been established (Vaerman et al., 1997). Serum IgA originated mainly from local intestinal synthesis reaching blood *via* mesenteric lymph (Vaerman et al., 1997).

Ultra-early weaning can dramatically influence intestinal environment and complicate the development of the immune system with many potential harmful side-effects. The aim of the following report is to evaluate the impact of different weaning times on the intestinal immune system development. To answer that question, we first analyzed the Ig serum concentrations in weaned and suckling piglets. Then, the influence of weaning time on the MLN IgA repertoire development has been analyzed. Indeed, as a mucosal associated lymphoid tissue, the MLN is a major actor of the intestinal immune response. Furthermore, interleukin, adhesion molecule and transcription factor transcriptomic profile has been assessed in MLN at 28 days in piglet groups.

2. Materials and methods

2.1. Animals and samples collections

Miniature histocompatible SLA^{d/d} pigs were used in the current study (Kaeffer et al., 1990). A total of 6 sows and 16 piglets were provided by INRA experimental unit (Nouzilly, France). Piglets received *ad libitum* different nutritional mixes depending on weaning age: Crema (at day 7-14), Cremidil (at day 14-21) and Sevryplus after 21 days (Sanders SA, Paris, France). During a 3-day transition period, diets were mixed in 1:1 ratio for a gradual transition. Four groups of piglets were created (Fig. 1). In each group, piglets from different mothers were selected to avoid maternal effects on the data. Blood was sampled at 7, 14, 21 and 28 days in silicone coated BD vacutainer tubes (BD diagnostics, Franklin Lakes, USA) for serum analysis. After coagulation at room temperature, the blood samples were centrifuged at 2000 $\times$ g for 10 min and sera were stored at -20°C. At the end of the protocol (Fig. 1, day 28), piglets were euthanized and tissue samples (MLN, PP and gut wall) were collected. Then, the tissues were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Animals were cared for in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use committee at INRA.

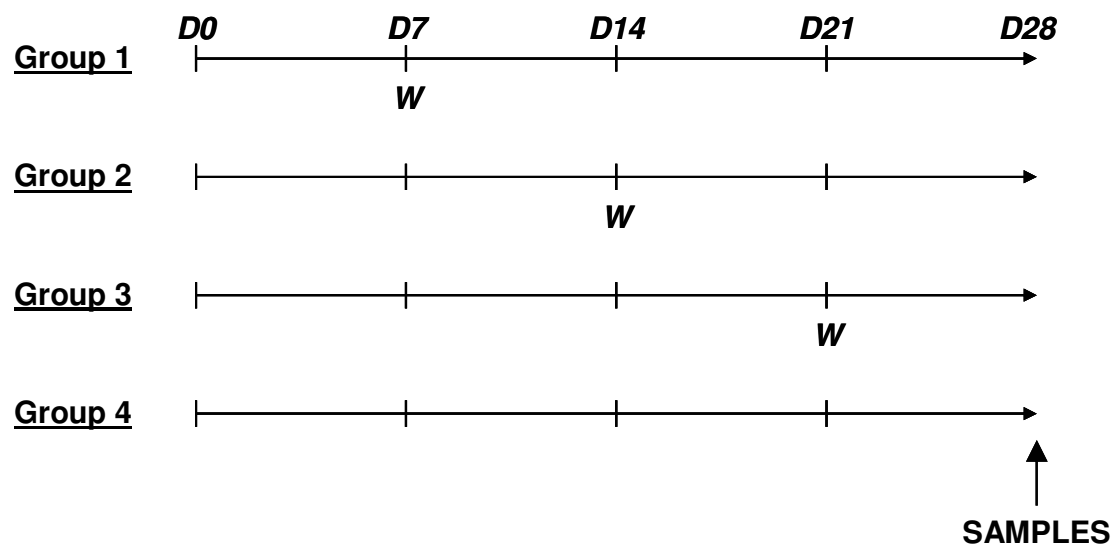


Figure 1: Experimental scheme of piglet weaning

Piglets were weaned at different time: After 7 days of lactation (group 1), 14 days (group 2), 21 days (group 3) and 28 days (no weaned, group 4). Blood is sampled at days 7, 14, 21 and 28. At 28 days, all piglets were euthanized and samples of intestine and lymph nodes were collected. W: weaning.

2.2. Preparation of messenger RNA and complementary DNA

After collection, tissue samples were cut in small pieces (3 x 3 mm) and immersed in Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with ceramic beads (Bertin technologies, St Quentin en Yvelines, France) and total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Then, RNA samples were treated with DNase I Amp Grade (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (1 U/ μ g of RNA). The absence of genomic DNA contamination was checked by using prepared RNA as a template for reverse transcription–quantitative real-time PCR (RT-qPCR). RNA concentration was determined by measuring optical density at 260 nm (OD_{260}) and the RNA quality was assessed by calculating OD_{260}/OD_{280} ratio and by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Inc., Santa-Clara, USA). A total of 1 μ g of RNA was incubated in a final volume of 20 μ l containing 2 μ l dNTP (0.25 mM final each), 1.3 μ l oligo dT (133 pmoles/ μ l), 0.8 μ l MuMLV reverse transcriptase (25 U/ μ l), 4 μ l 5X MuMLV buffer (Eurogentec, Liège, Belgium) and 1.9 μ l of ultra-pure water (Gibco, Paisley, Scotland). The reaction was maintained 90 min at 37°C and then heat-inactivated at 93°C for 5 min. The generated cDNA was stored at –80°C.

2.3. Messenger RNA expression analysis using reverse transcription quantitative real-time PCR

Several mRNA sequences have already been identified in pigs (Bruehl et al., ; Meurens et al., 2009b). When genes were not described, tBLASTn searches of the GenBank and PEDEblast expressed sequence tag (EST) database (Uenishi et al., 2004), using both known human and murine amino acid sequences, have been performed. This methodology enables the identification of porcine EST corresponding to human and murine sequences (Table 1). Then, primers (Table 1) were designed using Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) and purchased from Eurogentec (Liège, Belgium).

After RT, qPCR was performed using diluted cDNA combined with primer sets and IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA) according to the manufacturer's recommendations. The qPCR conditions were 95°C for 3 min, followed by 45 cycles with denaturation at 95°C for 15 s, annealing temperature (Table 1) for 30 s and elongation at 72°C for 30 s. qPCR reactions were run on a Bio-Rad iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, USA). The specificity of the qPCR reactions was assessed by analyzing the melting curves of the products and size verification. To minimize sample variation, we chose tissue samples of

Table1 Primer sequences and annealing temperatures of primer sets (°C), expected PCR fragment sizes (bp) and associated references

Primer Name	Primer sequence	Annealing temperature (°C) of primer set	cDNA PCR Product (bp)	Sequence or expressed sequence tag accession number
CCL25	(S) ACCTGCCTGCTGTGATATTC (AS) TCCGATTGTCCAGGATCTTC	65	105	NM_001025214
CCL28	(S) CTGCTGCACTGAGGTTTCAC (AS) CAGCAGCCAAGTCACAATCC	66	101	NM_001024695
CCR9	(S) TACGGCTATGACGCCACACC (AS) ACGGCACCCACGATGAACAC	69	143	NM_001001624
CCR10	(S) GCCCGCAGAGCAGGTTTCC (AS) CAAAGAGACACTGGGTTGGAAG	67	136	NM_001044563
FOXP3	(S) GGTGCAGTCTCTGGAACAAC (AS) GGTGCCAGTGGCTACAATAC	65	148	AY669812
GAPDH	(S) CTTACGACCATGGAGAAGG (AS) CCAAGCAGTTGGTGGTACAG	63	170	AF017079
GATA3	(S) CCCGTCCTACTACGGAAAC (AS) GTGGTGGATGGACGTCTTG	62	193	BW971285
IFN gamma	(S) GCTCTGGGAACTGAATGAC (AS) TCTCTGGCCTTGGAACATAG	63	167	NM_213948
IL1 beta	(S) AGAAGAGCCCATCGTCTTTG (AS) GAGAGCCTTCAGCTCATGTG	62	139	NM_001005149
IL4	(S) CAACCTTGGTCTGCTTACTG (AS) CTTCTCCGTCGTGTCTCTG	65	173	NM_214123
IL5	(S) TGGAGCTGCCTACGTTAGTG (AS) TCGCCTATCAGCAGAGTTTCG	64	105	NM_214205
IL6	(S) ATCAGGAGACCTGCTTGATG (AS) TGGTGGCTTTGTCTGGATTG	62	177	NM_214399
IL8	(S) TCCTGCTTTCTGCAGCTCTC (AS) GGGTGGAAAGGTGTGGAATG	62	100	NM_213867
IL10	(S) ACCAGATGGGCGACTTGTG (AS) TCTCTGCCTTCGGCATTACG	65	123	NM_214041
IL12 (p35)	(S) GGCCTGCTTACCACITGAAC (AS) GCATTCATGGCCTGGAATC	64	180	NM_213993
IL12 (p40)	(S) CTGAAGAAGACGCATCACG (AS) AGGAGTGACTGGCTCAGAAC	62	148	NM_214013
IL13	(S) TGGCGCTCTGTTGACTCTG (AS) CCATGCTGCCGTTGCATAGG	67	159	NM_213803
IL17a	(S) CCAGACGGCCCTCAGATTAC (AS) CACTTGGCCTCCAGATCAC	66	103	AB102693
IL22	(S) AAGCAGGTCTCTGAACITCAC (AS) CACCCCTAATACGGCATTGG	60	133	AY937228
MAdCAM-1	(S) AGCCTGGGCTCCGTAAAGTC (AS) TGGTCAGGGAAGGCGAACAC	68	155	NM_001037998
ROR gamma-t	(S) TTCAGTACGTGGTGGAGTTC (AS) TGTGGTTGTACGCGTTGTAG	60	141	BP164723
RPL19	(S) AACTCCCGTCAGCAGATCC (AS) AGTACCCTTCCGCTTACCG	60	147	AF435591
SMAD2	(S) TGAGTGCCTAAGTGACAGTG (AS) CCAGAAGAGCAGCAAATTCC	62	143	DB812041
T-Bet	(S) TCAATCCTACTGCCACTAC (AS) TTAGGAGACTCTGGGTGAAC	62	151	CJ014895
TBP-1	(S) AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA (AS) AGATGTTCTCAAACGCTTCG	60	153	Nygard <i>et al.</i> , 2007
TGF beta	(S) GAAGCGCATCGAGGCCATTC (AS) GGCTCCGGTTCGACACTTTC	67	162	NM_214015
TNF alpha	(S) CCAATGGCAGAGTGGGTATG (AS) TGAAGAGGACCTGGGAGTAG	62	116	X54859
VCAM-1	(S) CCCAAGGACCCAGTTATATC (AS) GAAATCTGTGGAGCTGGTAG	60	104	NM_213891

similar size and location and used identical quantities of high quality RNA with no signs of degradation. Samples were normalized internally using simultaneously the average cycle quantification (Cq) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ribosomal protein L19 (RPL19) and tata box binding protein 1 (TBP-1) as references in each sample (Meurens et al., 2009a; Meurens et al., 2006; Nygard et al., 2007). These genes were selected as the reference genes because of their low variation between samples. A standard curve was generated using diluted cDNA. The correlation coefficients of the standard curves were >0.995 and the concentrations of the test samples were calculated from the standard curves, according to the formula $y = -M * Cq + B$, where M is the slope of the curve, Cq the point during the exponential phase of amplification in which the fluorescent signal is first recorded as being statistically significant above background and B the y-axis intercept. Cq values were used to calculate the qPCR efficiency from the given slope according to the equation: qPCR efficiency = $(10^{[-1/M]} - 1) \times 100$. All qPCRs displayed efficiency between 90% and 110%. Expression data are expressed as relative values after Genex macro analysis with three reference genes (Bio-Rad, Hercules, USA) (Vandesompele et al., 2002).

2.4. B cell repertoire diversification analysis using CDR3 spectratyping

Since junctional diversity in the complementary determining region 3 (CDR3) accounts for most heavy-chain diversity in fetal and newborn piglets (Butler et al., 2000b), we comparatively analysed by spectratyping CDR3 sequence length between piglet groups. In this very variable region, N nucleotides can cumulate by Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) activity (Komori et al., 1993), modifying its length which has been assessed using conventional and nested PCR. The cDNA was produced as described above using 1 μ g of RNA and analyzed with specific primers. The first PCR reaction targets a pan-specific V_H region (sense primer: GAGGAGAAGCTGGTGGAGT) (Sun et al., 1998b) and the constant region (3' external, located after CDR3) alpha ($C\alpha$, antisense primer: GAGCCCAGGAGCAGGTCT) (Butler et al., 2001). The PCR conditions were 2 min at 94°C followed by 30 cycles with denaturation at 94°C for 30 s, hybridization at 61°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s. Then a final elongation at 72°C for 10 min was carried out. The nested PCR targets intern CDR2 V_H regions (McAleer et al., 2005) (sense primers: V_{HA} -TGGCAGCTATTAGTACTAGT, V_{HB} -GCCATTGCTAGTAGTGAC, V_{HC} -TGGCAGGTATTTATAGTAGT, V_{HE} -GGTATTGATAGTGGTAGTTA) and the unique J_H region (Sun et al., 1998a) (antisense FAM coupled primer:

TGAGGACACGACGACTTCAA-FAM). The PCR conditions were 2 min at 94°C followed by 20 cycles with denaturation at 94°C for 30 s, hybridization at 58°C for 30 s and elongation at 72°C for 60 s. Then a final elongation at 72°C for 10 min was carried out. PCR products were incubated in formamide with length marker (GeneScan500-TAMRA, Applied Biosystem, Foster city, USA) and the migration was performed at 60°C using ABI 310 bioanalyser (Applied Biosystem). The migration was associated with laser detection of tagged DNA products (6-FAM-blue and TAMRA-red). Primers were purchased from Eurogentec (Liège, Belgium). Spectratyping analyses were repeated several times in each piglet with identical profiles. Only V_HB-C α spectratypes presented differences between piglet groups. Spectratypes were analyzed using 4 parameters:

Peak number: In each spectratype (one per piglet), only peaks with fluorescence intensity above 1000 fluorescence units have been counted.

Total peak area: In each spectratype, the total area under the spectratype profile has been measured. Higher total peak area is associated to a more diversified repertoire.

Corrected CDR3 length: In each spectratype, the corrected CDR3 length has been calculated. ($\Sigma(\text{peak area} \times \text{PCR product length}) / \text{total peak area}$). The PCR product length fluctuates in size as a consequence of TdT activity.

Peak “height”: In each spectratype, the peak “height” has been measured. This is the mean of all peak fluorescence intensities in one spectratype. This parameter depends on cDNA amount which has been internally normalized using multiple reference gene expression.

2.5. Serum Ig analysis by ELISA

ELISA were performed on piglet sera sampled at 7, 14, 21 and 28 days (Fig. 1) and IgA, IgM and IgG concentrations were determined using pig polyclonal Ig specific kits (Bethyl, Montgomery, USA) according to the manufacturer’s recommendations.

2.6. Principal component analysis

Data, *i.e.* mRNA relative expression of different genes in MLN and serum Ig concentrations, were subjected to a principal component analysis (PCA) using the SPAD[®] software (Dubus et al., 2005; Levast et al., 2009). This approach involves a mathematical procedure that transforms a number of potentially correlated variables into a smaller number of uncorrelated variables named principal components. PCA rapidly identifies groups of observations (*i.e.* MLN and piglet serum) according to their scores in different variables (*i.e.* mRNA levels of expression and Ig concentrations).

2.7. Statistical analysis

Independent and non-normally distributed data (mRNA relative expression) were analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post test to compare piglet groups (using Graphpad Prism® 4, GraphPad Software Inc, USA). Independent and normally distributed data from spectratypes were tested using ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test to compare piglet groups (Graphpad Prism® 4). Differences between groups were considered as significant when $P < 0.05$. Only the most relevant comparisons are presented in the figures and in the text. Regarding serum IgA concentrations, linear regressions (from day 14 to day 28 in G1 and G4 groups) were calculated. The slope was considered significantly different from zero when $P < 0.05$. Additionally, independent, non-normally distributed data from serum samples were also analyzed at 21 and 28 days using the Wilcoxon Rank Sum Test (Exact). Differences between groups were considered as significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Quantitative deficit: Ig concentrations in piglet serum

In the principal component analysis, piglets weaned at 7, 14, 21 and 28 days were respectively named W7, W14, W21 and W28, and serum samples S7, S14, S21 and S28 (collected at 7, 14, 21 and 28 days) (Fig. 2A). For example, W7-S14 corresponds to serum samples collected at 14 days in piglets weaned at 7 days (Fig. 2A). Four distinctive areas were observed on the PCA graph corresponding to the serum samples collected at 7, 14, 21 and 28 days (Fig. 2A). At 7 days, serum samples showed high IgG and IgA concentrations. At later stages (14-28 days), serum samples were positively linked to IgM and negatively linked to IgG (Fig. 2A). Serum samples collected at 14 and 21 days (S14 and 21) were negatively linked to the IgA concentrations whereas these collected at 28 days were positively linked to IgM concentrations. Inside each area, value positions were variable (Fig. 2A). Indeed, for samples S7, data were distributed widely in the graph, while for samples S14, data were close together. Noteworthy, in S21 and S28 areas, samples associated to a weaning at 7 and 28 days were similarly opposed in the IgA and IgM vector axis (Fig. 2A). To further characterize the weaning effect, we operated a description of modalities (DEMODO). In the area of the serum sample collected at 21 days, weaning at 7 days (W7) was not associated with high IgA ($P=0.035$) and IgM ($P=0.027$) levels while the weaning at 14 days was only characterized by low IgA levels ($P=0.04$).

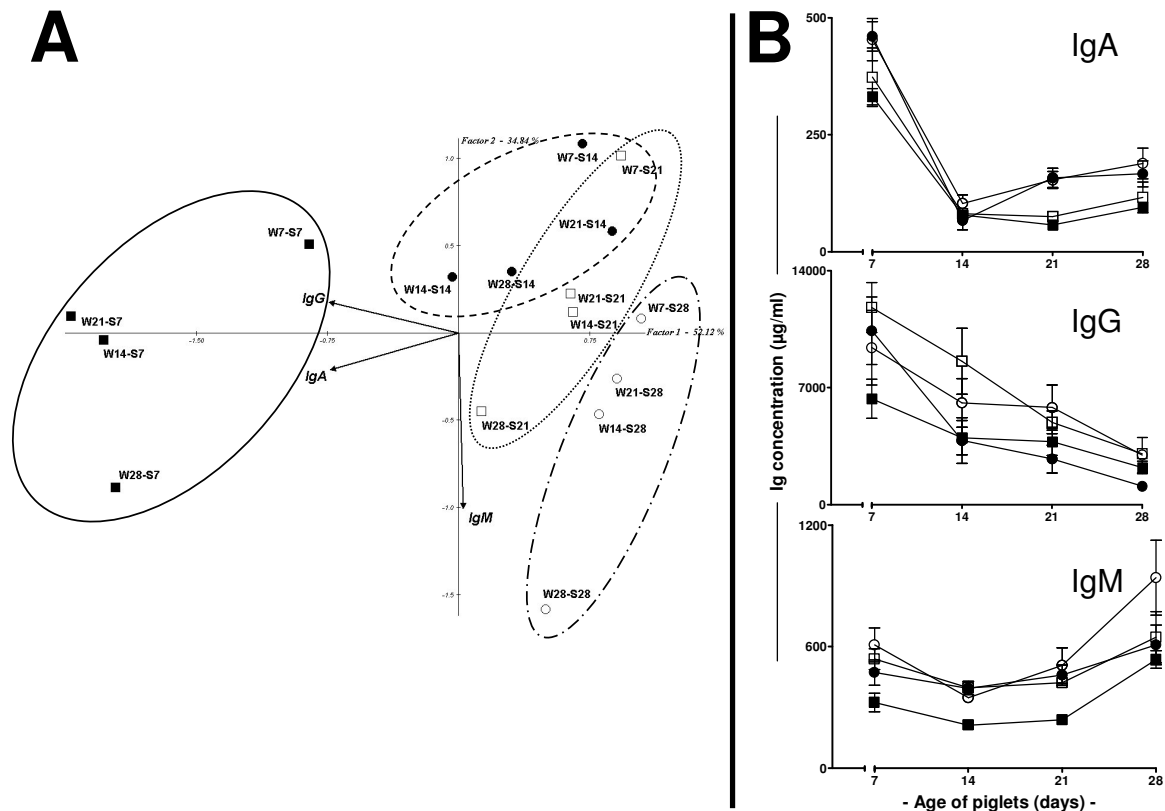


Figure 2: Principal Component Analysis (PCA) graph of serum Immunoglobulins

A) PCA graph is a two-dimensional representation of a 3-dimensioned space corresponding to 3 quantitative variables. These variables, *i.e.* Ig serum concentration, are represented by vectors. The proportion of global variance explained by F1 and F2 factors (in italic characters) is indicative of the 2-dimentional quality of representation of the space. The others qualitative variables, piglet age and weaning date are analyzed as crossed-variables. Each crossed-variable correspond to the gravity center of piglet Ig concentration data. Circles represent area defined by the modality “sample”, *i.e.* the age of piglets. W: Weaning, S: Sample. Numbers represent the weaning days (7, 14, 21 and 28) or serum sample collects (7, 14, 21 and 28 days, piglet age). **B)** Classical representation of serum concentrations during 28 days for IgA, IgG and IgM. Black square represent piglets weaned after 7 days, white square: Piglets weaned after 14 days, black circle: Piglets weaned after 21 days and white circle: Suckling piglets. Independent, non-normally distributed data were analyzed at 21 and 28 days using the Wilcoxon Rank Sum Test (Exact). Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$. ns: Not significant.

These conclusions were exemplified by a conventional representation of the data (Fig. 2B). In figure 2B, serum IgA concentrations were clearly lower in the ultra-early weaned than in the suckling piglets group at 21 days ($P<0.01$) (Fig. 2B). At 28 days, serum IgA concentrations were not significantly different between the four groups (Fig. 2B). Linear regressions were performed from 14 to 28 days in ultra-early weaned and suckling piglet groups. The slope associated to ultra-early weaning was significantly different from zero ($P<0.05$) while the slope associated to suckling piglets was not ($P=0.22$). Thus, the foreseen increase in IgA serum concentrations from day 21 to day 28 is not confirmed by linear regression analysis in the ultra-early weaned piglet group. IgG and IgM concentrations were not significantly different between piglet groups except for sera collected at 21 days (Fig. 2B).

3.2. Qualitative differences in the mesenteric lymph node: IgA+ B cells repertoire

B cells repertoire diversity was evaluated through the analysis of CDR3 PCR products knowing that their length is altered consequently to recombination events (Butler et al., 2000a; Butler et al., 2000b). Regarding V_HA , V_HC and V_HE genes, no difference was observed between piglet groups (data not shown). Spectratypes for the V_HB gene showed significant differences listed below.

Peak number: Piglets suckling mother milk (G4) presented the lowest number of peaks while ultra-early weaned piglets (G1) presented the highest. G2 and G3 piglet groups showed intermediate values with an average of 8 peaks (Fig. 3). The peak number was significantly higher in G1 than in G2 ($P<0.05$) and G4 ($P<0.01$) groups (Fig. 3).

Total peak area: G1 and G4 groups respectively showed the highest and the lowest mean value (Fig. 3). Total peak area was significantly lower in G4 than in other groups ($P<0.05$) (Fig. 3).

Corrected CDR3 length: As CDR3 segment length is related to richer repertoires, we carried out a nested PCR on CDR3 segment and calculated a corrected CDR3 length which informs about the frequency of each fragment in the spectratype. No statistical difference was observed between the 4 groups, even if G1 group showed the highest values (Fig. 3).

Peak height was higher as a mean in G1 than in G4 group ($P<0.05$) whereas G2 and G3 were intermediate (Fig. 3).

In conclusion, peak number and total peak area were significantly different between ultra-early weaned piglet (G1) and suckling piglet (G4) groups whereas G2 and G3 groups were associated to intermediate IgA repertoire diversity.

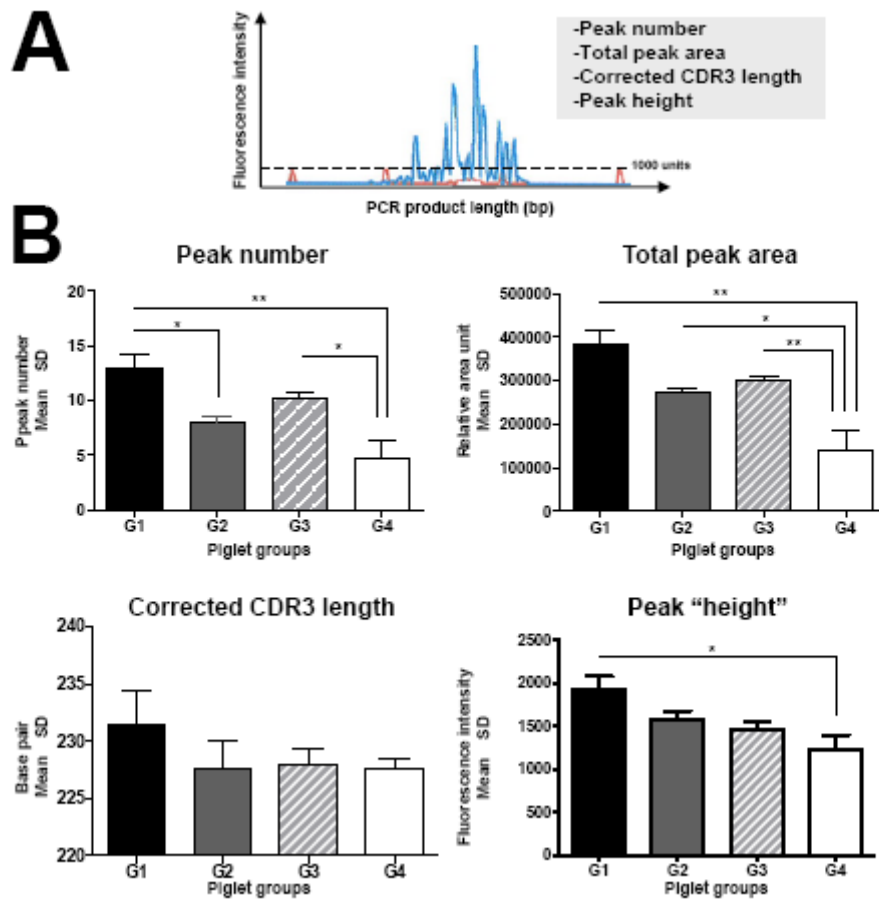


Figure 3: B-cell repertoire diversification analysis using CDR3 spectratyping.

A) Four parameters were selected to perform the spectratype analysis. Results are only shown for $V_H E-C\alpha$ gene.

B) Comparison between piglet groups. In black (G1): Ultra-early weaned piglets; in dark-grey (G2): Piglets weaned after 14 days; in hashed-grey (G3): Piglets weaned after 21 days; in white (G4): Suckling piglets. Data were presented as mean $\pm$ SD for a total of 4 animals per group. Independent, normally distributed data from spectratypes were tested using ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test to compare piglet groups. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

3.3. Transcriptomic analysis of the mesenteric lymph node cytokines

To identify the MLN cytokine profiles, RT-qPCR were performed on total RNA isolated from MLN collected in each piglet group. Most significant alterations are presented in Fig. 4 and PCA of selected transcripts is available in Fig. 5. Among transcripts related to auxiliary lymphocyte pathways and homing factors as well as transcripts associated to PP and gut walls, no significant difference was observed between groups (data not shown).

a- Analysis of T helper status

To explore the influence of weaning on the piglet immune system development, the expression of genes involved in the helper lymphocyte response was measured. Transcript expression of potential porcine Th1, Th2 and Th17 cytokines and associated transcription factors were analyzed. Additionally, the mRNA expression of inflammatory cytokines has been assessed.

Mesenteric lymph nodes from the G1 group were hypertrophied in contrast to the other groups (data not shown). To link this observation with inflammatory cytokines, the mRNA expression of IL6, IL8, TNF alpha and IL1 beta was assessed. For the 4 genes, there was a trend to a higher mRNA expression in G1 and G4 than in G2 and G3 groups (data not shown). Using PCA, a global association between G1 and TNF alpha was observed (Fig. 5). Th17 response has also been measured (Fig. 4A). Th17 population is associated to the transcription factor ROR gamma-t and is characterized by the secretion of IL17a cytokine. IL17a mRNA was significantly higher in G1 than in G2 groups ($P < 0.05$, Fig. 4A) and similarly a trend to higher IL17a mRNA expression was observed in G3 than in G4 groups. Transcript expression of ROR gamma-t was not significantly different between the four groups (Fig. 4A). IL22, another cytokine associated to Th17 lymphocyte was highly expressed in G1 and G3 but the differences between groups were not significant (Fig. 4A). Using PCA, IL17a and ROR gamma-t were globally associated to G1 piglet MLN (Fig. 5).

Expressions of Th1 and Th2 genes were not significantly different between the four groups as ascertained by IL12, INF gamma, Gata3 and IL13 mRNA which were similarly expressed in piglet MLN whatever the piglet group (data not shown). However, the mRNA expression was always higher in G1 and G4 and lower in G2 and G3 as observed for IL5 mRNA expression in MLN showing a significant difference between G1 and G3 piglets ($P < 0.05$) (data not shown). Using the PCA, T-Bet vector has a positive link to the group G1 (Fig. 5) while IL4 mRNA expression did not discriminate between the four groups with a vector perpendicular to the factor 1 axis (Fig. 5).

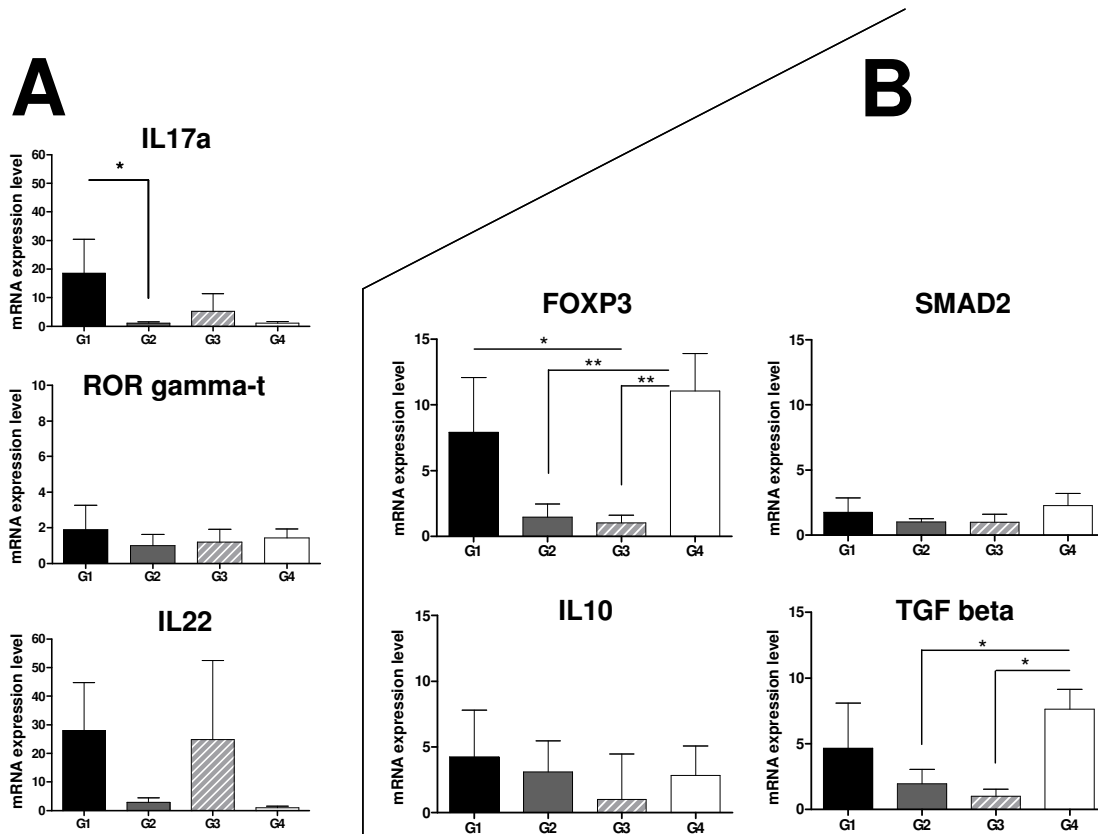


Figure 4: Relative mRNA expression of Th17 molecules and inflammatory cytokines in the piglet mesenteric lymph node under different weaning conditions.

Expressions of Th17 genes (IL17a, ROR gamma-t and IL22) (**A**) and regulatory factors such as FOXP3, SMAD2, IL10 and TGF beta (**B**) were analyzed at the mRNA level. The Relative mRNA expression was compared between the four groups (in black (G1): Ultra-early piglets; in dark-grey (G2): Piglets weaned after 14 days; in hashed-grey (G3): Piglets weaned after 21 days; in white (G4): Suckling piglets). Data were presented as mean $\pm$ SD for a total of 4 animals per group. Independent, non-normally distributed data were analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post test to compare piglet groups. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

In conclusion, there was no association between T helper status and piglet groups except for Th17 pathway in ultra-early weaned piglet.

b- Forkhead box P3 and associated cytokines mRNA expression

Various T cell populations are involved in the regulation of the immune response and T regulator (Treg) lymphocytes (Bolzer et al., 2009; Sakaguchi, 2005) are well characterized by the transcription factor, FOXP3 and the cytokines IL10 and TGF beta (Banham et al., 2006). The transcripts of these three molecules and SMAD2 mRNA have been evaluated in the piglet MLN (Fig. 4B). FOXP3 mRNA was expressed much more in G1 than in G3 ($P<0.05$) and in G4 than in G2 ($P<0.01$) and in G3 ($P<0.01$) piglet groups. Furthermore PCA showed only G4 group exhibiting a global association with FOXP3 and TGF beta mRNA expressions (Fig. 5). Regarding SMAD2 mRNA expression, the differences between groups were not significant (Fig. 4B). TGF beta mRNA expression analysis showed significant differences between G4 and G2/G3 (both $P<0.05$) whereas the differences between G1 and G2/G3 were not significant. Regarding IL10 mRNA expression, the highest expression was observed in G1 group (Fig. 4B).

c- Homing factor mRNA expressions in the mesenteric lymph node

MAdCAM-1, CCL25, CCL28 and their respective receptors $\alpha 4\beta 7$, CCR9 and CCR10 are involved in T and B cells homing to the intestine. There was a trend to higher mRNA expression in the MLN in G1 and G4 than in G2 and G3 groups except for CCL25 (data not shown). Regarding CCL25, the mRNA expression did not significantly differ between the four groups as judged by a vector perpendicular to the factor 1 axis (Fig. 5). PCA graph confirmed the positive link between CCR9 and G4 group. However, these differences were mostly not significant. A significant difference ($P<0.05$), strengthened by the association between G4 group and MAdCAM-1 vector in the PCA (Fig. 5), was observed between G3 and G4 (data not shown).

In conclusion, the transcriptomic analysis in the MLN showed a clear association between ultra-early weaned piglets (G1) and inflammatory interleukins and transcription factors such as IL17a, TNF alpha and ROR gamma-t. While suckling piglets (G4) were associated to regulatory interleukin, transcription factor and addressin such as TGF beta, FOXP3 and MAdCAM-1, respectively.

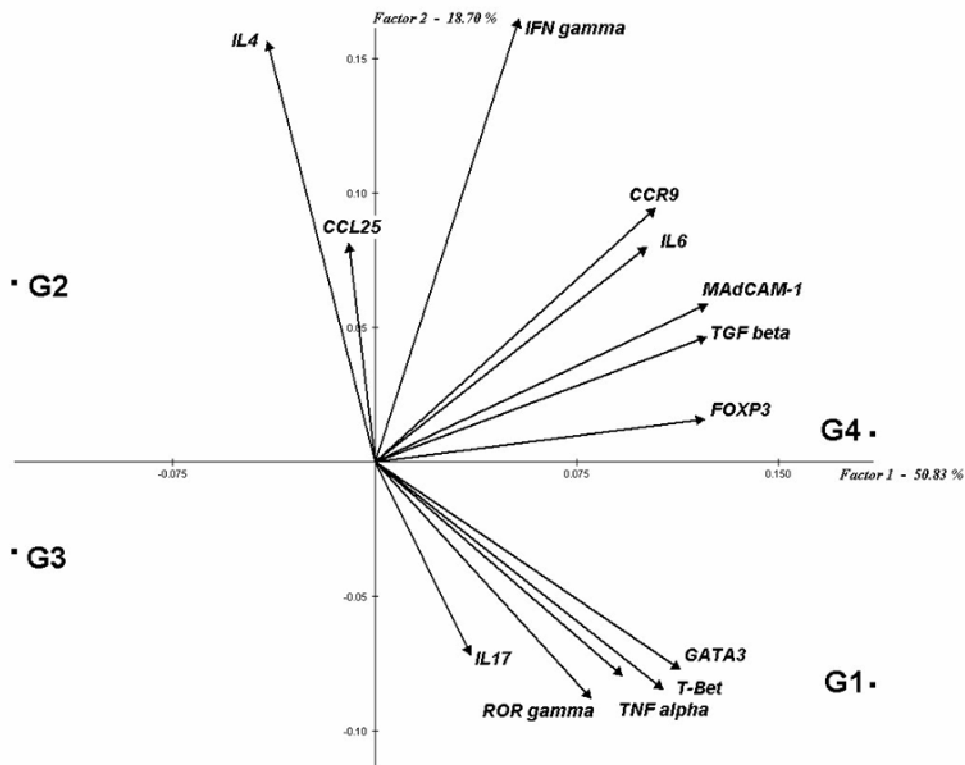


Figure 5: Principal Component Analysis of MLN transcriptomic profile

The PCA graph is a two-dimensional representation of a 25-dimensioned space corresponding to 25 quantitative variables. The pertinent variables, *i.e.* mRNA expression levels of 13 genes in the MLN, are represented by vectors. The proportion of global variance explained by F1 and F2 factors (in italic characters) is indicative of the 2-dimensional quality of representation of the space. The 4 other nominal variables (piglet groups) are represented by bold squares which correspond to the gravity center of each piglet in the group.

4. Discussion

Weaning strategies drastically impact piglet physiological and immune development. The intensity of the changes that occur in the piglet at weaning is dependent on its age (Jensen et al., 1997). The current study aimed to assess some immune consequences of different weaning ages (7, 14 and 21 days). Immune parameters such as Ig serum concentrations, throughout experiments, MLN interleukin and transcription factor transcriptomic profiles and Ig repertoire diversity, at day 28, were analyzed in the different weaning groups.

Regarding Ig serum concentrations, the variation was quite important inside piglet groups probably as a consequence of the colostrum intake which can fluctuate between piglets from a same group. It is well known that, following ingestion, colostral Ig including IgA cross transitorily the neonatal gut barrier to reach blood circulation and participate to the systemic protection of piglets (Porter, 1969; Salmon, 2000; Salmon et al., 2009a). Then, there is a progressive decrease in Ig blood concentrations because of protein half-life (Curtis and Bourne, 1971). At 14 days, “a critical window” for immune protection was identified as low Ig concentrations were observed in all piglet groups. Two main hypotheses can be considered when the ultra-early weaning impact on immune system is investigated. i) Both maternal milk factor deprivation and the absence of maternal antibodies could boost the development of piglet gut immune system as suggested in previous studies in pigs (Orgeur et al., 2001). In agreement, in mice, an earlier establishment of IgA plasma cells in the intestinal mucosa has been shown to occur using neonates nursed with antibody-deficient milk from a genetically engineered antibody-deficient female (Harris et al., 2006). ii) Conversely, maternal milk deprivation and drastic diet changes could weaken both quantitatively and qualitatively piglet immune response as suggested by a study in mice (Shimamura et al., 2003) and by studies highlighting the immaturity of the piglet immune system (Bailey et al., 2005a; Butler et al., 2000a; Helm et al., 2007; Meurens et al., 2006; Steidler et al., 2003; Stokes, 2004). At 21 days, there was in ultra-early weaned piglets a deficit in IgA and IgM serum concentrations which is not related to insufficient colostral uptake but merely to a delay in the own IgA active production in piglet since there is a strong link between serum IgA concentration and local intestine IgA production (Vaerman et al., 1997).

B cell repertoire diversity assessment using CDR3 spectratyping was performed in MLN IgA+ B cell populations. Globally, in all piglet groups, the IgA B cell repertoire was already diversified. These results are in line with an earlier report showing diversified antibody repertoire in fetal, newborn and 30-day-old piglets (Butler et al., 2000a; Butler et al., 2000b; Levast et al., 2009). As no difference was observed between piglet groups for V_HA,

V_HC and V_HE genes, spectratype profiles have only been analyzed for V_HB gene. Ultra-early weaned piglets showed a more diversified B cell IgA repertoire, as judged by peak number, total peak area and peak height in their MLN, than suckling piglets while piglets weaned later were always associated to intermediate MLN B cell IgA repertoires. Regarding CDR3 length, the trend to a higher diversity in G1 than in G4 groups is mainly due to large variation between individuals which indicate an evolving process. As we have carried out our analysis in piglets with the same age, drastic diet changes in ultra-early weaned piglets could account for this more diversified B cell IgA repertoire. Indeed, nutritional changes and related physiological and immunological aspects are probably the most important events occurring at weaning (Jensen et al., 1997; Lalles et al., 2007). The rupture of the maternal link for milk supply, very rich in IgA whereas IgG predominates in colostrum (Berthon et al., 2000), and the introduction of a new diet have major consequences on gut local immune status and on the gut microflora (Konstantinov et al., 2006; Shimoda et al., 1999). The change from highly-digestible (liquid) milk to a less-digestible and more complex solid diet is accompanied by an important diversification in the gut microflora (Lalles et al., 2007). After the introduction of solid food, obligate anaerobes increase in number and diversity and within weeks the microbes in the lower intestine outnumber the host own cells and an “adult-like” microbial pattern is obtained (Konstantinov et al., 2006; Lalles et al., 2007; Shimoda et al., 1999). The increased diversity of the microflora associated to solid diet offers a very plausible explanation to the higher diversity in the IgA cell repertoire of ultra-early weaned piglets. Moreover, the deprivation of milk-associated protective factors (Salmon et al., 2009a), such IgA, facilitates the contacts between new microbial and food antigens and immune structures. This can be at the origin of some diversification processes as demonstrated in mice (Harris et al., 2006).

The observed up-regulation in mRNA expression of interleukins and transcription factor related to inflammation and Th17 differentiation pathway in ultra-early weaned piglet MLN is in accordance with previous studies onto piglet weaning (Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007a; Moeser et al., 2007b; Pie et al., 2004). In contrast to a transient inflammatory response in the gut (IL1 beta, IL6 and TNF alpha, 0 to 8 days) at 28 days weaning (Pie et al., 2004), we observed a lasting inflammatory response (3 weeks after the ultra-early weaning taking place at 7 days) maybe due to the establishment in the small intestine of specific commensal microbiota (cytophaga-flavobacter-bacteroidetes) as observed in mice (Tsuji et al., 2008). The drastic diet changes taking place in ultra-early weaned piglet could promote the establishment of these bacteria in the piglet intestine. Presence of FOXP3 mRNA in

ultra-early weaned piglet MLN maybe explained by a massive stimulation of Treg cells in response to a drastic and brutal change in the microflora and the subsequent inflammation at 7 days. Similarly, among weaned piglet groups, the higher mRNA expression of TGF beta in ultra-early weaned piglet group could be associated again to the establishment of the microflora and the onset of endogenous IgA synthesis (for a review see (Macpherson and McCoy, 2007)). A global analysis by PCA did not confirm the association of FOXP3 and TGF beta mRNA expressions with the ultra-early weaned piglet group, these hypotheses have to be considered with caution.

In suckling piglet MLN, an induction of tolerance-related (FOXP3 and TGF beta and to a lesser extent IL10) gene expression was clearly identified at 28 days. Humoral, non-immunoglobulinic factors could explain for this gene expression (Salmon et al., 2009a). It has been shown, for example, that porcine colostrum and milk contain epithelial growth factor (Dekaney et al., 1997) accelerating intestinal growth (Jin et al., 1991) and up-regulating TGF beta production (Miettinen et al., 1989). Another potential explanation could be the nature of the microflora associated to maternal milk feeding as numerous lactic bacteria have shown probiotic properties. In piglets gradually weaned after 12 weeks, tolerance to new proteins introduced in the diet, at 2, 8 and 13 weeks, is not fully achieved until 8 weeks of age (Miller et al., 1994). The low FOXP3 and TGF beta mRNA expressions in piglets weaned at 14 and 21 days could be consecutive to a lower inflammation induction and early milk deprivation. The higher mRNA expression of MAdCAM-1 in suckling piglet group could be related to the recruitment of IgA plasma cell to the gut in response to the lactic microflora (Harris et al., 2006).

In conclusion, we found indications suggesting that ultra-early weaning has a negative impact on IgA synthesis and triggers inflammatory pathways. In contrast delaying the weaning allows endogenous milk factors to stimulate the onset of IgA synthesis protecting the piglet.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Conseil Régional du Centre (France). We are thankful to UEPAO and UE PRC staff (INRA) for their invaluable help with animal housing and the collect of intestinal tissues.

NOTE: Les références de cet article sont regroupées avec la bibliographie de la thèse.

Table1 Primer sequences, annealing temperatures of primer sets (°C), expected PCR fragment sizes (bp) and references (NCBI)				
Primer Name	Primer sequence	Annealing temperature (°C) of primer set	cDNA PCR Product (bp)	NCBI Accession number or ESTs
CCL25	(S) ACCTGCCTGCTGTGATATTC (AS) TCCGATTGTCCAGGATCTTC	65	105	NM_001025214
CCL28	(S) CTGCTGCACTGAGGTTTCAC (AS) CAGCAGCCAAGTCACAATCC	66	101	NM_001024695
CCR9	(S) TACGGCTATGACGCCACACC (AS) ACGGCACCCACGATGAACAC	69	143	NM_001001624
CCR10	(S) GCCCGCAGAGCAGGTTTCC (AS) CAAAGAGACACTGGGTTGGAAG	67	136	NM_001044563
FOXP3	(S) GGTGCAGTCTCTGGAACAAC (AS) GGTGCCAGTGGCTACAATAC	65	148	AY669812
GAPDH	(S) CTTCACGACCATGGAGAAGG (AS) CCAAGCAGTTGGTGGTACAG	63	170	AF017079
GATA3	(S) CCCGTCCTACTACGGAAAC (AS) GTGGTGGATGGACGTCTTG	62	193	BW971285
IFN gamma	(S) GCTCTGGGAACTGAATGAC (AS) TCTCTGGCCTTGAACATAG	63	167	NM_213948
IL1 beta	(S) AGAAGAGCCCATCGTCCTTG (AS) GAGAGCCTTCAGCTCATGTG	62	139	NM_001005149
IL4	(S) CAACCTGGTCTGCTTACTG (AS) CTTCTCCGTCGTTCTCTG	65	173	NM_214123
IL5	(S) TGGAGCTGCCTACGTTAGTG (AS) TCGCCTATCAGCAGAGTTCG	64	105	NM_214205
IL6	(S) ATCAGGAGACCTGCTTGATG (AS) TGGTGGCTTTGTCTGGATTTC	62	177	NM_214399
IL8	(S) TCCTGCTTTCTGCAGCTCTC (AS) GGGTGGAAGGTGTGGAATG	62	100	NM_213867
IL10	(S) ACCAGATGGGCGACTTGTG (AS) TCTCTGCCCTTCGGCATTACG	65	123	NM_214041
IL12 (p35)	(S) GGCCTGCTTACCACTTGAAC (AS) GCATTCATGGCCTGGAATC	64	180	NM_213993
IL12 (p40)	(S) CTGAAGAAGACGGCATCACG (AS) AGGAGTGACTGGCTCAGAAC	62	148	NM_214013
IL13	(S) TGGCGCTCTGGTTGACTCTG (AS) CCATGCTGCCGTTGCATAGG	67	159	NM_213803
IL17a	(S) CCAGACGGCCCTCAGATTAC (AS) CACTTGGCCTCCAGATCAC	66	103	AB102693
IL22	(S) AAGCAGGTCCTGAACTTCAC (AS) CACCCTTAATACGGCATTGG	60	133	AY937228
MAdCAM-1	(S) AGCCTGGGCTCCGTAAAGTC (AS) TGGTCAGGGAAGGCGAACAC	68	155	NM_001037998
ROR gamma-t	(S) TTCAGTACGTGGTGGAGTTC (AS) TGTGTTGTTCAGCGTTGTAG	60	141	BP164723
RPL19	(S) AACTCCCGTCAGCAGATCC (AS) AGTACCCTTCCGCTTACCG	60	147	AF435591
SMAD2	(S) TGAGTGCCTAAGTGACAGTG (AS) CCAGAAGAGCAGCAAATTC	62	143	DB812041
T-Bet	(S) TCAATCCTACTGCCCCTAC (AS) TTAGGAGACTCTGGGTGAAC	62	151	CJ014895
TBP-1	(S) AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA (AS) AGATGTTCTCAAACGCTTCG	60	153	Nyqard et al. 2007
TGF beta	(S) GAAGCGCATCGAGGCCATTTC (AS) GGCTCCGGTTCGACACTTTC	67	162	NM_214015
TNF alpha	(S) CCAATGGCAGAGTGGGTATG (AS) TGAAGAGGACCTGGGAGTAG	62	116	X54859
VCAM-1	(S) CCCAAGGACCCAGTTATATC (AS) GAAATCTGTGGAGCTGGTAG	60	104	NM_213891

2.2. Discussion

Cette discussion fait suite et se veut complémentaire à la discussion de l'article.

Ces travaux sont essentiellement basés sur une analyse transcriptomique du MLN. Pour renforcer l'observation du déficit IgA chez les porcelets, le comptage des plasmocytes dans la *lamina propria* ainsi que l'analyse de leur répertoire donneraient des informations complémentaires. Les lymphocytes circulants dans le sang ont fait l'objet d'une analyse par cytométrie de flux pour évaluer l'expression des molécules de migration (cellules IgA+, CCR9+ principalement). Ces analyses n'ont malheureusement pas porté leur fruit en raison de problèmes techniques et de mise au point. L'analyse par biologie moléculaire des expressions en ARNm de CCR9 dans la population des PBMC s'est avérée être encourageante (Annexe 4). Mais le travail sur PBMC totaux (LT + LB) est trop soumis à discussion puisque les lymphocytes migrants T et B ne peuvent être différenciés. Les variations d'expression de CCR9 ne peuvent donc pas être attribuées aux LB uniquement (Annexe 4). Pour pallier aux problèmes inhérents au double marquage en cytométrie et aux limites de la biologie moléculaire, j'ai décidé de trier les lymphocytes IgA+ depuis les PBMC isolées. Après passage au trieur cellulaire, les cellules ont été analysées par RT-qPCR. Malheureusement, la qualité des cellules, du marquage mais aussi des ARNm a limité l'exploitation des résultats de part la qualité du tri cellulaire et de l'efficacité des PCR.

L'influence d'un sevrage ultra précoce est donc observable par des concentrations en IgA sériques faibles et sur le profil transcriptomique du MLN avec une expression élevée de TGF β , FOXP3 notamment et un répertoire IgA diversifié. L'étude du jéjunum et de la PP iléale n'a pas montré de différences entre les groupes ni pour les cytokines exprimées ni pour la diversification du répertoire IgA. Ceci peut être expliqué par le fait que le MLN est responsable de l'induction de la tolérance, mécanisme probablement perturbé lors du sevrage des porcelets. Le déficit immunitaire observé chez les porcelets histocompatibles confirme l'importance de la fenêtre critique pour le système immunitaire intestinal, autour de 21 jours. Ce déficit peut être utilisé comme modèle pour tester l'effet immunostimulant de certains immunoprotecteurs.

3. Résultats non publiés

3.1. Influence du sevrage ultra-précoce sur la flore intestinale des porcelets

3.1.1. Introduction

Le sevrage s'accompagne d'un changement radical dans l'alimentation du porcelet, le lait liquide est remplacé par un granulé parfois réduit en bouillie (Annexe 5, Figure 21). Le changement est donc physique, et la paroi de l'intestin s'en trouve souvent altérée, mais il est aussi environnemental. En effet, le lait présente une flore bactérienne spécifique qui va disparaître avec le sevrage alors que les granulés vont être propices à d'autres bactéries (Konstantinov et al., 2004) et présenter des antigènes alimentaires nouveaux. L'absence de lait marque surtout la fin de l'immunité passive et le transfert des IgA maternelles, ce qui favorise l'installation d'une flore nouvelle. L'analyse de la flore intestinale peut se faire dans les différentes parties de l'intestin (jéjunum, iléon, caecum, colon) mais la dimension cinétique que nécessite notre étude demandait nécessairement une analyse des fèces évitant ainsi l'abattage des animaux. La purification de l'ADN bactérien à partir de fèces a été décrite avec différents protocoles, elle est sujette à discussion quant à la normalisation et la représentativité des ADN bactériens présents (Loisel et al., 2006). L'analyse par biologie moléculaire permet, théoriquement, une détection de toutes les espèces présentes (Annexe 3). La technique SSCP donne ainsi pour un échantillon complexe du type fèces un profil caractérisant la flore de l'échantillon. Sur la base du protocole précédent, en conservant seulement les porcelets G1 et G4, nous avons donc étudié par SSCP la flore présente dans les fèces des porcelets à J7, J14, J21 voire J28 pour certains.

Le but de cette étude est d'observer l'influence du sevrage ultra précoce (G1) sur la composition de la flore intestinale.

3.1.2. Matériel et méthodes

Animaux et collection des échantillons :

Les porcs sont issus de l'élevage de l'INRA (Nouzilly, France) et élevés comme décrit dans l'article précédent. Les porcelets sevrés peuvent consommer librement différentes préparations nutritionnelles à base de céréales (Annexe 5) en fonction de l'âge : Crema (jours 7-14), Cremidil (jours 14-21) et Sevryplus après 21 jours (Sanders SA, Paris, France). Une période de transition de 3 jours est établie entre chaque aliment avec un mélange en ratio 1:1. Une portée MS et une portée LW de 10 porcelets chacune sont utilisées. Dans chacune des portées 5 porcelets sont sevrés à 7 jours (G1) et 5 non sevrés (G4). Les fèces sont prélevées à 7, 14, 21 et 28 jours. Un porcelet de chaque groupe est abattu à J14 et deux à J21.

Extraction de l'ADN

L'ADN total des échantillons de fèces est extrait avec le kit Qiaamp DNA stool (Qiagen, Courtaboeuf, France) spécifique des fèces, suivant les recommandations du fabricant. L'intégrité et la quantité d'ADN purifié est évaluée par migration sur gel d'agarose 0.7% afin de discriminer les produits PCR.

PCR et analyse SSCP

Après dilution des ADN, une PCR classique est faite dans les conditions suivantes : en présence d'amorces (100ng/μl), de dNTP (2.5mM) et de l'enzyme (0.5 unité) Pfu Turbo DNA polymerase (Agilent Technologies, La Jolla, Californie) et après 2 min d'incubation du mix à 94°C, 25 cycles de PCR sont programmés avec 30s de dénaturation à 94°C, 30s d'hybridation à 61°C et 30s d'élongation à 72°C. Au final, le mix est incubé 10 min à 72°C. La séquence cible est la région V3 de l'ADNr avec le couple d'amorce universel suivant : sens 6-FAM – AGGTCCAGACTCCTACGGG et antisens TTACCGCGGCTGCTGGCAC (Peu et al., 2006).

Les produits PCR sont dilués et 1μl est repris dans un mix comprenant 18.8μl de formamide (Applied Biosystem, Fostercity, USA) et 0.2μl de standard de taille GS400-ROX (Applied Biosystem). Au final, les brins d'ADN sont dénaturés 5 min à 95°C et plongés dans la glace. La migration en micro-capillaire se fait ensuite à 32°C, 30 min par échantillon sur un appareil ABI-310 (Applied Biosystem).

3.1.3. Résultats - discussion

Les résultats obtenus sur 5 porcelets présentent une importante diversité de profil SSCP en particulier pour les porcelets MS (Figure 11b). L'évolution de la flore chez les porcelets LW fait ressortir des différences notables entre les deux groupes G1 et G4 à J21. A J7 et J14, les deux groupes présentent des profils intrinsèques différents, empêchant la sélection d'un profil type. Au contraire, à J21, les profils diffèrent selon les groupes, les porcelets sevrés 14 jours plus tôt (G1) ont des profils encore variables alors que les porcelets G4 toujours en lactation ont des profils beaucoup plus homogènes (Figure 11a). Les profils G1 présentent trois grandes zones de pics 1, 2 et 3. Les pics de la première zone sont minoritaires alors que pour G4, les porcelets présentent un profil avec des pics de la zone 1 uniquement. Les porcelets sevrés ont donc une diversité bactérienne intestinale plus importante à J21, l'influence d'un sevrage ultra-précoce s'observe ainsi au bout de 14 jours. Avec la lactation (G4), la flore intestinale des porcelets semble sélectionnée entre J7 et J28 pour former une population homogène entre les porcelets, ce qui est conforme avec la littérature (Thompson et al., 2008). L'apport des bactéries du lait tel que les lactobacilles influence la colonisation de la lumière intestinale. Dans le même temps, les anticorps du lait maternel, *via* leur large profil, vont cibler les bactéries intestinales et permettre leur contrôle en maintenant une pression de sélection (Corthesy, 2007; Suzuki et al., 2007). Après J21, avec la synthèse propre des anticorps endogènes, les porcelets G1 présenteront probablement une flore intestinale plus proche de celle des porcelets G4 une fois sevrés.

Ces observations sont cependant à confronter à un biais expérimental. En effet, le premier aliment donné aux porcelets G1 est le cremandine (Annexe 5). Cet aliment contient un antibiotique, la colistine, ciblant les bactéries du genre *Pseudomonas* et *E. coli* (gram négatif) particulièrement. Il permet une protection nécessaire des porcelets après un sevrage à 7 jours mais influence donc l'installation de la flore intestinale. Sa prise, de J7 à J14, induit donc un biais dans notre analyse. L'antibiotique doit cependant freiner l'installation d'une certaine flore intestinale entre J7 et J14 or les profils ne mettent pas de perturbations en évidence durant cette période. Pourtant, 7 jours plus tard, l'antibiotique n'est plus actif et l'on observe pour G1 une flore plus diversifiée que G4. L'influence du lait maternel semble donc prépondérante face à l'action mineure de l'antibiotique.

Les porcelets ayant un intestin stérile à la naissance, l'installation de la flore est dépendante de l'environnement. Ce dernier est commun aux porcelets d'une même portée ce

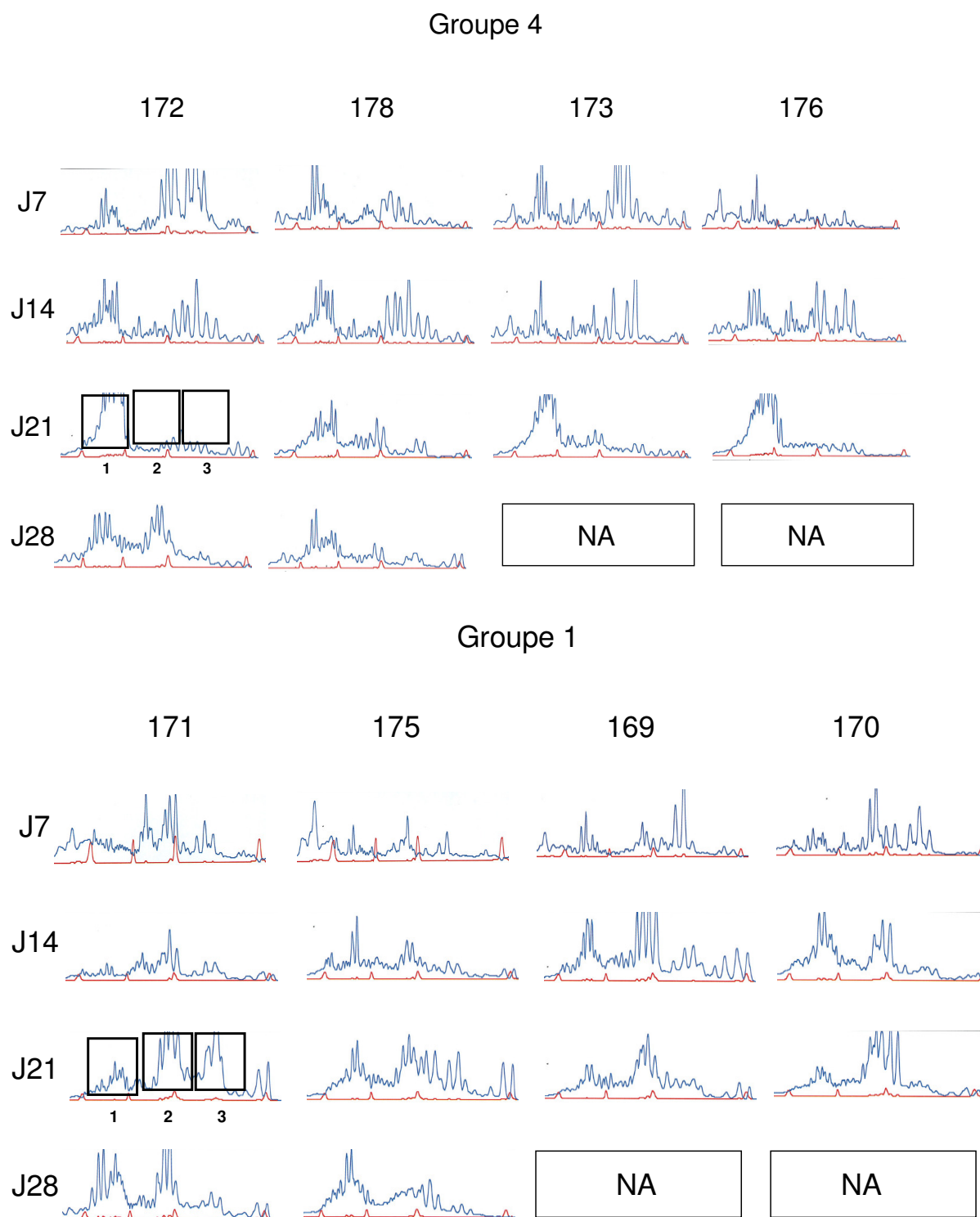


Figure 11a : Analyse cinétique de la population bactérienne des fèces de porcelets LW sevrés à 7 jours (G1) ou non sevrés (G4).

Les fèces sont analysées aux jours 7, 14, 21 et 28. Les profils sont définis par les propriétés de migration des produits PCR. Les porcelets sont issus d'une même portée, les données pour seulement 4 porcelets sont représentées. NA : Not Available. Les cadres noirs représentent 3 zones de pics nommées 1, 2 et 3. Les numéros 17X représentent les porcelets LW.

qui limite l'influence de ce paramètre. Il faut noter que les bactéries présentes dans l'environnement durant les premiers jours influencent le développement du système immunitaire intestinal (Mulder et al., 2009). A J7 comme à J14, la colonisation de l'intestin semble aléatoire et ainsi très variée, ceci est dû aussi à la diversité des bactéries de l'environnement (lait, fèces, sol) pourtant commun aux porcelets (Thompson et al., 2008). Nous avons donc montré une composition bactérienne différente entre les porcelets ce qui doit avoir des conséquences sur la stimulation du système immunitaire (Bailey et al., 2005b; Butler et al., 2002; Macpherson and Harris, 2004). La concentration en IgA sérique a ensuite été mesurée de J7 à J28 chez ces porcelets (Annexe 6). Aucune cinétique ne confirme clairement le résultat obtenu chez les porcelets HC. La tendance d'un déficit entre J14 et J21 est visible pour les LW sevrés à 7 jours alors que les porcelets MS ne présentent aucune différence avec des valeurs faibles en IgA sérique. Les porcelets MS semblent donc un modèle particulier chez qui le sevrage ultra précoce ne crée pas de déficit en IgA alors que la flore des porcelets G4 est très diverse à J21 (Figure 10b). Il aurait cependant été intéressant d'analyser les différents pics des profils de SSCP par clonage et séquençage de ces produits PCR. Une autre technique, basée sur le même principe, comme la *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) permet grâce au gel 2D de récupérer directement les produits de PCR séparés et facilite ainsi le séquençage. Cette alternative serait donc une analyse complémentaire intéressante. La composition de la flore intestinale est un domaine d'étude développé ces dernières années avec la perspective d'améliorer la physiologie et l'immunologie intestinale. L'analyse de la flore du jéjunum, plus pauvre, n'a cependant pas révélé d'effet sevrage alors que la flore du colon montrait des profils concordant à ceux des fèces. L'étude en cinétique de la flore permet d'observer son évolution et ainsi de mieux appréhender les modifications à court, moyen ou long terme engendrées par la condition expérimentale testée, le sevrage en l'occurrence.

Au vu des résultats obtenus chez les porcelets HC, l'abattage des porcelets à J21 semblait judicieux pour bien observer le déficit IgA dans les tissus. Nous avons abattus deux porcelets par groupe et par portée à J21 (8 porcelets au total). Les cinétiques en IgA sériques (Annexe 6) n'ont pas été encourageantes pour l'observation de ce déficit. Cependant, les LPL, IEL et les lymphocytes du MLN de 4 de ces porcelets (deux G1 et deux G4) ont été purifiés pour analyser leur transcriptome. Avec n=2, aucune exploitation claire des résultats n'est possible mais l'IL17 était de nouveau plus exprimée chez les porcelets G1 comme observé chez les porcelets HC.

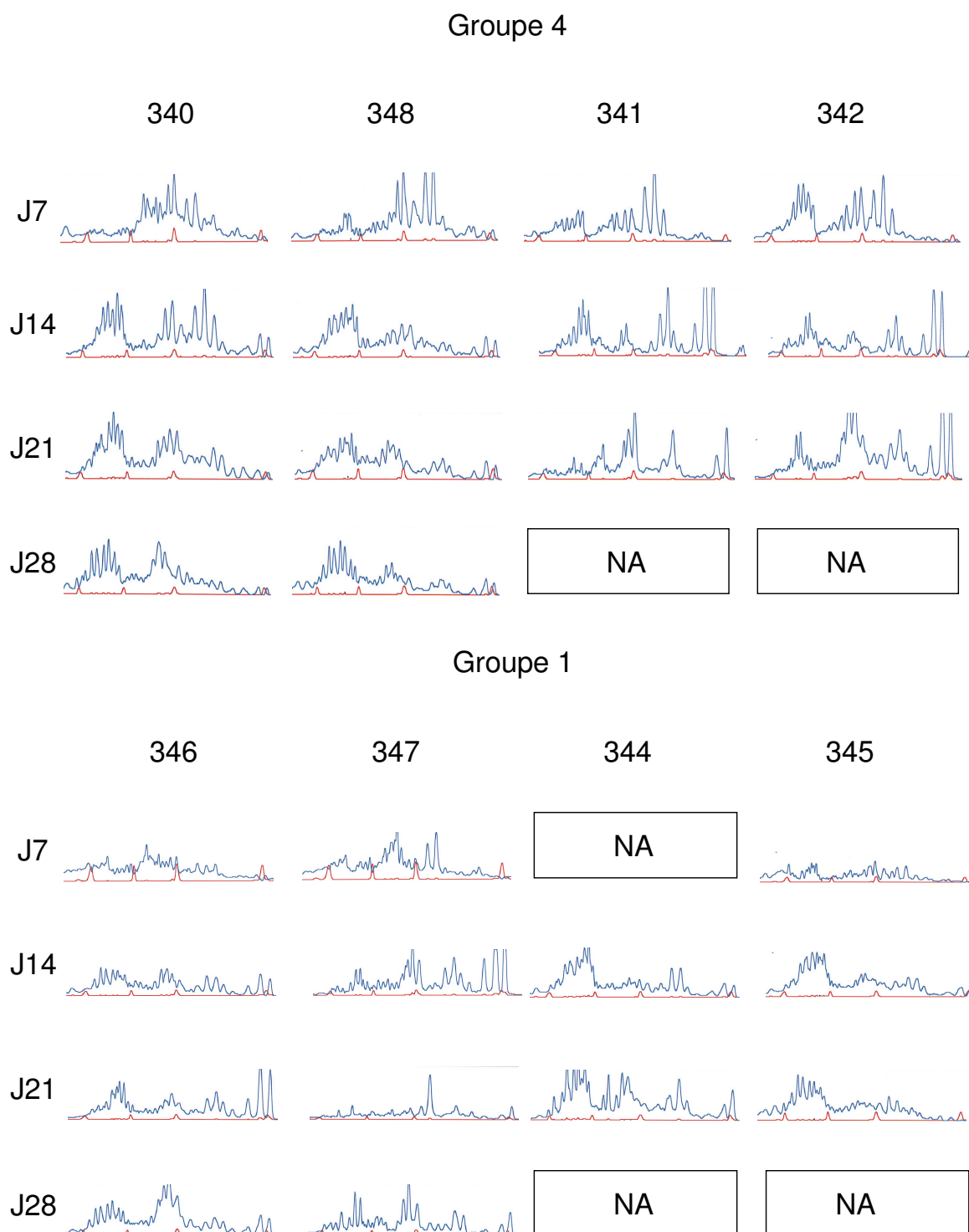


Figure 11b : Analyse cinétique de la population bactérienne des fèces de porcelets MS sevrés à 7 jours (G1) ou non sevrés (G4).

Les fèces sont analysées aux jours 7, 14, 21 et 28. Les profils sont définis par les propriétés de migration des produits PCR. Les porcelets sont issus d'une même portée, les données pour seulement 4 porcelets sont représentées. NA : Not Available. Les cadres noirs représentent 3 zones de pics nommées 1, 2 et 3. Les numéros 34X représentent les porcelets MS.

3.2. Influence du sevrage ultra-précoce sur la réponse immunitaire intestinale spécifique d'un antigène bactérien

3.2.1. Introduction

Le sevrage pratiqué précocement provoque un changement brutal de l'environnement. Avec la naissance, le sevrage est une période très stressante dans la vie du porcelet. Cependant, la prise de colostrum et du lait est essentielle permettant une protection du porcelet efficace grâce notamment aux anticorps IgA et IgM polyréactifs de la mère, recouvrant la flore commensale. Les structures de l'immunité active des porcelets se développent autour de 21 jours, le sevrage est pratiqué classiquement à 3 ou 4 semaines activant l'immunité intestinale des porcelets. Cependant, dans les élevages intensifs, les objectifs de rentabilité ont conduit à sevrer plus précocement certains porcelets surnuméraires. Notre étude précédente (article 2) a révélé que le sevrage ultra précoce conduisait à un déficit en IgA sériques autour de 21 jours qui peut s'accompagner d'une modification de la flore intestinale (résultat précédent, non publié). La question est de savoir si les porcelets sevrés ultra précocement répondent localement au contact d'un antigène de bactérie donnée par voie orale.

Le but de cette étude est d'observer, sur la base du protocole précédent, l'influence du sevrage sur la réponse immunitaire intestinale spécifique d'un antigène. CS31A est une protéine hétéro-polymérique appartenant à la famille des *fimbriae* exprimée par un plasmide et présente à la surface de la bactérie recombinante. CS31A a été décrite chez des *E. coli* enteropathogènes chez l'homme et certains animaux (Girardeau et al., 1988). Les porcelets ont donc été sevrés à différents moments et immunisés oralement avec une bactérie *E. coli* (non pathogène) sur-exprimant la protéine CS31A. Pour des raisons pratiques, l'expérimentation a été conduite sur des porcelets LW.

3.2.2. Matériel et méthodes

Les bactéries, anticorps et la protéine purifiée CS31A utilisés dans cette étude nous ont été donnés par le laboratoire de microbiologie de l'INRA de Theix.

Animaux et collection des tissus :

Deux portées représentant 18 porcelets Large-White (LW) pour 2 mères ont été utilisés pour cette expérimentation. Les porcs sont issus d'un élevage sain de l'INRA (Nouzilly, France) et ont été élevés comme décrit dans le protocole précédent. Cinq groupes de porcelets ont été constitués (Figure 11). Dans chaque groupe, les porcelets sont d'origine croisée pour éviter l'effet mère. Une prise de sang a été effectuée à 7, 14, 21 et 28 jours avec des tubes BD vacutainer siliconé (BD diagnostics, Franklin Lakes, USA) pour une analyse sérique. Après coagulation à température ambiante, les échantillons de sang sont centrifugés à 2000g pendant 10 min, les sera sont stockés à -20°C.

Préparation des *E. coli* et immunisation orale des porcelets :

Les bactéries *E. coli* K12 sont cultivées 14h dans du milieu LB en présence de chloramphénicol (25µg/ml) pour la souche CS31A+ (Zimowska et al., 2002). Après lecture de la densité optique (DO) et l'évaluation de la concentration en bactérie (1DO = 10⁸ bactéries), les bactéries sont lavées dans du PBS et le culot est finalement repris dans 2 ml de PBS. La suspension de bactéries est ensuite transférée dans une seringue équipée d'une canule d'ingestion. 3 heures avant l'ingestion orale, les porcelets sont isolés dans un box et mis à la diète hydrique. Après ingestion, les porcelets sont maintenus 3h dans le même box, toujours privés de nourriture. Enfin, les suspensions bactériennes ont été contrôlées par dénombrement sur boîtes de Pétri gélosées, en milieu LB.

Analyse des sera par ELISA

Des ELISA « sandwich » sont réalisés avec les sera prélevés à J7, 14, 21 et 28 (Fig. 1). Comme précédemment (article 2) les IgA totaux ont été dosés avec le kit Bethyl. Les quantités en IgA et IgG anti-CS31A ont été analysées avec un protocole adapté à partir d'une technique déjà décrite (Zimowska et al., 2002) : l'anticorps de capture, anti-CS31A produit chez le lapin (Girardeau et al., 1988) est coâté sur plaque ELISA (NUNC) pendant 1h après dilution au 1/100 dans un tampon de coating (phosphate-carbonate 0.05%). Après lavage, un tampon de saturation (Tris 50mM, NaCl 0.14M, BSA 1%, pH8) est ajouté pendant 1/2h puis

les puits sont lavés 3 fois. Ensuite, la protéine CS31A (5µg/ml) purifiée (Mechin et al., 1996) est incubée dans les puits durant 1h et les puits sont lavés. L'étape suivante consiste à incuber les échantillons ou l'anticorps de lapin comme contrôle positif, pendant 1h. Après lavage, les anticorps secondaires sont déposés pendant 1h, anti-pig IgA ou IgG et anti-rabbit tous couplés à l'HRP. Finalement, la substrat ABTS est ajouté 1/2h dans l'obscurité et la DO lue à 414nm.

3.2.3. Résultats - discussion

Dans cette dernière partie, nous avons étudié l'influence du sevrage précoce sur le développement d'une réponse immunitaire intestinale spécifique d'un antigène bactérien, en l'occurrence la protéine de surface CS31A, exprimée par un *E. coli* de laboratoire non pathogène. L'étude de la réponse immunitaire a été faite en cinétique de J7 à J28. L'analyse des IgA totaux (Figure 12), en contrôle, ne confirme pas la déficience en IgA obtenue sur les porcelets HC à J21 (article 2). La cinétique montre au contraire que les IgA sont synthétisés plus tard, à partir de J21 au lieu de J14 et de manière plus importante pour G1 et G2. Les porcelets non sevrés (G4) et G3 présentent une synthèse endogène entre J21 et J28, la concentration en IgA devenant stable au lieu de décroître ; cette synthèse est cependant moins importante que dans les autres groupes G1 et G2. Il faut noter que le protocole est légèrement différent entre les deux expérimentations (HC *versus* LW) puisque ici une immunisation orale est faite aux porcelets, modifiant peut être leur flore. L'autre possibilité est d'observer un biais sur l'immunisation à 7 jours d'une bactérie à Gram négatif avec l'utilisation de colistine jusqu'à 14 jours pour les porcelets sevrés ultra-précocement.

De plus les analyses ELISA des sera montrent que les titres anticorps en IgA et IgG spécifiques sont plus faibles à partir de J21 lorsqu'un sevrage précoce (à J7-J14) est pratiqué (Figure 13). Les cinétiques IgA et IgG sont cependant différentes entre J21 et J28 ; alors que le titre anticorps continue d'augmenter pour les IgG, ce dernier diminue pour les IgA. Cependant, l'effet sevrage est clairement observé, à J21 comme à J28, avec une corrélation entre la valeur des titres anticorps et le jour de sevrage : plus le sevrage est précoce (G1 et G2) et plus le titre anticorps est faible. La cinétique obtenue pour les IgG permet de faire une régression linéaire entre J14 et J28. Les deux droites de régression ont une pente différente ($P=0.03$) confirmant ainsi l'effet négatif d'un sevrage précoce sur les IgG sériques. L'analyse des IgA ne pouvant se faire avec des droites de régression linéaire (r carré très faible), un test de mann-Whitney montre à J21 comme à J28 que les valeurs pour G3-G4 sont significativement supérieures à celle de G1-G2 (Figure 13). En conclusion, un sevrage ultra-

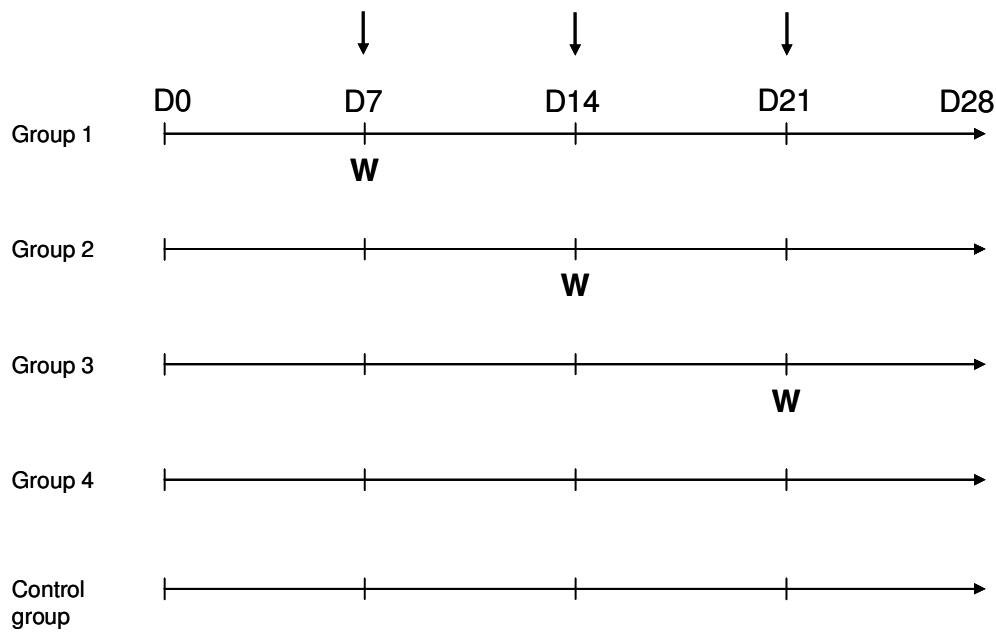


Figure 12 : Schéma expérimental du sevrage et de l'immunisation des porcelets LW.

Les 4 groupes sont définis en fonction de leur date de sevrage (W) à 7, 14, 21 et 28 jours. Les flèches représentent les jours d'immunisation avec 10^8 CFU de la souche CS31A+ ou de la souche contrôle (control group). D : Days.

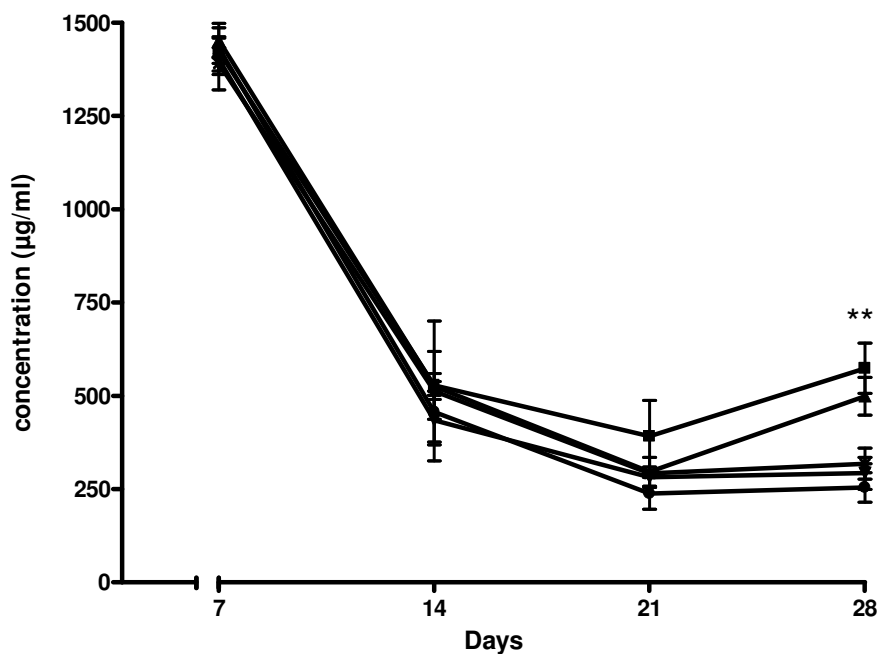


Figure 13 : Cinétique de la concentration sérique en IgA chez les porcelets LW immunisés.

Les 5 groupes sont représentés, G1 (■) ; G2 (▲), G3 (▼), G4 (●) et le groupe contrôle (*). L'analyse statistique a été faite par test Mann-Withney, G1 et G2 diffèrent de G3 et G4.

précoce a une incidence négative sur la réponse immunitaire intestinale IgA spécifique. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus sur les porcelets HC, en conditions physiologiques (article 2) ; les facteurs du lait doivent favoriser le développement de la réponse immunitaire intestinale IgA spécifique.

Le développement d'une réponse spécifique locale et systémique a donc bien lieu chez les porcelets, entre J14 et J21, et ce même si un sevrage précoce est pratiqué. La réponse systémique était attendue conformément aux données de la littérature après immunisation de souris avec la même bactérie et par voie orale (Zimowska et al., 2002). Ceci sous-entend une translocation de la bactérie CS31A au-delà du MLN (Macpherson and Smith, 2006). La protéine ayant été décrite chez certains pathogènes, elle permet probablement l'adhésion et/ou la translocation de la bactérie mais n'induit pas de véritable pathogénicité dans notre modèle. Une analyse de la flore intestinale et fécale aurait été intéressante pour contrôler les perturbations dues à l'immunisation et ainsi évaluer les possibles conséquences pour le système immunitaire intestinal. De même, le MLN et surtout la rate pourraient être analysés par biologie moléculaire pour détecter la présence d'ADN codant la protéine CS31A et une protéine du peptidoglycan. La proportion de bactéries transloquées pourrait expliquer les effets opposés du sevrage sur la réponse IgA spécifique et sur la réponse IgA totale de cette expérimentation. La cinétique obtenue pour les IgA est surprenante avec une diminution du titre anticorps entre J21 et J28. La production d'anticorps autour de J21 a peut-être suffi pour bloquer et éliminer les bactéries CS31A+, limitant ainsi la stimulation des sites effecteurs de l'intestin. L'influence du sevrage précoce sur la réponse anti-CS31A semble quantitative. Pour analyser la qualité de la réponse générée dans les 2 groupes de porcelets, la purification des lymphocytes B sanguins spécifiques de CS31A aurait été nécessaire. L'analyse du répertoire de cette population est une possibilité quant à l'évaluation de l'influence qualitative du sevrage ultra précoce sur la réponse immunitaire intestinale spécifique. Le manque de protéine CS31A purifiée ne m'a pas permis d'approfondir l'analyse des anticorps présents dans la lumière intestinale voire même de la bile (Macpherson et al., 2001) où les lymphocytes intestinaux peuvent sécréter des IgA spécifiques après un *homing* vers le foie.

Deux autres études permettraient de compléter l'étude du sevrage précoce sur la réponse immunitaire intestinale, l'immunisation avec un antigène alimentaire type ovalbumine (Miller et al., 1984) et une immunisation avec un agent pathogène, virus local (TGEV, (Charley et al., 2006)) ou bactérie (K88).

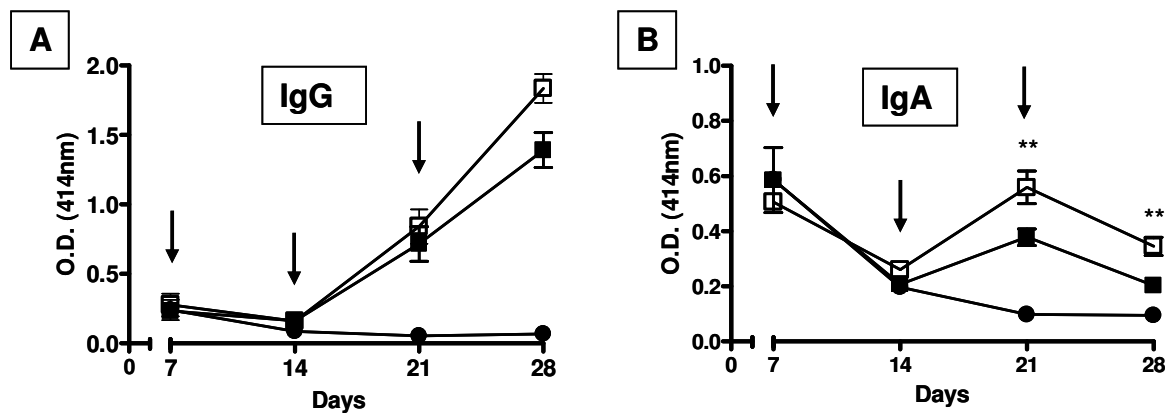


Figure 14 : Cinétique d'apparition des IgG et IgA spécifiques de CS31A.

Les flèches représentent les jours d'immunisation avec la souche CS31A+ ou avec la souche contrôle (control group). D'un point de vue statistique, les différences entre les 4 groupes ne sont pas significatives (figure non montrée). Ceci nous a autorisé à regrouper les groupes G1 et G2 en un seul groupe « sevrage précoce » (en carrés noirs ■) et regrouper les groupes G3 et G4 en un seul groupe « sevrage tardif » (en carrés blancs □). Le groupe contrôle est en ronds noirs (●). Les valeurs pour les IgG (A) ont été analysées par régression linéaire et par test Mann-Whitney pour les IgA (B).

Troisième partie :
Conclusions - Perspectives

Au vu des résultats présentés dans ce mémoire, certains objectifs de la thèse ont donc été atteints. Au cours de cette thèse, j'ai pu mettre en évidence des conséquences négatives du sevrage ultra précoce chez le porcelet. Le sevrage avant 21 jours réduit la concentration en IgA et IgM sériques totaux ainsi que l'intensité de la réponse spécifique à un antigène bactérien. L'analyse transcriptomique du MLN ainsi que l'étude, dans les premières semaines, de la flore intestinale nous amène à l'hypothèse suivante :

Lors d'un sevrage ultra précoce, la détérioration de la muqueuse intestinale ainsi que l'absence des Ig maternelles favoriseraient l'installation d'une flore diverse ainsi que la translocation de celle-ci à travers la barrière intestinale jusque dans le MLN. La présence de cette flore augmente probablement, dans le MLN, les expressions en cytokines ainsi que le répertoire IgA des lymphocytes B. Cette diversification des IgA, qui peut paraître positive, ne serait donc qu'un reflet des conséquences négatives du sevrage précoce. De plus, l'absence des facteurs de maturation présents dans le lait donne lieu à une stimulation moindre de la réponse immunitaire intestinale, symbolisée par des concentrations plus faibles en Ig sériques. Les résultats obtenus font du sevrage ultra précoce, chez le porcelet HC particulièrement, un bon modèle permettant de travailler sur la stimulation du système immunitaire intestinal.

Mon travail de thèse ne permet pas de conclure directement sur le mécanisme du déficit de la réponse immunitaire intestinale, et donc de désigner les sites inducteurs ou effecteurs comme déficients. Les conséquences du sevrage affectent d'ailleurs probablement tous les compartiments de la réponse immunitaire intestinale, du fait du stress mécanique que subit l'intestin lors du changement de nourriture, notamment par réduction de la hauteur des villosités (Orgeur et al., 2001). Il faut donc bien noter que le sevrage n'est pas qu'une composante immunitaire mais un ensemble de facteurs biologiques. La solidité, granulométrie de l'aliment, le stress de la séparation de la mère vont aussi influencer sur la réponse immunitaire intestinale. Cependant, la réduction du déficit IgA provoqué par un sevrage à 7 jours nécessite une action soit sur l'initiation de la réponse immunitaire intestinale (LB naïfs des PP et MLN) soit sur la migration et la différenciation des plasmocytes à IgA.

Voici la principale perspective qui peut être envisagée, un travail sur la maturité des cellules (lymphocytes et DC) isolées chez les porcelets sevrés à 7 jours. L'hypothèse consiste à considérer les cellules isolées à J21 d'un porcelet sevré à J7 comme plus matures ou immatures que celles d'un porcelet non sevré. Nous sommes donc bien ici dans une analyse qualitative et non quantitative des cellules responsables de la réponse immunitaire de

l'intestin. Si l'on se base sur l'analyse des DC et LB du MLN par exemple, la question est de savoir si les DC sont capables d'induire une réponse IgA et si les LB ont la capacité, même *in vitro*, de se différencier en plasmocytes. Ce test *in vitro* était un objectif initial de la thèse mais nécessitait un protocole pour montrer une induction de la réponse IgA. Pour cela la co-culture de ces cellules peut s'avérer intéressante. Nous possédons au laboratoire une lignée de lymphocytes B, les L14 (Kaeffer et al., 1991) n'exprimant que des BCR IgM+ (Figure 15).

L'action sur les sites inducteurs peut s'envisager avec différentes molécules ou organismes. 1) TGF et IL10. Ces deux molécules agissent en synergie pour l'induction du switch IgA (Hummelshoj et al., 2006). Le TGF a de nombreux autres effets biologiques sur les cellules épithéliales (Goldman et al., 1996). Ces deux molécules pourraient donc agir au niveau des plaques de Peyer et ainsi favoriser l'activation efficace des lymphocytes B. 2) La vitamine A. Cet oligo-élément est déjà présent en quantité dans l'alimentation des porcelets, que ce soit dans le lait ou en complément alimentaire dans les granulés. Mais son effet positif sur les lymphocytes IgA+ est très étudié aujourd'hui (Mucida et al., 2007; Sun et al., 2007; von Boehmer, 2007), peut être qu'un dosage plus important pourrait être étudié (sans toxicité) pour optimiser les premières étapes de la réponse immunitaire intestinale. 3) La flore naturelle. Comme indiqué dans l'introduction, certaines bactéries commensales ont un rôle dans le métabolisme intestinal ; l'objectif serait donc d'uniformiser la flore après sevrage avec des lactobacilles aux propriétés immunomodulatrices. De même, les levures sont des organismes très étudiés aujourd'hui pour leur capacité à stimuler le système immunitaire intestinal (Zanillo et al., 2009). Ces organismes sont désignés comme immunoprotectifs. L'objectif de la recherche dans ce domaine est de créer ou modifier génétiquement ces organismes afin d'optimiser leur pouvoir stimulant. Ainsi, des bactéries sur-exprimant IL10 ont déjà été créées (Steidler et al., 2003). Pour agir sur le *homing* des plasmocytes, la sécrétion de chimiokines comme CCL25 peut être envisagée. Si la protéine est transportée dans la *lamina propria*, alors un gradient pourrait se former et renforcer le mécanisme constitutif. La synergie de ces différents mécanismes pourrait ainsi compenser efficacement le déficit immunitaire engendré par le sevrage. Ces différentes possibilités d'immunostimulation agissent sur différents mécanismes et étapes de la réponse immunitaire intestinale. Cependant, la validation de ces outils *in vitro* peut s'avérer nécessaire, notamment la bonne expression (forme membranaire ou sécrétée) des molécules d'intérêt par les cellules.

L'analyse qualitative du répertoire IgA des lymphocytes a été étudiée dans ce travail de thèse, mettant en évidence une diversification du répertoire IgA dans le MLN après un

sevrage ultra précoce. En lien avec ce résultat, il serait intéressant d'analyser le répertoire des lymphocytes T. La diversification plus ou moins importante de ce répertoire pourrait alors renforcer ou non le mécanisme T dépendant de la réponse immunitaire intestinale. De même, des zones T étant présentes dans les PP jéjunales (IFR) et dans le MLN, il serait intéressant de comparer le répertoire des populations T présentes dans chacun de ces tissus. Ce travail est théoriquement plus complexe du fait de la plus grande diversité des gènes germinaux codant pour les TCR. De plus, l'analyse du répertoire TCR, très utilisée chez l'homme (Baron et al., 2001; Salameire et al., 2009; Velasquez et al., 2009), est bien moins décrite chez le porc (Uenishi et al., 2009). L'analyse qualitative des lymphocytes IgA⁺ a aussi pu se faire sur les PP jéjunales et le MLN avec l'observation des follicules B mais le nombre de lymphocytes n'a pas été évalué dans les deux cas.

Le MLN représente le centre de l'immunité intestinale (Macpherson and Smith, 2006). C'est dans ce tissu, et non dans les PP, que nous avons finalement observé les perturbations dues au sevrage précoce. Le prolongement du travail sur la réponse immunitaire intestinale spécifique d'un antigène pourrait se décomposer selon deux axes : une étude sur le transfert de l'immunité passive spécifique de l'antigène mais aussi le développement de la tolérance orale chez les porcelets en fonction de leur date de sevrage. Les lymphocytes Treg et les DC du porc sont décrits (Pilon et al., 2009; Summerfield and McCullough, 2009) et permettraient d'étudier leur rôle dans la régulation de la réponse IgA. La caractérisation de ces cellules ouvre aussi la voie au travail *in vivo* par transfert cellulaire chez les porcs HC SLAd/d.

L'action sur les sites effecteurs a été moins évidente à mettre en valeur. L'observation de la *lamina propria* (LP) en immunohistochimie a été difficile à cause de la qualité de mes coupes, ne présentant que quelques villosités. Les plasmocytes IgA auraient pu être quantifiés. On sait cependant que leur répertoire n'est pas différent entre les différents groupes de porcelets (résultat non montré). Cependant, la maturation des lymphocytes T de la LP a été envisagée avec une purification et une analyse par biologie moléculaire. Outre les plasmocytes à IgA, des lymphocytes T sont présents dans la LP (LPL) et dans l'épithélium (IEL). La méthodologie de purification de ces cellules est connue (Bourges et al., 2007; Solano-Aguilar et al., 2000) et permettrait de contrôler leur état de maturation en fonction de la date de sevrage. La qPCR permet alors une analyse large des gènes exprimés, la cytométrie de flux étant bien sûr plus intéressante dans la mesure où nous possédons les anticorps d'intérêt.

Le porc est donc un modèle d'étude des pathologies humaines appelé à se développer. Le développement de protocole et modèle expérimentaux s'avère donc nécessaire. Pour observer les mécanismes biologiques d'un pathogène ou de son traitement, il est souvent nécessaire de normaliser et simplifier le modèle. Dans mon travail de thèse, j'ai tenu compte dans mes protocoles, sans les éliminer, des biais que présente un élevage classique de porc. Les truies présentent une variation dans la qualité (tableau 2, introduction) et la quantité de leur lait. De même, les porcelets n'ont pas accès aux mêmes mamelles et la tétée n'est ainsi pas normalisée. De plus, l'utilisation de l'antibiotique colistine par voie orale (visant les bactéries à Gram négatif) chez les porcelets sevrés à 7 jours a pu influencer la comparaison entre les groupes. Il aurait été intéressant d'étudier le sevrage ultra-précoce sans traitement antibiotique, au risque d'augmenter la mortalité des porcelets sevrés à 7 jours. La recherche porcine nécessite donc, pour évoluer, des techniques et structures que l'on trouve surtout chez la souris. L'élevage en zone confinée paraît essentiel. Ceci est le point de départ pour deux outils essentiels.

1) Les porcs transgéniques. La technique est connue depuis longtemps mais elle est utilisée principalement pour la santé humaine (Lee et al., 2009; Petersen et al., 2009) et encore peu pour la recherche fondamentale sur le porc. Des porcs intégralement fluorescents (gène exprimé sous un promoteur ubiquitaire) faciliteraient le travail de transfert cellulaire ou de greffe (Kawarasaki et al., 2009). L'étude de la transmission des cellules du lait au porcelet, la greffe de cellules dendritiques intestinales seraient ainsi facilitées. L'obtention de porcs transgéniques immunodéficients, Jh^{-/-}, RAG^{-/-} permettraient de transposer les conclusions obtenues avec la souris chez le porc et ainsi de mieux appréhender l'immunité lactogène (IgA et IgM) du porc.

2) Les porcs germ-free (Butler and Sinkora, 2007). La technique est utilisée depuis longtemps maintenant mais nécessite des installations importantes (isolateurs, salle d'opération). Le système simplifié de l'intestin qui en résulte permet de tester différents probiotiques. Les porcelets gnotobiotiques que l'on peut créer présentent ainsi une flore homogène, standardisée, limitant les biais expérimentaux. L'étude de bactéries est envisageable et notamment leur évolution dans un environnement naturel simplifié.

En tant que modèle, le porc peut être utilisé pour d'autres études. Deux sont particulièrement importantes dans le cadre de cette thèse.

1) La tolérance alimentaire. La figure 21 de l'annexe 5 montre une composition alimentaire classique pour les porcelets. Une céréale y est notamment en quantité importante, le soja. Le soja possède des protéines allergéniques et présente donc un intérêt de santé publique. L'étude de la réponse spécifique aux protéines de soja chez le porc peut donc être une voie de recherche intéressante (Dreau et al., 1994).

2) L'effet race. Nous avons pu voir (annexe 6) que les porcelets Meishan (MS) résistaient mieux au sevrage précoce que les porcelets LW et surtout HC avec une concentration normale en IgA sériques totales. Les porcelets HC sont donc un très bon modèle pour étudier un déficit immunitaire alors que les porcs MS doivent être étudiés pour leur résistance immunitaire face au sevrage. Tout d'abord, les porcelets MS fouillent le sol et commencent à goûter à la nourriture solide dès 14 jours anticipant ainsi le sevrage. De plus, le lait des truies MS est beaucoup plus gras que celui des autres truies. Ceci est un avantage énergétique pour les porcelets qui peut être mis en relation avec la réponse immunitaire. La mise en place d'une réponse immunitaire intestinale a un coût énergétique que les porcelets MS pourraient mieux assumer. Une expérience essentielle serait alors de faire des adoptions croisées entre une portée MS et une portée HC. Les résultats permettraient de distinguer le facteur « lait maternel » et le facteur « potentiel génétique des porcelets ».

Pour un élevage, le sevrage ultra précoce est un enjeu stratégique et économique. Les pertes d'un élevage sont principalement dues au sevrage et aux maladies qui en découlent. Renforcer l'immunité du porcelet pendant les premières semaines de vie des porcelets est donc essentiel. Avec la pratique du sevrage ultra-précoce sur les porcelets surnuméraires pour optimiser le nombre de porcelets produits par truie, l'effet négatif du sevrage est amplifié, justifiant ce travail de thèse. L'aspect dynamique d'une potentielle infection est essentiel selon que les porcelets sont infectés avant ou après leur sevrage (Figure 17). Le déficit chez ces porcelets n'est pas seulement immunitaire, il est aussi nutritif. Certains porcelets, trop chétifs ne pourront jamais rattraper le retard pris dans leur croissance au même titre qu'un « culot de portée ». Les compléments nutritifs, pré et pro-biotiques et la vaccination des porcelets sont donc aussi un enjeu important pour pallier l'interdiction d'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation.

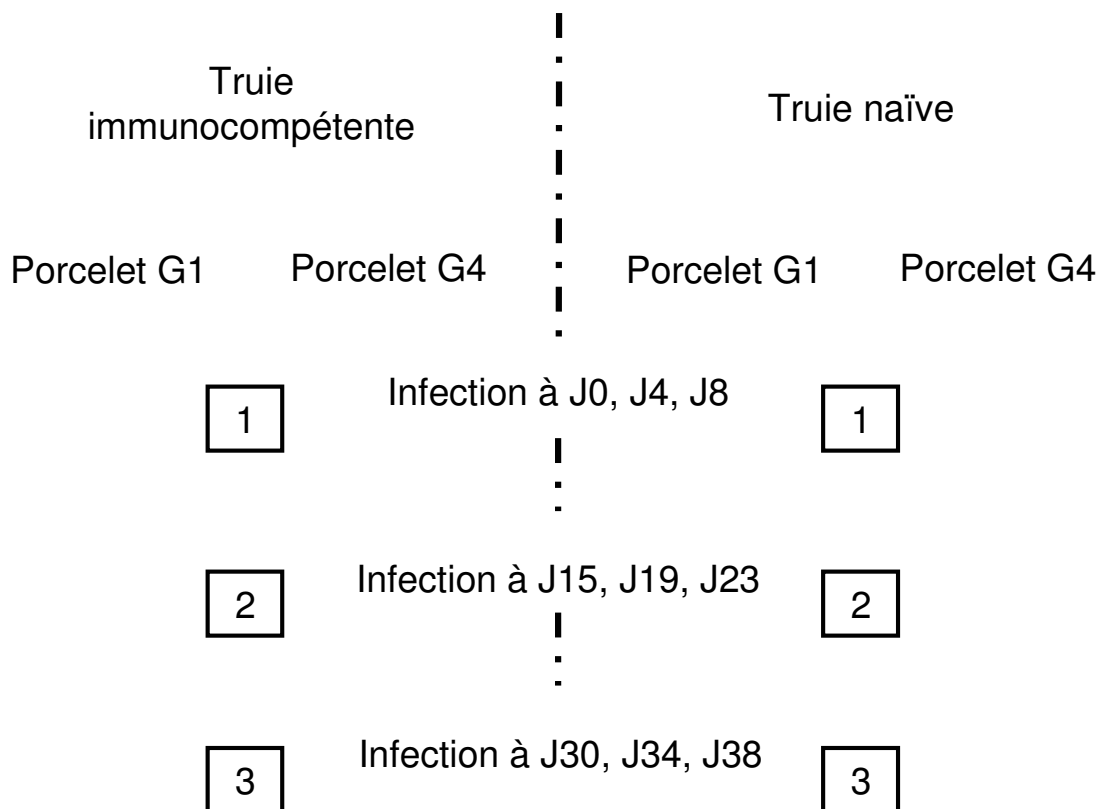


Figure 17 : Aspect dynamique d’une infection expérimentale lors d’un sevrage précoce ou tardif.

Le modèle expérimental proposé présente une infection des porcelets répétée tout les 4 jours. Trois paramètres pourraient ensuite être analysés : Le statut immunitaire de la truie, la date de sevrage des porcelets (G1 à J7 et G4 à J28) et le moment de l’infection (1,2,3 : pré- ou post-sevrages).

Quatrième partie :

Travail annexe

1. CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1

PILON C., LEVAST B., MEURENS F., LE VERN Y., KERBOEUF D., SALMON H., VELGE-ROUSSEL F., LEBRANCHU Y., BARON C. *Article publié, voire annexe 7.*

L'orientation de la réponse immune Th1, Th2, Th17 ou Treg joue un rôle important dans la tolérance et la défense face aux pathogènes ou tumeurs. Cependant, cette orientation n'est pas encore bien caractérisée chez le porc et les stimuli de maturation, la capacité des DCs à induire ces différents types de réponses Th, sont encore mal connus. La maturation des DCs peut être induite par différents agents comme les cytokines inflammatoires, les ligands TLR et le CD40L. Cependant le rôle de ce dernier dans la maturation des DCs n'a jamais été étudié. Cette étude consiste en l'analyse des agents de maturation par leur influence sur la capacité des DC à orienter la réponse immunitaire. Des DCs dérivées de monocytes ont été maturés en présence de cellules transfectées exprimant le CD40L humain, du lipopolysaccharide (LPS) seul ou du LPS combiné avec du *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α) et de l'interféron-alpha (IFN α). Les résultats montrent que le CD40L humain induit une maturation des DC caractérisée par une augmentation de l'expression de co-stimulation CD80/86, une forte production de IL-12p40 par les DCs et induction des ARNm IFN γ et Tbet chez les cellules T, suggérant une orientation Th1. De plus, il a été observé pour la première fois une apparition de l'expression de CD25 après activation des DC porcines. Les DCs activées avec TNF + LPS + IFN montrent la plus grande capacité d'allo-stimulation sur des lymphocytes allogéniques et induisent l'expression de l'ARNm IL17 dans les lymphocytes T, suggérant une orientation TH17 qui n'avait encore jamais été décrite chez le porc. D'autres résultats montrent que les DCs immatures ne produisent pas d'IL10 ou d'IL12 mais induisent la transcription de GATA3 et IL13 lors de MLR allogénique, marqueurs d'une orientation Th2. Cette étude met en évidence l'importance de la nature du stimulus qui influence la capacité de DCs à diriger la réponse immunitaire chez le porc.

J'ai effectué le travail d'analyse RT-qPCR sur cette étude. Avec une meilleure connaissance des DC porcines (Summerfield and McCullough, 2009) et après avoir travaillé sur l'induction de Treg (Pilon et al., 2009), l'étude a été orientée sur les Treg et la voie Th17.

2. Inhibition of TGF β -induced Th17 differentiation by rapamycin favors induction of regulatory T cells

PILON C., LEVAST B., MEURENS F., SALMON H., VELGE-ROUSSEL F., LEBRANCHU Y., BARON C.

- Article en cours de rédaction -

Le TGF β a un rôle important dans l'induction des populations Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) et Th17. Le contexte environnemental lors de la stimulation détermine leur polarisation. En utilisant un modèle de stimulation multi-cytokinique, l'induction de Treg a été mise en évidence chez le porc. La stimulation avec la phytohématagglutinine (PHA) et de l'IL2 porcine recombinante, en présence de TGF β induit l'expression de Foxp3 dans 50% des LT CD4⁺ leur conférant ainsi une activité suppressive. L'addition de rapamycine augmente leur activité suppressive. L'analyse par marquage CFSE montre que environ 50% des cellules Foxp3⁺ ne sont pas entrées dans leur cycle de division cellulaire durant la culture, démontrant ainsi que Foxp3 était réellement induit et ne résultait pas d'une expansion de Treg naturels. les Treg Foxp3⁺ induit expriment fortement CD25 et le SLA-DR. Le TGF β induit aussi une augmentation de l'expression en ARNm de l'IL17 et de RORgt, l'addition de l'IL6 augmente cette expression. Au contraire, un effet de la rapamycine a aussi été démontré avec l'inhibition de la transcription de l'IL17. Cette inhibition de l'orientation Th17 par la rapamycine peut expliquer sa capacité à renforcer l'activité suppressive des LT activés en présence de TGF β . Ces résultats suggèrent un effet balance reliant les Treg avec les cellules effectrices de la population Th17.

J'ai également assuré le travail de RT-qPCR sur cette étude. Au final, la différenciation de DC de porc ainsi que des Treg est un outil très intéressant pour mon sujet de thèse. La tolérance orale est un mécanisme essentiel mettant en jeu les DC et les Treg. La caractérisation de ces cellules peut nous servir à évaluer l'effet du sevrage précoce sur le développement de la tolérance orale chez le porcelet.

Bibliographie

- Agace, W.W., 2008, T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol* 29, 514-522.
- Ahmed, S., Macfarlane, G.T., Fite, A., McBain, A.J., Gilbert, P., Macfarlane, S., 2007, Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Appl Environ Microbiol* 73, 7435-7442.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., Normark, S., 2007, Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261, 511-528.
- Allen, W.D.a.P., P., 1977, The relative frequencies and distribution of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. *Immunology* 32, 819-824.
- Artis, D., 2008, Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8, 411-420.
- Aujla, S.J., Dubin, P.J., Kolls, J.K., 2007, Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol* 19, 377-382.
- Aynaud, J.M., Bernard, S., Bottreau, E., Lantier, I., Salmon, H., Vannier, P., 1991, Induction of lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus of swine using an attenuated coronavirus mutant able to survive in the physicochemical environment of the digestive tract. *Vet Microbiol* 26, 227-239.
- Bailey, M., Haverson, K., 2006, The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Vet.Res.* 37, 443-453.
- Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., Miller, B., Stokes, C., 2005a, The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc.Nutr.Soc.* 64, 451-457.
- Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., Miller, B., Stokes, C., 2005b, The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 108, 189-198.
- Bailey, M., Plunkett, F.J., Rothkotter, H.J., Vega-Lopez, M.A., Haverson, K., Stokes, C.R., 2001, Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proc.Nutr Soc.* 60, 427-435.
- Bandrick, M., Pieters, M., Pijoan, C., Molitor, T.W., 2008, Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clin Vaccine Immunol* 15, 540-543.
- Banham, A.H., Powrie, F.M., Suri-Payer, E., 2006, FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 36, 2832-2836.

- Barman, N.N., Bianchi, A.T., Zwart, R.J., Pabst, R., Rothkotter, H.J., 1997, Jejunal and ileal Peyer's patches in pigs differ in their postnatal development. *Anat Embryol (Berl)* 195, 41-50.
- Baron, C., Sachs, D.H., LeGuern, C., 2001, A particular TCR beta variable region used by T cells infiltrating kidney transplants. *J Immunol* 166, 2589-2596.
- Barrera, G.J., Portillo, R., Mijares, A., Rocafull, M.A., del Castillo, J.R., Thomas, L.E., 2009, Immunoglobulin A with protease activity secreted in human milk activates PAR-2 receptors, of intestinal epithelial cells HT-29, and promotes beta-defensin-2 expression. *Immunology Letters* 123, 52-59.
- Beier, R., Gebert, A., 1998, Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol* 275, G130-137.
- Berkeveld, M., Langendijk, P., Soede, N.M., Kemp, B., Taverne, M.A., Verheijden, J.H., Kuijken, N., Koets, A.P., 2009, Improving adaptation to weaning: effect of intermittent suckling regimens on piglet feed intake, growth, and gut characteristics. *J Anim Sci* 87, 3156-3166.
- Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., Butcher, E.C., 1993, Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-195.
- Berri, M., Meurens, F., Lefevre, F., Chevaleyre, C., Zanello, G., Gerdts, V., Salmon, H., 2008, Molecular cloning and functional characterization of porcine CCL28: Possible involvement in homing of IgA antibody secreting cells into the mammary gland. *Mol Immunol* 45, 271-277.
- Berthon, P., Tanneau, G., Salmon, H., 2000, Immune factors of mammary secretions, In: Martinet, J., Houdebine, L.M. (Eds.) *Biology of lactation*. INRA, Paris.
- Bianchi, A.T.J., Scholten, J.W., Moonen Leusen, B.H.W.M., Boersma, W.J.A., 1999, Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Developmental & Comparative Immunology* 23, 511-520.
- Binns, R.M., Licence, S.T., 1985, Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig. *Adv Exp Med Biol* 186, 661-668.
- Bolzer, K., Kaser, T., Saalmuller, A., Hammer, S.E., 2009, Molecular characterisation of porcine Forkhead-box p3 (Foxp3). *Vet Immunol Immunopathol*.
- Boudry, G., Peron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J.P., Seve, B., 2004, Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J Nutr* 134, 2256-2262.
- Bouhlal, H., Latry, V., Requena, M., Aubry, S., Kaveri, S.V., Kazatchkine, M.D., Belec, L., Hocini, H., 2005, Natural Antibodies to CCR5 from Breast Milk Block Infection of Macrophages and Dendritic Cells with Primary R5-Tropic HIV-1. *J Immunol* 174, 7202-7209.

- Bourges, D., Chevaleyre, C., Wang, C., Berri, M., Zhang, X., Nicaise, L., Meurens, F., Salmon, H., 2007, Differential expression of adhesion molecules and chemokines between nasal and small intestinal mucosae: implications for T- and sIgA+ B-lymphocyte recruitment. *Immunology* 122, 551-561.
- Bourges, D., Meurens, F., Berri, M., Chevaleyre, C., Zanello, G., Levast, B., Melo, S., Gerdts, V., Salmon, H., 2008, New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland. *Mol Immunol* 45, 3354-3362.
- Bourges, D., Wang, C.H., Chevaleyre, C., Salmon, H., 2004, T and IgA B lymphocytes of the pharyngeal and palatine tonsils: differential expression of adhesion molecules and chemokines. *Scand J Immunol* 60, 338-350.
- Bowman, E.P., Kuklin, N.A., Youngman, K.R., Lazarus, N.H., Kunkel, E.J., Pan, J., Greenberg, H.B., Butcher, E.C., 2002, The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *J Exp Med* 195, 269-275.
- Brandtzaeg, P., 2007, Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25, 5467-5484.
- Brandtzaeg, P., 2009, Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 70, 505-515.
- Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., Cochran, N., Bloom, S., Wilson, J., McEvoy, L.M., Butcher, E.C., Kassam, N., Mackay, C.R., Newman, W., Ringler, D.J., 1997, Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 151, 97-110.
- Brown, D.C., Maxwell, C.V., Erf, G.F., Davis, M.E., Singh, S., Johnson, Z.B., 2006a, The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 111, 187-198.
- Brown, D.C., Maxwell, C.V., Erf, G.F., Davis, M.E., Singh, S., Johnson, Z.B., 2006b, Ontogeny of T lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period. *J.Anim Sci.* 84, 567-578.
- Bruel, T., Guibon, R., Melo, S., Guillen, N., Salmon, H., Girard-Misguich, F., Meurens, F., Epithelial induction of porcine suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene expression in response to *Entamoeba histolytica*. *Dev Comp Immunol*.
- Butcher, E.C., Picker, L.J., 1996, Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.
- Butler, J.E., Lager, K.M., Splichal, I., Francis, D., Kacs Kovics, I., Sinkora, M., Wertz, N., Sun, J., Zhao, Y., Brown, W.R., DeWald, R., Dierks, S., Muyldermans, S., Lunney, J.K., McCray, P.B., Rogers, C.S., Welsh, M.J., Navarro, P., Klobasa, F., Habe, F., Ramsoondar, J., 2009a, The piglet as a model for B cell and immune system development, In: *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier, Amsterdam Netherlands, pp. 147-170.
- Butler, J.E., Sinkora, M., 2007, The isolator piglet: a model for studying the development of adaptive immunity. *Immunol Res* 39, 33-51.

- Butler, J.E., Sinkora, M., Wertz, N., Holtmeier, W., Lemke, C.D., 2006a, Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet Res* 37, 417-441.
- Butler, J.E., Sun, J., Weber, P., Ford, S.P., Rehakova, Z., Sinkora, J., Lager, K., 2001, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. IV. Switch recombination, primarily in fetal thymus, occurs independent of environmental antigen and is only weakly associated with repertoire diversification. *J Immunol* 167, 3239-3249.
- Butler, J.E., Sun, J., Weber, P., Navarro, P., Francis, D., 2000a, Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 100, 119-130.
- Butler, J.E., Sun, J., Wertz, N., Sinkora, M., 2006b, Antibody repertoire development in swine. *Dev.Comp Immunol.* 30, 199-221.
- Butler, J.E., Weber, P., Sinkora, M., Baker, D., Schoenherr, A., Mayer, B., Francis, D., 2002, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J.Immunol.* 169, 6822-6830.
- Butler, J.E., Weber, P., Sinkora, M., Sun, J., Ford, S.J., Christenson, R.K., 2000b, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. II. Characterization of heavy chain complementarity-determining region 3 diversity in the developing fetus. *J Immunol* 165, 6999-7010.
- Butler, J.E., Weber, P., Wertz, N., 2006c, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XIII. Hybrid VH genes and the preimmune repertoire revisited. *J.Immunol.* 177, 5459-5470.
- Butler, J.E., Zhao, Y., Sinkora, M., Wertz, N., Kacsokovics, I., 2009b, Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol* 33, 321-333.
- Castigli, E., Scott, S., Dedeoglu, F., Bryce, P., Jabara, H., Bhan, A.K., Mizoguchi, E., Geha, R.S., 2004, Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3903-3908.
- Cebra, J.J., 1999, Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am.J.Clin.Nutr.* 69, 1046S-1051S.
- Cebra, J.J., Kamat, R., Gearhart, P., Robertson, S.M., Tseng, J., 1977, The secretory IgA system of the gut. *Ciba Found.Symp.*, 5-28.
- Cerutti, A., 2008, The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8, 421-434.
- Cerutti, A., Rescigno, M., 2008, The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740-750.
- Champagne, D., Drapeau, M., 2003, Sevrage ultra-précoce des porcelets. *Porc Québec*.

- Chapman, H.A., Johnson, J.S., Cooper, M.D., 1974, Ontogeny of Peyer's Patches and Immunoglobulin-Containing Cells in Pigs. *J Immunol* 112, 555-563.
- Charley, B., Riffault, S., Van Reeth, K., 2006, Porcine innate and adaptative immune responses to influenza and coronavirus infections, In: Blouin, E.F., Maillard, J.C. (Eds.) *Impact of Emerging Zoonotic Diseases on Animal Health*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 130-136.
- Chaudhuri, J., Alt, F.W., 2004, Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4, 541-552.
- Che, C., Pang, X., Hua, X., Zhang, B., Shen, J., Zhu, J., Wei, H., Sun, L., Chen, P., Cui, L., Zhao, L., Yang, Q., 2009, Effects of Human Fecal Flora on Intestinal Morphology and Mucosal Immunity in Human Flora-associated Piglet. *Scandinavian Journal of Immunology* 69, 223-233.
- Chu, R.M., Liu, C.H., 1984, Morphological and functional comparisons of Peyer's patches in different parts of the swine small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 6, 391-403.
- Chu, V.T., Enghard, P., Riemekasten, G., Berek, C., 2007, In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *Journal of Immunology* 179, 5947-5957.
- Colson, V., Orgeur, P., Foury, A., Mormède, P., 2006, Consequences of weaning piglets at 21 and 28 days on growth, behaviour and hormonal responses. *Applied Animal Behaviour Science* 98, 70-88.
- Coombes, J.L., Maloy, K.J., 2007, Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol* 19, 116-126.
- Coombes, J.L., Powrie, F., 2008, Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8, 435-446.
- Corthesy, B., 2007, Roundtrip Ticket for Secretory IgA: Role in Mucosal Homeostasis? *The Journal of Immunology* 178, 27-32.
- Curtis, J., Bourne, F.J., 1971, Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochim Biophys Acta* 236, 319-332.
- Dekaney, C.M., Bazer, F.W., Jaeger, L.A., 1997, Mucosal morphogenesis and cytodifferentiation in fetal porcine small intestine. *Anatomical Record* 249, 517-523.
- Dono, M., Zupo, S., Colombo, M., Massara, R., Gaidano, G., Tadorelli, G., Ceppa, P., Burgio, V.L., Chiorazzi, N., Ferrarini, M., 2003, The human marginal zone B cell. *Ann N Y Acad Sci* 987, 117-124.
- Dreau, D., Lalles, J.P., Philouze-Rome, V., Toullec, R., Salmon, H., 1994, Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 72, 2090-2098.

- Dubus, J.C., Vecellio, L., De Monte, M., Fink, J.B., Grimbert, D., Montharu, J., Valat, C., Behan, N., Diot, P., 2005, Aerosol deposition in neonatal ventilation. *Pediatr Res* 58, 10-14.
- Dvorak, C.M., Hyland, K.A., Machado, J.G., Zhang, Y., Fahrenkrug, S.C., Murtaugh, M.P., 2005, Gene discovery and expression profiling in porcine Peyer's patch. *Vet Immunol Immunopathol* 105, 301-315.
- Eberl, G., 2005, Opinion - Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nature Reviews Immunology* 5, 413-420.
- Ericsson, A., Svensson, M., Arya, A., Agace, W.W., 2004, CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 34, 2720-2729.
- Fagarasan, S., Honjo, T., 2004, Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol* 16, 277-283.
- Feng, N., Jaimes, M.C., Lazarus, N.H., Monak, D., Zhang, C., Butcher, E.C., Greenberg, H.B., 2006, Redundant role of chemokines CCL25/TECK and CCL28/MEC in IgA+ plasmablast recruitment to the intestinal lamina propria after rotavirus infection. *J Immunol* 176, 5749-5759.
- Fink, K., Zellweger, R., Weber, J., Manjarrez-Orduno, N., Holdener, M., Senn, B.M., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Macpherson, A.J., 2008, Long-term maternal imprinting of the specific B cell repertoire by maternal antibodies. *Eur J Immunol* 38, 90-101.
- Forsthuber, T., Yip, H.C., Lehmann, P.V., 1996, Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science* 271, 1728-1730.
- Fortun-Lamothe, L., Boullier, S., 2007, A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science* 107, 1-18.
- Foster, N., Lovell, M.A., Marston, K.L., Hulme, S.D., Frost, A.J., Bland, P., Barrow, P.A., 2003, Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 71, 2182-2191.
- Gaca, J.G., Lee, W., Aksoy, O., Braedehoeft, S.J., Gonzalez-Stawinski, G.V., Parker, W., Davis, R.D., 2001, Evidence for polyreactive xenoreactive antibodies in the repertoire of human anti-swine antibodies: the '[next]' humoral barrier to xenotransplantation? *Transplant Immunology* 9, 19-27.
- Gardner, M.L., 1978, Amino acid and peptide absorption from partial digests of proteins in isolated rat small intestine. *J Physiol* 284, 83-104.
- Gardner, M.L., Lindblad, B.S., Burston, D., Matthews, D.M., 1983, Trans-mucosal passage of intact peptides in the guinea-pig small intestine in vivo: a re-appraisal. *Clin Sci (Lond)* 64, 433-439.

- Garofalo, R.P., Goldman, A.S., 1998, Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. *Biol.Neonate* 74, 134-142.
- Gavini, F., Delcenserie, V., Kopeinig, K., Pollinger, S., Beerens, H., Bonaparte, C., Upmann, M., 2006, Bifidobacterium species isolated from animal feces and from beef and pork meat. *J Food Prot* 69, 871-877.
- Gerdts, V., Uwiera, R.R., Mutwiri, G.K., Wilson, D.J., Bowersock, T., Kidane, A., Babiuk, L.A., Griebel, P.J., 2001, Multiple intestinal 'loops' provide an in vivo model to analyse multiple mucosal immune responses. *J.Immunol.Methods* 256, 19-33.
- Girardeau, J.P., Der Vartanian, M., Ollier, J.L., Contrepois, M., 1988, CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 56, 2180-2188.
- Goldman, A.S., 2000, Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J.Nutr.* 130, 426S-431S.
- Goldman, A.S., Chheda, S., Garofalo, R., Schmalstieg, F.C., 1996, Cytokines in human milk: properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 1, 251-258.
- Goldman, A.S., Goldblum, R.M., 1997, Transfer of maternal leukocytes to the infant by human milk. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 222, 205-213.
- Harris, N.L., Spoerri, I., Schopfer, J.F., Nembrini, C., Merky, P., Massacand, J., Urban, J.F., Jr., Lamarre, A., Burki, K., Odermatt, B., Zinkernagel, R.M., Macpherson, A.J., 2006, Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *J.Immunol.* 177, 6256-6262.
- Haverson, K., Corfield, G., Jones, P.H., Kenny, M., Fowler, J., Bailey, M., Stokes, C.R., Miller, B.G., 2009, Effect of Oral Antigen and Antibody Exposure at Birth on Subsequent Immune Status. *International Archives of Allergy and Immunology* 150, 192-204.
- Haverson, K., Rehakova, Z., Sinkora, J., Sver, L., Bailey, M., 2007, Immune development in jejunal mucosa after colonization with selected commensal gut bacteria: A study in germ-free pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119, 243-253.
- Helm, R.M., Golden, C., McMahon, M., Thamphi, P., Badger, T.M., Nagarajan, S., 2007, Diet regulates the development of gut-associated lymphoid tissue in neonatal piglets. *Neonatology* 91, 248-255.
- Hieshima, K., Kawasaki, Y., Hanamoto, H., Nakayama, T., Nagakubo, D., Kanamaru, A., Yoshie, O., 2004, CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol* 173, 3668-3675.
- Hieshima, K., Ohtani, H., Shibano, M., Izawa, D., Nakayama, T., Kawasaki, Y., Shiba, F., Shiota, M., Katou, F., Saito, T., Yoshie, O., 2003, CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol* 170, 1452-1461.

- Hoorweg, K., Cupedo, T., 2008, Development of human lymph nodes and Peyer's patches. *Semin Immunol* 20, 164-170.
- Hu, M.C., Crowe, D.T., Weissman, I.L., Holzmann, B., 1992, Cloning and expression of mouse integrin beta p(beta 7): a functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8254-8258.
- Hummelshoj, L., Ryder, L.P., Nielsen, L.K., Nielsen, C.H., Poulsen, L.K., 2006, Class switch recombination in selective IgA-deficient subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 144, 458-466.
- Iliev, I.D., Matteoli, G., Rescigno, M., 2007, The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *J Exp Med* 204, 2253-2257.
- Jang, M.H., Kweon, M.N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., Kiyono, H., 2004, Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 6110-6115.
- Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.G., Seoh, J.Y., Lipp, M., Kiyono, H., Miyasaka, M., 2006, CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *The Journal of Immunology* 176, 803-810.
- Jensen, P., Von Borell, E., Broom, D.M., Csermely, D., Dijkhuisen, A.A., Edwards, S.A., Madec, F., Stamataris, C. 1997. The welfare of intensively kept pigs. Report of the Scientific Veterinary Committee Doc XXIV/B3/ScVC/0005/1997 (European Council), pp. 1-191.
- Jin, L.Z., Zhao, X., 2000, Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 311-318.
- Jin, Y., Cox, D.A., Knecht, R., Raschdorf, F., Cerletti, N., 1991, Separation, purification, and sequence identification of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 from bovine milk. *J Protein Chem* 10, 565-575.
- Johansson, C., Kelsall, B.L., 2005, Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin.Immunol.* 17, 284-294.
- Johansson, E., Domeika, K., Berg, M., Alm, G.V., Fossum, C., 2003, Characterisation of porcine monocyte-derived dendritic cells according to their cytokine profile. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 183-197.
- Kaeffer, B., Bottreau, E., Marcon, D., Olivier, M., Lantier, I., Salmon, H., 1991, Histocompatible miniature pig (d/d haplotype): generation of hybridomas secreting A or M monoclonal antibody. *Hybridoma* 10, 731-744.
- Kaeffer, B., Bottreau, E., Phan Thanh, L., Olivier, M., Salmon, H., 1990, Histocompatible miniature, boar model: selection of transformed cell lines of B and T lineages producing retrovirus. *Int J Cancer* 46, 481-488.

- Kaminski, D.A., Stavnezer, J., 2006, Enhanced IgA Class Switching in Marginal Zone and B1 B Cells Relative to Follicular/B2 B Cells. *J Immunol* 177, 6025-6029.
- Kawachi, S., Cockrell, A., Laroux, F.S., Gray, L., Granger, D.M., Van der Heyde, H.C., Grisham, M.B., 1999, Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of VCAM-1 expression in gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 277, G572-G576.
- Kawarasaki, T., Uchiyama, K., Hirao, A., Azuma, S., Otake, M., Shibata, M., Tsuchiya, S., Enosawa, S., Takeuchi, K., Konno, K., Hakamata, Y., Yoshino, H., Wakai, T., Ookawara, S., Tanaka, H., Kobayashi, E., Murakami, T., 2009, Profile of new green fluorescent protein transgenic Jinhua pigs as an imaging source. *J. Biomed. Opt.* 14.
- Kelly, D., King, T., Aminov, R., 2007, Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res* 622, 58-69.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., Chan, S., 2002, Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 32, 720-730.
- Klein, J., Ju, W., Heyer, J., Wittek, B., Haneke, T., Knaus, P., Kucherlapati, R., Bottinger, E.P., Nitschke, L., Kneitz, B., 2006, B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cell fate. *J Immunol* 176, 2389-2396.
- Klobasa, F.W., E. and Butler, J. E., 1987, Composition of Sow Milk During Lactation. *Journal of Animal Science* 64, 1458-1466.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., Alt, F.W., 1993, Lack of N-Regions in Antigen Receptor Variable Region Genes of Tdt-Deficient Lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175.
- Konstantinov, S., R., Christine, F.F., Wei Yun, Z., Barbara, A.W., Jeannette, K., Wolfgang-Bernhard, S., Willem, M.d.V., Antoon, D.L.A., Hauke, S., 2004, Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53, 317-324.
- Konstantinov, S.R., Awati, A.A., Williams, B.A., Miller, B.G., Jones, P., Stokes, C.R., Akkermans, A.D., Smidt, H., de Vos, W.M., 2006, Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ.Microbiol.* 8, 1191-1199.
- Kraatz, M., Taras, D., Manner, K., Simon, O., 2006, Weaning pig performance and faecal microbiota with and without in-feed addition of rare earth elements. *J.Anim Physiol Anim Nutr.(Berl)* 90, 361-368.
- Kramer, D.R., Cebra, J.J., 1995, Early appearance of "natural" mucosal IgA responses and germinal centers in suckling mice developing in the absence of maternal antibodies. *J Immunol* 154, 2051-2062.
- Kunkel, E.J., Butcher, E.C., 2003, Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3, 822-829.
- Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Vierra, M.A., Goodman, S.B., Genovese, M.C., Wardlaw, A.J., Greenberg, H.B., Parker, C.M., Butcher, E.C., Andrew, D.P., Agace, W.W., 2000, Lymphocyte CC

- chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192, 761-768.
- Kuraoka, M., Liao, D., Yang, K., Allgood, S.D., Levesque, M.C., Kelsoe, G., Ueda, Y., 2009, Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression and Activity in the Absence of Germinal Centers: Insights into Hyper-IgM Syndrome. *J Immunol* 183, 3237-3248.
- Lalles, J.P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007, Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society* 66, 260-268.
- Lammers, K.M., Vergopoulos, A., Babel, N., Gionchetti, P., Rizzello, F., Morselli, C., Caramelli, E., Fiorentino, M., d'Errico, A., Volk, H.D., Campieri, M., 2005, Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1 β , interleukin-8, and interferon- γ gene expression. *Inflamm Bowel Dis* 11, 447-454.
- Lanning, D.K., Rhee, K.J., Knight, K.L., 2005, Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 26, 419-425.
- Le Gall, M., Gallois, M., Seve, B., Louveau, I., Holst, J.J., Oswald, I.P., Lalles, J.P., Guilloteau, P., 2009, Comparative effect of orally administered sodium butyrate before or after weaning on growth and several indices of gastrointestinal biology of piglets. *Br J Nutr*, 1-12.
- LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Raby, A.C., Affolter, M., Vidal, K., Thornton, C.A., Labeta, M.O., 2006, Modulation of neonatal microbial recognition: TLR-mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk. *J.Immunol.* 176, 3742-3752.
- Lebourg, B., Rodriguez, M., groupe d'expert 2100, 2005, L'élevage des porcs. De Vecchi.
- Lecleire, S., 2008, Digestion and absorption of nutrients. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* 43, 45-50.
- Lee, E.G., Lee, S.H., Park, K.M., Baek, J.E., Yeon, S.H., Park, J.K., Chang, W.K., Jung, J.K., Chung, B.H., 2009, Purification and characterization of recombinant human erythropoietin from milk of transgenic pigs. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84, 643-649.
- Levast, B., De Monte, M., Melo, S., Chevaleyre, C., Berri, M., Salmon, H., Meurens, F., 2009, Differences in transcriptomic profile and IgA repertoire between jejunal and ileal Peyer's patches. *Dev Comp Immunol*.
- Liu, Y.J., 2009, TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol* 101, 1-25.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenes, J.P., Godon, J.J., 2006, Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ Microbiol* 8, 720-731.

- Lotz, M., Gutle, D., Walther, S., Menard, S., Bogdan, C., Hornef, M.W., 2006, Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 203, 973-984.
- Machado, J.G., Hyland, K.A., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2005, Gene expression profiling of jejunal Peyer's patches in juvenile and adult pigs. *Mamm Genome* 16, 599-612.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R., 1999, Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 69, 1035S-11045.
- MacLennan, I.C., 1994, Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- Macpherson, A.J., 2006, IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. *Curr Top Microbiol Immunol* 308, 117-136.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 2000, A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222-2226.
- Macpherson, A.J., Harris, N.L., 2004, Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat.Rev.Immunol* 4, 478-485.
- Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., Lamarre, A., 2001, IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 3, 1021-1035.
- Macpherson, A.J., McCoy, K., 2007, APRIL in the intestine: a good destination for immunoglobulin A(2). *Immunity* 26, 755-757.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E., Brandtzaeg, P., 2008, The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1, 11-22.
- Macpherson, A.J., Smith, K., 2006, Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J.Exp.Med.* 203, 497-500.
- Macpherson, A.J., Uhr, T., 2004, Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665.
- Makala, L.H.C., Kamada, T., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R., Bland, P.W., 2001, Ontogeny of pig discrete Peyer's patches: Expression of surface antigens. *Journal of Veterinary Medical Science* 63, 625-636.
- Makala, L.H.C., Kamada, T., Nishikawa, Y., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R., Bland, P.W., 2000, Ontogeny of pig discrete Peyer's patches: Distribution and morphometric analysis. *Pathobiology* 68, 275-282.
- Marodi, L., 2006, Innate cellular immune responses in newborns. *Clin.Immunol.* 118, 137-144.

- Marquet, P., Duncan, S.H., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Flint, H.J., 2009, Lactate has the potential to promote hydrogen sulphide formation in the human colon. *Fems Microbiology Letters* 299, 128-134.
- Martinet, J., Houdebine, L-M., 1993, *Biologie de la lactation*. INRA Editions.
- Matthews, A.G.W., Oettinger, M.A., 2009, RAG: a recombinase diversified. *Nat. Immunol.* 10, 817-821.
- McAleer, J., Weber, P., Sun, J., Butler, J.E., 2005, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XI. The thymic B-cell repertoire develops independently from that in blood and mesenteric lymph nodes. *Immunology* 114, 171-183.
- Mechin, M.C., Rousset, E., Girardeau, J.P., 1996, Identification of surface-exposed linear B-cell epitopes of the nonfimbrial adhesin CS31A of *Escherichia coli* by using overlapping peptides and antipeptide antibodies. *Infect Immun* 64, 3555-3564.
- Menezes, J.S., Mucida, D.S., Cara, D.C., varez-Leite, J.I., Russo, M., Vaz, N.M., de Faria, A.M., 2003, Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int.Immunol.* 15, 447-455.
- Merino, M.C., Gruppi, A., 2006, Origin and development of B1 lymphocytes. A cell population involved in defence and autoimmunity. *Medicina-Buenos Aires* 66, 165-172.
- Meurens, F., Berri, M., Auray, G., Melo, S., Levast, B., Virlogeux-Payant, I., Chevaleyre, C., Gerdts, V., Salmon, H., 2009a, Early immune response following *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. *Vet Res* 40, 5.
- Meurens, F., Berri, M., Siggers, R.H., Willing, B.P., Salmon, H., Van Kessel, A.G., Gerdts, V., 2007a, Commensal bacteria and expression of two major intestinal chemokines, TECK/CCL25 and MEC/CCL28, and their receptors. *PLoS ONE* 2, e677.
- Meurens, F., Berri, M., Siggers, R.H., Willing, B.P., Salmon, H., Van Kessel, A.G., Gerdts, V., 2007b, Commensal bacteria and expression of two major intestinal chemokines, TECK/CCL25 and MEC/CCL28, and their receptors. *PLoS ONE* 2, e677.
- Meurens, F., Berri, M., Whale, J., Dybvig, T., Strom, S., Thompson, D., Brownlie, R., Townsend, H.G., Salmon, H., Gerdts, V., 2006, Expression of TECK/CCL25 and MEC/CCL28 chemokines and their respective receptors CCR9 and CCR10 in porcine mucosal tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 313-327.
- Meurens, F., Girard-Misguich, F., Melo, S., Grave, A., Salmon, H., Guillen, N., 2009b, Broad early immune response of porcine epithelial jejunal IPI-2I cells to *Entamoeba histolytica*. *Mol Immunol* 46, 927-936.
- Meurens, F., Whale, J., Brownlie, R., Dybvig, T., Thompson, D.R., Gerdts, V., 2007c, Expression of mucosal chemokines TECK/CCL25 and MEC/CCL28 during fetal development of the ovine mucosal immune system. *Immunology* 120, 544-555.

- Miettinen, P.J., Perheentupa, J., Otonkoski, T., Lahteenmaki, A., Panula, P., 1989, EGF- and TGF- α -like peptides in human fetal gut. *Pediatr Res* 26, 25-30.
- Miller, B.G., Newby, T.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J., 1984, Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pig. *Res.Vet.Sci.* 36, 187-193.
- Miller, B.G., Whittemore, C.T., Stokes, C.R., Telford, E., 1994, The effect of delayed weaning on the development of oral tolerance to soya-bean protein in pigs. *Br J Nutr* 71, 615-625.
- Moeser, A.J., Klok, C.V., Ryan, K.A., Wooten, J.G., Little, D., Cook, V.L., Blikslager, A.T., 2007a, Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G173-181.
- Moeser, A.J., Ryan, K.A., Nighot, P.K., Blikslager, A.T., 2007b, Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G413-421.
- Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., Rajewsky, K., Adams, D.H., von Andrian, U.H., 2006, Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314, 1157-1160.
- Morein, B., Abusugra, I., Blomqvist, G., 2002, Immunity in neonates. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 87, 207-213.
- Mornet, P., Tournut, J., Toma, B., 1982a, *Le porc et ses maladies*. Maloine Editeur.
- Mornet, P.T., J.; Toma, B., 1982b, *Le Porc et ses maladies*. Maloine édition.
- Mowat, A.M., 2003, Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology* 3, 331-341.
- Mowat, A.M., Viney, J.L., 1997, The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156, 145-166.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H., 2007, Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260.
- Mulder, I.E., Schmidt, B., Stokes, C.R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R.I., Prosser, J.I., Gill, B.P., Pluske, J.R., Mayer, C.-D., Musk, C.C., Kelly, D., 2009, Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol* 7, 79.
- Nguyen, T.V., Yuan, L., Azevedo, M.S., Jeong, K.I., Gonzalez, A.M., Saif, L.J., 2007, Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 117, 236-248.

- Nygard, A.B., Jorgensen, C.B., Cirera, S., Fredholm, M., 2007, Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 8, 67.
- O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006, The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7, 688-693.
- Odegard, V.H., Schatz, D.G., 2006, Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6, 573-583.
- Onions, D., Cooper, D.K., Alexander, T.J., Brown, C., Claassen, E., Foweraker, J.E., Harris, D.L., Mahy, B.W., Minor, P.D., Osterhaus, A.D., Pastoret, P.P., Yamanouchi, K., 2000, An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* 7, 143-155.
- Opapeju, F.O., Krause, D.O., Payne, R.L., Rademacher, M., Nyachoti, C.M., 2009, Effect of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health, and gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis. *Journal of Animal Science* 87, 2635-2643.
- Orgeur, P., Hay, M., Mormède, P., Salmon, H., Le Dividich, J., Nowak, R., Schaal, B., Lévy, F. 2001. Behavioural, growth and immune consequences of early weaning in one week old large white piglets (*Reproduction Nutrition Development*), pp. 321-332.
- Oswald, I.P., 2006, Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet.Res.* 37, 359-368.
- Pabst, R., Rothkotter, H.J., 1999, Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 167-173.
- Palmer, C., Bik, E.M., Digiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O., 2007, Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 5, e177.
- Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A., 1998, Immunology of the pig, In: Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Ed.) *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press, California, USA, pp. 373-419.
- Pavaux, 1987, *Splanchnologie des animaux domestiques*. ENVT.
- Petersen, B., Carnwath, J.W., Niemann, H., 2009, The perspectives for porcine-to-human xenografts. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32, 91-105.
- Peu, P., Brugere, H., Pourcher, A.M., Kerouredan, M., Godon, J.J., Delgenes, J.P., Dabert, P., 2006, Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl Environ Microbiol* 72, 3578-3585.
- Peyer, J.C., 1677, *Exercitatio anat. de glandilus intestinorum earumque usu et affectionibus*. Schaffhausen, Switzerland.

- Pie, S., Lalles, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Seve, B., Oswald, I.P., 2004, Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134, 641-647.
- Pieper, R., Janczyk, P., Zeyner, A., Smidt, H., Guiard, V., Souffrant, W.B., 2008, Ecophysiology of the developing total bacterial and *Lactobacillus* communities in the terminal small intestine of weaning piglets. *Microbial Ecology* 56, 474-483.
- Pilon, C., Meurens, F., Dauba, A., Salmon, H., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., Baron, C., 2009, Induction of porcine regulatory cells by mycophenolic Acid-treated dendritic cells. *Transplant Proc* 41, 700-702.
- Porter, P., 1969, Porcine Colostral IgA and IgM Antibodies to *Escherichia coli* and their Intestinal Absorption by the Neonatal Piglet. *Immunology*, 617.
- Reber, A.J., Donovan, D.C., Gabbard, J., Galland, K., Aceves-Avila, M., Holbert, K.A., Marshall, L., Hurley, D.J., 2008a, Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system I. Effects on monocyte lineage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 186-196.
- Reber, A.J., Donovan, D.C., Gabbard, J., Galland, K., Aceves-Avila, M., Holbert, K.A., Marshall, L., Hurley, D.J., 2008b, Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 305-313.
- Rhee, K.J., Sethupathi, P., Driks, A., Lanning, D.K., Knight, K.L., 2004, Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J Immunol* 172, 1118-1124.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., Rescigno, M., 2005, Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.
- Rothkotter, Mollhoff, Pabst, 1999, The Influence of Age and Breeding Conditions on the Number and Proliferation of Intraepithelial Lymphocytes in Pigs. *Scandinavian Journal of Immunology* 50, 31-38.
- Rothkotter, H.J., 2009, Anatomical particularities of the porcine immune system--a physician's view. *Dev Comp Immunol* 33, 267-272.
- Rothkötter, H.J., Pabst, R., Bailey, M., 1999, Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72, 157-165.
- Roy, B., Shukla, S., Lyszkiewicz, M., Krey, M., Viegas, N., Duber, S., Weiss, S., 2009, Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells. *Molecular Immunology* 46, 1613-1619.
- Rumbo, M., Chirido, F.G., Anon, M.C., Fossati, C.A., 1998, Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clin Exp Immunol* 112, 453-458.

- Sachs, D.H., Sykes, M., Yamada, K., 2009, Achieving tolerance in pig-to-primate xenotransplantation: Reality or fantasy. *Transplant Immunology* 21, 101-105.
- Sait, L.C., Galic, M., Price, J.D., Simpfendorfer, K.R., Diavatopoulos, D.A., Uren, T.K., Janssen, P.H., Wijburg, O.L.C., Strugnell, R.A., 2007, Secretory antibodies reduce systemic antibody responses against the gastrointestinal commensal flora. *International Immunology* 19, 257-265.
- Sakaguchi, S., 2005, Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352.
- Salameire, D., Le Bris, Y., Fabre, B., Fauconnier, J., Solly, F., Pernollet, M., Bonnefoix, T., Leroux, D., Plumas, J., Jacob, M.C., 2009, Efficient characterization of the TCR repertoire in lymph nodes by flow cytometry. *Cytometry A* 75, 743-751.
- Salmon, H., 2000, Mammary gland immunology and neonate protection in pigs. Homing of lymphocytes into the MG. *Adv Exp Med Biol* 480, 279-286.
- Salmon, H., Berri, M., Gerds, V., Meurens, F., 2009a, Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol* 33, 384-393.
- Salmon, H., Berri, M., Gerds, V., Meurens, F., 2009b, Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol* 33, 384-393.
- Sarzotti, M., Robbins, D.S., Hoffman, P.M., 1996, Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 271, 1726-1728.
- Sawaki, J., Tsutsui, H., Hayashi, N., Yasuda, K., Akira, S., Tanizawa, T., Nakanishi, K., 2007, Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *International Immunology* 19, 311-320.
- Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M.F.G., Wieler, L.H., Tedin, K., 2005, Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105, 151-161.
- Schiffer, S.G., Day, E., Latanision, S.M., Tizard, R., Osborn, L., 1995, An alternately spliced mRNA encoding functional domains of murine MAdCAM-1. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 170-176.
- Schiffrin, E.J., Blum, S., 2002, Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur.J Clin Nutr* 56 Suppl 3, S60-S64.
- Schlissel, M.S., 2003, Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* 3, 890-899.
- Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jang, M.H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H., Kiyono, H., 2004, IgA Class Switch Occurs in the Organized Nasopharynx- and Gut-Associated Lymphoid Tissue, but Not in the Diffuse Lamina Propria of Airways and Gut. *The Journal of Immunology* 172, 6259-6264.

- Shimamura, M., Huang, Y.Y., Goji, H., 2003, Antibody production in early life supported by maternal lymphocyte factors. *Biochim.Biophys.Acta* 1637, 55-58.
- Shimoda, M., Inoue, Y., Azuma, N., Kanno, C., 1999, Local antibody response in Peyer's patches to the orally administered dietary protein antigen. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63, 2123-2129.
- Sikorski, E.E., Hallmann, R., Berg, E.L., Butcher, E.C., 1993, The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol* 151, 5239-5250.
- Skjolaas, K.A., Burkey, T.E., Dritz, S.S., Minton, J.E., 2006, Effects of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 111, 199-209.
- Snoeck, V., Verfaillie, T., Verdonck, F., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2006, The jejunal Peyer's patches are the major inductive sites of the F4-specific immune response following intestinal immunisation of pigs with F4 (K88) fimbriae. *Vaccine* 24, 3812-3820.
- Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Douglass, L.W., Lunney, J.K., 2001, Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 245-263.
- Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Lunney, J.K., 2000, Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *Journal of Immunological Methods* 241, 185-199.
- Spencer, J., Barone, F., Dunn-Walters, D., 2009, Generation of Immunoglobulin diversity in human gut-associated lymphoid tissue. *Semin Immunol* 21, 139-146.
- Steidler, L., Neiryneck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., Cox, E., Remon, J.P., Remaut, E., 2003, Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 21, 785-789.
- Stenstad, H., Svensson, M., Cucak, H., Kotarsky, K., Agace, W.W., 2007, Differential homing mechanisms regulate regionalized effector CD8 α beta⁺ T cell accumulation within the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10122-10127.
- Stepanova, H., Samankova, P., Leva, L., Sinkora, J., Faldyna, M., 2007, Early postnatal development of the immune system in piglets: The redistribution of T lymphocyte subsets. *Cellular Immunology* 249, 73-79.
- Stokes, C., Bailey, M., Haverson, K., Harris, N., Jones, P., Inman, C., Pié, S., Oswald, I., Williams, B., Akkermans, A., Sowa, E., Rothkötter, H-J., Miller, B., 2004. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. In *Anim. Res*, pp. 325-334.
- Summerfield, A., McCullough, K.C., 2009, The porcine dendritic cell family. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 299-309.

- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., Belkaid, Y., 2007, Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775-1785.
- Sun, J., Hayward, C., Shinde, R., Christenson, R., Ford, S.P., Butler, J.E., 1998a, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. I. Four VH genes account for 80 percent of VH usage during 84 days of fetal life. *J Immunol* 161, 5070-5078.
- Sun, J., Shey, M., Butler, J.E., 1998b, Determination of gene usage by differential polymerase chain reaction product hybridization. *Anal Biochem* 260, 71-79.
- Suzuki, K., Fagarasan, S., 2008, How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol* 29, 523-531.
- Suzuki, K., Ha, S.A., Tsuji, M., Fagarasan, S., 2007, Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol* 19, 127-135.
- Tang, Q.J., Wang, L.M., Tao, K.Z., Ge, C.R., Li, J., Peng, Y.L., Jiang, C.L., Geng, M.Y., 2006, Expression of polymeric immunoglobulin receptor mRNA and protein in human paneth cells: Paneth cells participate in acquired immunity. *Am J Gastroenterol* 101, 1625-1632.
- Thompson, C.L., Wang, B., Holmes, A.J., 2008, The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *Isme Journal* 2, 739-748.
- Thurnheer, M.C., Zuercher, A.W., Cebra, J.J., Bos, N.A., 2003, B1 Cells Contribute to Serum IgM, But Not to Intestinal IgA, Production in Gnotobiotic Ig Allotype Chimeric Mice. *J Immunol* 170, 4564-4571.
- Tohno, M., Shimosato, T., Moue, M., Aso, H., Watanabe, K., Kawai, Y., Yamaguchi, T., Saito, T., Kitazawa, H., 2006, Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. *Veterinary Research* 37, 791-812.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., Fagarasan, S., 2009, Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488-1492.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., Fagarasan, S., 2008, Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut. *J Immunol* 181, 261-271.
- Tumbleson, M., Schook, L.B., 1996, Advances in swine in biomedical research, In: Tumbleson, M., Schook, L.B. (Ed.) *Advances in swine in biomedical research*. Plenum Press, New-York, USA, pp. 1-4.
- Uenishi, H., Eguchi-Ogawa, T., Shinkai, H., Okumura, N., Suzuki, K., Toki, D., Hamasima, N., Awata, T., 2007, PEDE (Pig EST Data Explorer) has been expanded into Pig

- Expression Data Explorer, including 10 147 porcine full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Res* 35, D650-653.
- Uenishi, H., Eguchi-Ogawa, T., Toki, D., Morozumi, T., Tanaka-Matsuda, M., Shinkai, H., Yamamoto, R., Takagaki, Y., 2009, Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR delta chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire. *Mol Immunol* 46, 1212-1221.
- Uenishi, H., Eguchi, T., Suzuki, K., Sawazaki, T., Toki, D., Shinkai, H., Okumura, N., Hamasima, N., Awata, T., 2004, PEDE (Pig EST Data Explorer): construction of a database for ESTs derived from porcine full-length cDNA libraries. *Nucleic Acids Res* 32, D484-488.
- Vaerman, J.P., Langendries, A., Pabst, R., Rothkotter, H.J., 1997, Contribution of serum IgA to intestinal lymph IgA, and vice versa, in minipigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58, 301-308.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Vega-Lopez, M.A., Bailey, M., Telemo, E., Stokes, C.R., 1995, Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet.Immunol Immunopathol.* 44, 319-327.
- Velasquez, S.Y., Arias, L.F., Garcia, L.F., Alvarez, C.M., 2009, T cell receptor beta chain (TCR-Vbeta) repertoire of circulating CD4(+) CD25(-), CD4(+) CD25(low) and CD4(+) CD25(high) T cells in patients with long-term renal allograft survival. *Transpl Int.*
- Verhasselt, V., Milcent, V., Cazareth, J., Kanda, A., Fleury, S., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N., Julia, V., 2008, Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat Med* 14, 170-175.
- Vijtiuk, N., Trutin-Ostovic, K., Balenovic, T., Popovic, M., Valpotic, I., 2002, Functional and phenotypic analyses of porcine gut immune cells immunized by oral administration of F4ac(+) nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Veterinarni Medicina* 47, 333-341.
- Vinderola, G., Matar, C., Perdigon, G., 2007, Milk fermentation products of *L. helveticus* R389 activate calcineurin as a signal to promote gut mucosal immunity. *BMC.Immunol.* 8, 19.
- von Boehmer, H., 2007, Oral tolerance: is it all retinoic acid? *Journal of Experimental Medicine* 204, 1737-1739.
- Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y., Wu, G., 2008, Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr* 138, 1025-1032.

- Wang, P.J., Li, W.C., Xi, G.M., Wang, H.Q., Zhang, Z.H., Yao, B.C., Tang, W., Deng, Z.H., Zhang, X.H., 2009, Biomechanical Study of Hepatic Portal Vein in Humans and Pigs and Its Value in Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings* 41, 1906-1910.
- Weeratna, R.D., Brazolot Millan, C.L., McCluskie, M.J., Davis, H.L., 2001, CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32, 65-71.
- Weinstein, P.D., Cebra, J.J., 1991, The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J.Immunol.* 147, 4126-4135.
- Wijburg, O.L.C., Uren, T.K., Simpfendorfer, K., Johansen, F.-E., Brandtzaeg, P., Strugnell, R.A., 2006, Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J. Exp. Med.* 203, 21-26.
- Wilson, S., Norton, P., Leigh, J., Bailey, M., 2007, Early, microbially driven follicular reactions in the neonatal piglet do not contribute to expansion of the immunoglobulin heavy chain V-D-J repertoire. *Vet Immunol Immunopathol* 118, 105-112.
- Wilson, S.M., Wilkie, B.N., 2007, B-1 and B-2 B-cells in the pig cannot be differentiated by expression of CD5. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 10-16.
- Wold, A.E., Dahlgren, U.I., Hanson, L.A., Mattsby-Baltzer, I., Midvetdt, T., 1989, Difference between bacterial and food antigens in mucosal immunogenicity. *Infect Immun* 57, 2666-2673.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., Pabst, O., 2006, Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J.Exp.Med.* 203, 519-527.
- Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2007, Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity.* 27, 145-159.
- Yamamoto, M., Kweon, M.-N., Rennert, P.D., Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., Kiyono, H., 2004, Role of Gut-Associated Lymphoreticular Tissues in Antigen-Specific Intestinal IgA Immunity. *J Immunol* 173, 762-769.
- Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M., 2007, SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7, 454-465.
- Zanillo, G., Meurens, F., Berri, M., Salmon, H., 2009, *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol* 11, 47-58.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., Frokiaer, H., 2008, Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 123, 197-208.

- Zhou, Z.H., Zhang, Y., Hu, Y.F., Wahl, L.M., Cisar, J.O., Notkins, A.L., 2007, The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe* 1, 51-61.
- Zimowska, W., Girardeau, J.P., Kuryszko, J., Bayle, D., Rayssiguier, Y., Mazur, A., 2002, Morphological and immune response alterations in the intestinal mucosa of the mouse after short periods on a low-magnesium diet. *Br J Nutr* 88, 515-522.

Sites web consultés

- Site du syndicat national du commerce du porc, référence du 02/12/2009,
http://www.sncp.fr/v2/FR/club_export/panorama_mondial.php
- Site du gouvernement français, référence du 02/12/2009,
<http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/nutrition/allaitement.pdf>
- Site du porc du québec, référence du 02/12/2009,
<http://www.leporcduquebec.qc.ca/fr/>
- Site de la commission européenne, référence du 02/12/2009,
http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/farm/out17_en.pdf
- Site sur l'industrie du porc, référence du 06/02/2010,
<http://www.thepigsite.com/>

Annexes

Annexe 1 - La PCR en temps réel

La PCR est un outil ancien maintenant datant des années 80 (K. Mullis), la technique évolue depuis sans cesse pour permettre notamment une analyse quantitative fine des niveaux d'expression des gènes. En effet, la technique est couplée à une reverse transcription (RT-PCR) pour détecter et amplifier la présence des ARN exprimés par les gènes d'intérêt. Il faut cependant garder à l'esprit les biais liés à l'utilisation de cette technique. Les régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles ne peuvent pas être prises en compte, nous sommes donc parfois éloignés d'un lien quantitatif linéaire entre l'expression des ARN et celle des protéines ainsi que de leur activité biologique. Cependant, l'analyse comparative reste une information biologique intéressante et c'est la comparaison de différents tissus, de différentes conditions expérimentales qui donnent de la signification aux analyses quantitatives de la PCR. Ces dernières années, la quantification par PCR s'est beaucoup améliorée grâce au développement de la PCR en temps réel (qPCR). Cette technique allie le pratique (courte durée de réaction) à la sensibilité. La sensibilité de la technique a aussi rendu la manipulation beaucoup plus stricte pour le manipulateur. Ainsi, l'analyse des tissus ou des cellules doit être optimisée par le choix judicieux des gènes de référence. Ces gènes, théoriquement constants dans leur expression, diffèrent en fonction des tissus étudiés et doivent donc être validés pour leur stabilité. De même, le nombre de gènes de références utilisés pour l'analyse doit être conséquent (3 minimum). Par exemple, la seule utilisation du gène classique GAPDH sans validation ne suffit plus (Vandesompele et al., 2002). Au final, les résultats sont exprimés en valeurs relatives d'expression d'ARNm grâce au logiciel genex par exemple.

Le second point essentiel pour la PCR quantitative est le choix des amorces spécifiques. Les logiciels sont maintenant nombreux pour le développement des amorces et permettent d'éviter les défauts classiques dus aux propriétés de l'ADN. Outre la spécificité, les amorces ne doivent pas interagir ni former des boucles en configuration secondaire mais doivent également présenter une proportion de GC d'environ 50%. Cette dernière caractéristique détermine principalement la force d'interaction avec la séquence cible et donc la température à laquelle les deux brins fusionnent (T_m : température de fusion). Ces paramètres vont influencer sur les calculs quantitatifs de l'analyse, il est donc essentiel de vérifier un point théorique à ce stade de la PCR : l'efficacité. Celle-ci est théoriquement de 100%, c'est-à-dire que l'on obtient deux brins d'ADN à partir d'un seul en un cycle de PCR. Pratiquement, ce pourcentage n'est jamais parfait mais doit osciller entre 90 et 110 % pour

valider le design des amorces et donc la qualité de l'analyse quantitative de la PCR en temps réel. La vérification de l'efficacité se fait par l'analyse d'une gamme de dilution d'un échantillon d'ADN pour le couple d'amorce étudié, l'expression des Cq obtenus en fonction de la valeur de la dilution doit donner une droite dont la pente est théoriquement comprise entre 3,2 et 3,6 suivant la démonstration ci-dessous :

- D'après la relation exponentielle de la PCR

$$N_n = N_0 * E^n \text{ (E étant l'efficacité, N le nombre de brin d'ADN et n le nombre de cycle)}$$

- Et d'après la relation linéaire d'une gamme de dilution d'un facteur 10

$$\text{Pente (p)} = (\log 2 - \log 3) / (n_2 - n_3) = (\log 10) / \Delta n = 1 / \Delta n$$

$$\text{Soit } \Delta n = 1/p$$

- Si $N_2 = N_3$ et avec $N_02 = 10N_03$ (gamme de dilution)

$$N_2/N_3 = 1 = (N_02 * E^{n_2}) / (N_03 * E^{n_3}) = (N_02/N_03) * E^{n_2-n_3} = 10 * E^{\Delta n}$$

$$\text{Soit } \log(1/10) = \log E^{\Delta n}$$

$$-1 = \Delta n * \log E$$

$$\log E = -\Delta n = -1/p$$

$$\text{Soit } E = 10^{-1/p}$$

On doit donc obtenir une relation linéaire entre le nombre de cycle et la quantité initiale d'ADN et ainsi mesurer la pente de la droite. La pente permet de calculer l'efficacité de la PCR. Toutes ces précautions permettent une analyse très fine des niveaux d'expression des gènes sur un grand nombre d'échantillons.

Annexe 2 - Principe de l'analyse CDR3

Comme nous l'avons vu auparavant, la diversité et la spécificité du répertoire d'immunoglobulines se fait notamment grâce à l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions du segment D (CDR3) des chaînes lourdes des immunoglobulines. En plaçant des amorces en amont et en aval du CDR3, sur des régions conservées (FR 1, 2, 3 du fragment V en 5' ; gène J ou gène isotype μ , δ , γ , ε , α en 3'), la PCR est possible sur les ADN réarrangés ou les cDNA. Les produits PCR résultants sont ainsi de tailles variables déterminées par le CDR3 (Figure 18). La discrimination des fragments doit donc se faire au nucléotide près. Pour cela on utilise la technique d'électrophorèse capillaire comme sur les séquenceurs. De nombreux réarrangements VDJ ne sont pas codant avec pour conséquence la mort du lymphocyte. Le phénomène de *N addition* provoque un décalage du cadre de lecture (une fois sur trois théoriquement). Par rapport à une séquence codante de référence, l'ajout de $3N+1$ ou de $3N+2$ nucléotides donnent lieu à une séquence non codante. L'analyse des longueurs CDR3 ne doit en théorie présenter que des fragments de longueurs variant d'un facteur $\pm 3N$.

Un point important concerne le choix des gènes cibles. Une seule PCR peut être faite pour l'analyse du CDR3 avec une amorce pan-V et celle du segment J. Cependant, les profils obtenus représentent la totalité du répertoire quelque soit l'isotype. Il paraît important de dissocier les immunoglobulines IgG, IgM et IgA notamment. De même une modification de l'utilisation d'un gène V_H est une information noyée par la quantité de gènes ayant recombinaison. L'utilisation de quatre amorces spécifiques des gènes V_H porcin les plus utilisés permet ainsi une analyse plus fine du répertoire présent dans les tissus étudiés (Sun et al., 1998a).

Un dernier point consiste en une analyse approfondie de ce répertoire lymphocytaire. En clonant puis en séquençant les produits PCR obtenus, on peut observer les mutations générées lors de recombinaisons secondaires et ainsi déterminer avec plus de précision la mise en place d'une réponse spécifique à des antigènes.

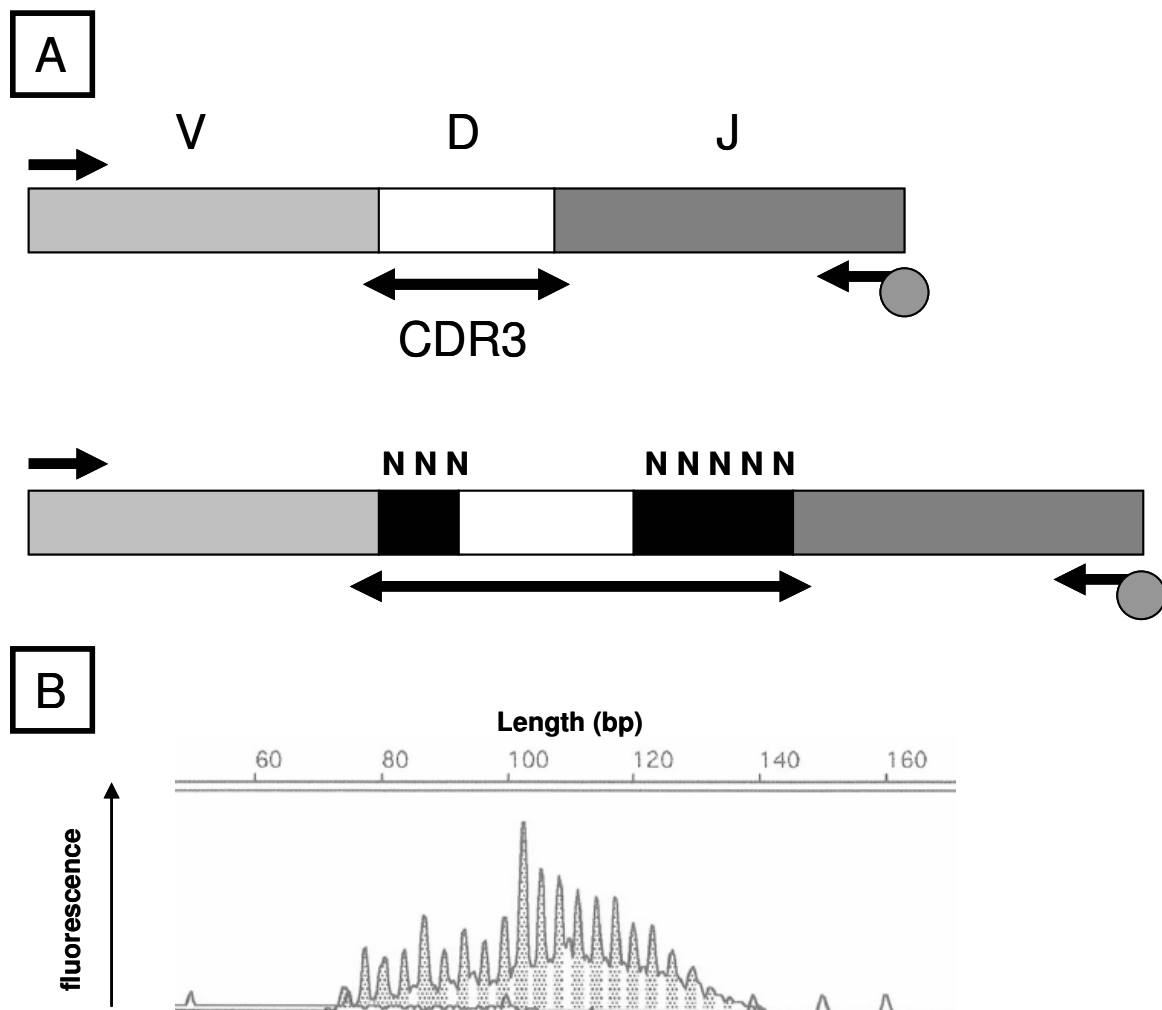


Figure 18 : Analyse par PCR des réarrangements VDJ des lymphocytes B.

A, illustration de la PCR nichée permettant l'analyse du CDR3. B, exemple de profil obtenu après migration des produits PCR en microcapillaire.

Annexe 3 - Principe de la SSCP

L'analyse de la composition de la flore bactérienne par biologie moléculaire a permis une confirmation rapide et une observation large de l'effet du sevrage aux différents âges des porcelets. La technique se rapproche de celle développée pour la diversité du répertoire, avec pour même principe de différencier en électrophorèse capillaire la migration des produits PCR. Les familles et genres bactériens peuvent être caractérisés par la séquence de leur ADNr 16S. Chaque famille présente une séquence particulière spécifique. Le design d'amorces universelles ciblant une région très conservée (région V3) de ce gène permet par PCR de détecter toutes les bactéries présentes dans un échantillon. La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) se base sur la conformation des brins d'ADN qui va influencer la vitesse de migration des produits PCR. On obtient ainsi un profil de migration où un pic est apparenté à une population bactérienne : un pic = une distance de migration = une conformation spécifique = une séquence spécifique = une population bactérienne spécifique (Figure 19).

L'analyse de la population donne souvent un profil très large avec de nombreux pics se superposant. Cette analyse peut être affinée avec le design d'amorce plus spécifique d'un genre de bactéries (Peu et al., 2006).

De plus, les profils obtenus ont une information limitée puisque les genres bactériens ne sont pas identifiés. Pour cela, les produits PCR sont clonés, séquencés et identifiés. En parallèle, le clone est de nouveau analysé par SSCP pour donner théoriquement un pic qui sera reporté sur le profil, identifiant ainsi une population (Figure 19).

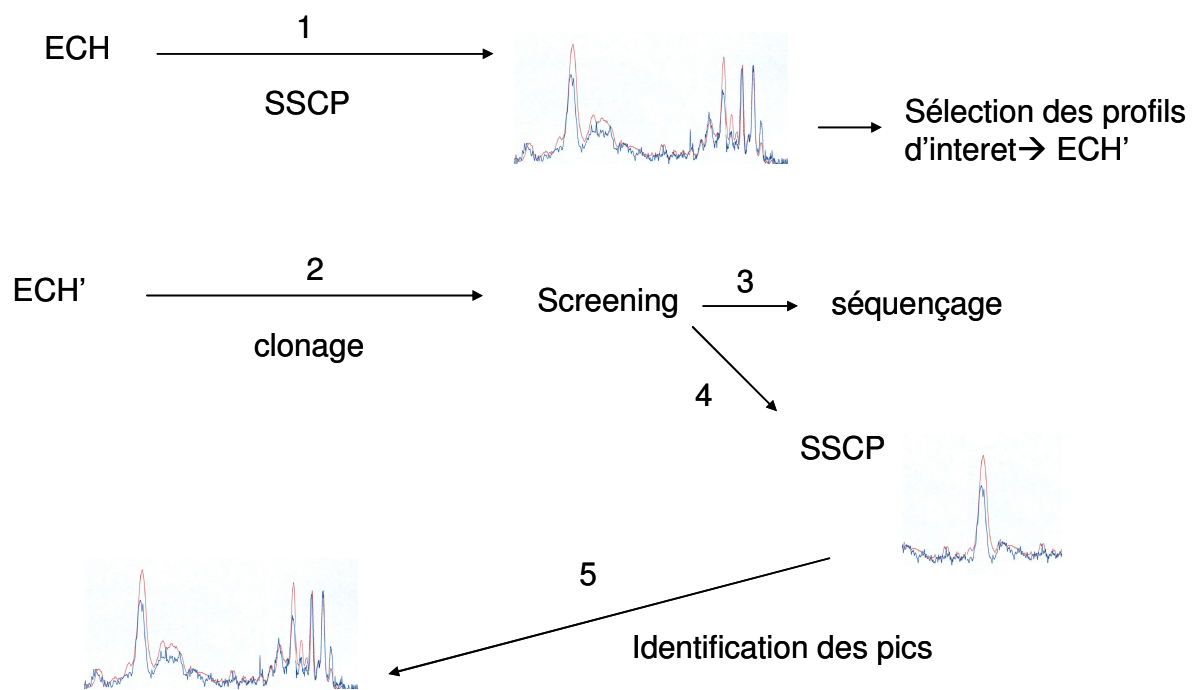


Figure 19 : Etapes d'identification d'une flore bactérienne complexe par SSCP.

Annexe 4 - Analyse de CCR9 sur les lymphocytes circulants

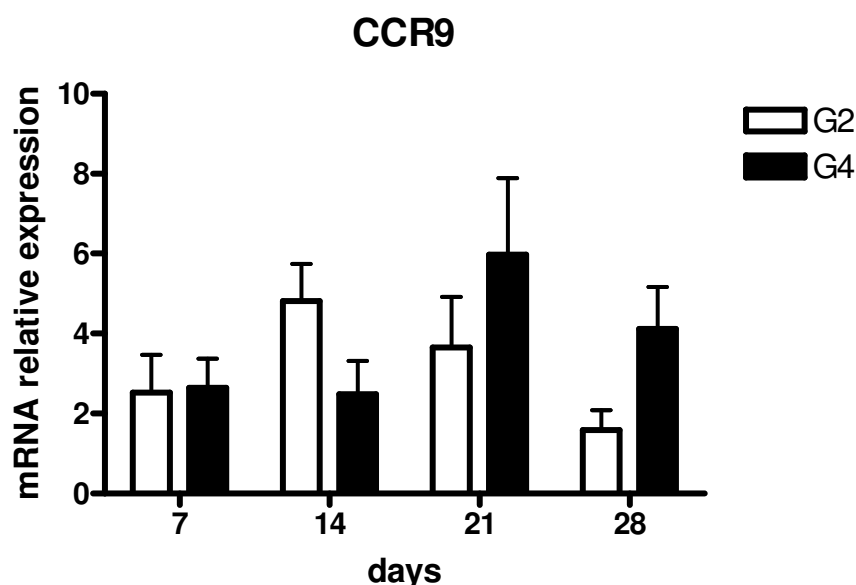


Figure 20 : Cinétique de l'expression relative en ARNm de CCR9 dans les lymphocytes circulants.

Les valeurs obtenues à J7 sont proches entre les 2 groupes, comme attendu. De même, à J14, tous les porcelets sont encore sous la mère et la différence observée entre G2 et G4 n'est pas significative (n=3). Après sevrage à J14, le groupe G2 présente une décroissance de l'expression de CCR9 contrairement au groupe G4. Ces résultats sont à confirmer à cause du faible nombre d'échantillons (SEM important) et à corréliser avec les valeurs que l'on obtiendrait pour les groupes G1 et G3 dont les données ne sont pas exploitables. Ce résultat indique que le sevrage à 14 jours provoque une baisse globale de l'expression de CCR9 par les lymphocytes T et B, diminuant probablement leur capacité de migration vers la *lamina propria*.

Dans l'idéal, l'analyse aurait dû se faire par double marquage analysé en cytométrie de flux. Le double marquage IgA/CCR9 n'étant pas au point, un tri des lymphocytes (trieur MoFlo, BD) par marquage IgA puis l'analyse de la fraction positive par RT-qPCR aurait permis une analyse plus fine du déficit provoqué par le sevrage ultra-précoce. Ce protocole a été appliqué mais la qualité des cellules, du marquage et finalement des ARNm n'a pas permis une exploitation des résultats.

Annexe 5 - Composition et plan d'alimentation des porcelets

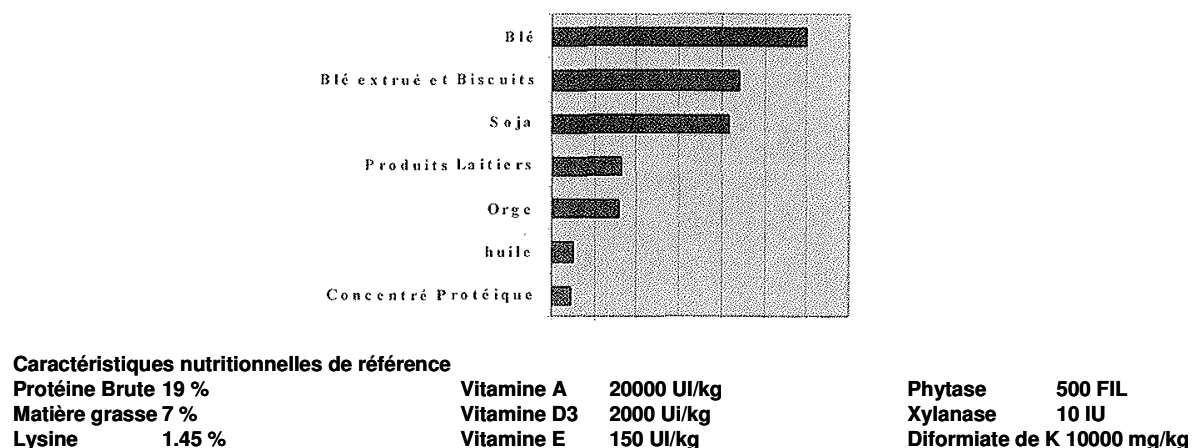


Figure 21 : Composition de l'aliment SEVRYPLUS donné aux porcelets autour de J21

Le pourcentage de protéine brute et de matière grasse diminue avec l'âge. Il y a une diminution progressive entre cremandine, crema, cremidil et severyplus. Les additifs alimentaires sont constants, mise à part la disparition du cuivre et l'apparition de la vitamine C entre crema et cremidil. Il faut noter que cremandine contient un antibiotique, la colistine.

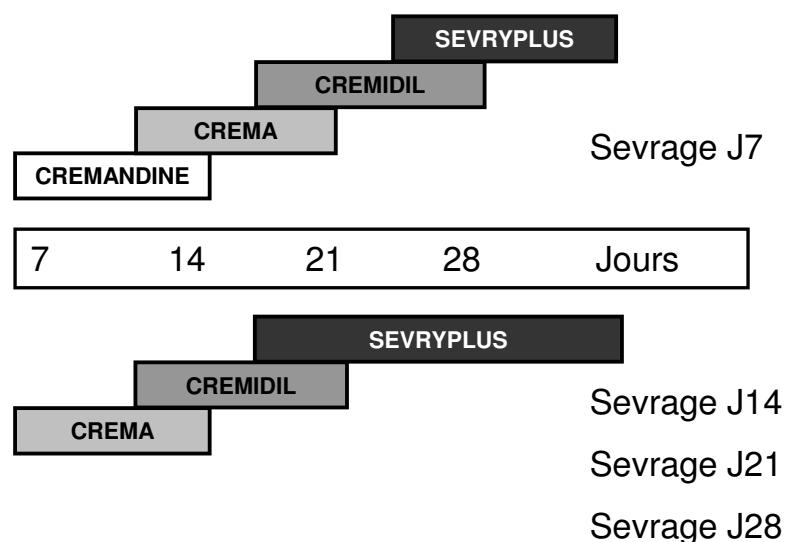


Figure 22 : Plan d'alimentation des porcelets en fonction de leur sevrage.

Annexe 6 - Cinétique des IgA sériques chez les porcelets LW et MS sevrés ou non

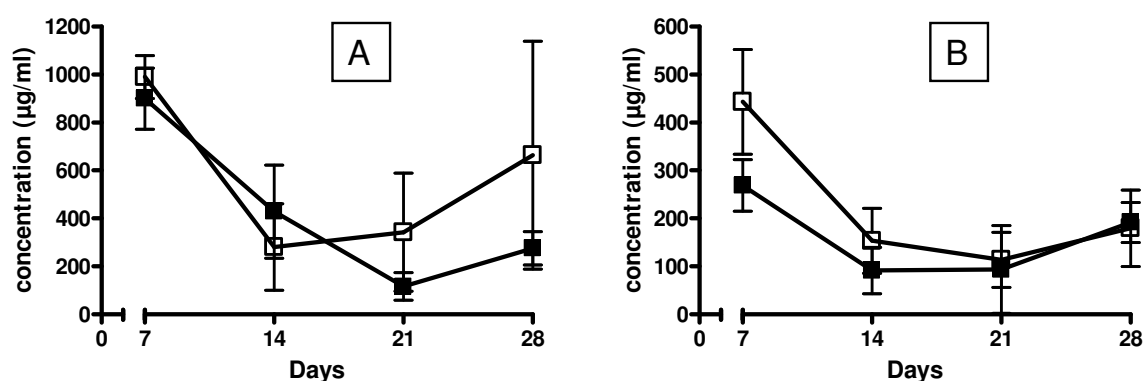


Figure 23 : Influence du sevrage sur les IgA sériques des porcelets LW et MS.

A, cinétique des porcelets LW. B, cinétique des porcelets MS. A J28, le nombre de porcelets est de 2 seulement. J21 : n=4, J14 et J7 : n=5. G1, sevré à J7 : carré noir ; G4, non sevré : carré blanc.

Les différences dans les cinétiques ne sont pas aussi nettes que celle observée pour les porcelets HC. Les porcelets LW présentent des concentrations en IgA sériques particulièrement élevées. Les variations entre individus sont importantes ce qui limite l'analyse de l'effet sevrage. Les porcelets MS présentent eux des concentrations en IgA beaucoup plus faibles. Les variations entre individus sont moins importantes mais l'effet d'un sevrage ultra-précoce est nul.

L'analyse des IgA sériques des trois races souligne l'influence possible de la race, l'effet race serait un paramètre à étudier par la suite.

Annexe 7 - Liste des communications scientifiques

ARTICLES

1) LEVAST B., DE MONTE M., MELO S., CHEVALEYRE C., BERRI M., SALMON H., MEURENS F. Difference in transcriptomic profile and IgA repertoire between jejunal and ileal Peyer's patches. *Dev. Comp. Immunol.*, 2009, accepted.

2) PILON C., LEVAST B., MEURENS F., LE VERN Y., KERBOEUF D., SALMON H., VELGE-ROUSSEL F., LEBRANCHU Y., BARON C. CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Mol. Immunol.*, 2009, **46**, 437-447.

3) MEURENS F., BERRI M., AURAY G., MELO S., LEVAST B., VIRLOGEUX-PAYANT I., CHEVALEYRE C., GERDTS V., SALMON H. Early immune response following *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. *Vet. Res.*, 2009, **40**:5.

4) BOURGES D.*, MEURENS F.*, CHEVALEYRE C., ZANELLO G., LEVAST B., MELO S., GERDTS V., SALMON H. New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland. *Mol. Immunol.*, 2008, **45**, 3354-3362. *Contributed equally to this work.

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTER

1) LEVAST B., CHEVALEYRE C., MELO S., BERRI M., SALMON H., MEURENS F. Evaluation of the IgA intestine deficit due to early weaning of piglets. *3rd EVIW European Veterinary Immunology Workshop - Satellite meeting of the 2nd European Congress of Immunology. Berlin (DEU), 10th-13th September 2009. Session CS5 : Mucosal Immunology. (Oral communication).*

2) LEVAST B., CHEVALEYRE C., MELO S., BERRI M., SALMON H., MEURENS F. Evaluation of the IgA intestine deficit due to early weaning of piglets. *Journées d'animation scientifique du Département Santé Animale de l'INRA, Port d'Albret (FRA), 25-28 mai 2009 (Oral communication).*

3) LEVAST B., DE MONTE M., MELO S., CHEVALEYRE C., SALMON H., MEURENS F. Jejunal and ileal Peyer's patches differ in cytokine, TLR expressions and in their Immunoglobulin repertoire. *12^{ème} colloque cytokine du Croisic, Le Croisic (FRA), 18-20 mai 2009. (Poster).*

4) LEVAST B., CHEVALEYRE C., MELO S., BERRI M., SALMON H., MEURENS F. Evaluation moléculaire du déficit immunitaire provoqué par le sevrage précoce du porcelet. *Immunologie des animaux domestiques. INRA Tours, Nouzilly (FRA), 16 octobre 2008. (Oral communication).*

5) LEVAST B., CHEVALEYRE C., MELO S., BERRI M., SALMON H., MEURENS F. Evaluation moléculaire du déficit immunitaire provoqué par le sevrage précoce du porcelet. *11^{ème} colloque cytokine du Croisic, Le Croisic (FRA), 5-7 mai 2008. (Poster).*

6) LEVAST B., CHEVALEYRE C., BERRI M., SALMON H., MEURENS F. Influence de l'âge au sevrage sur le développement du système immunitaire intestinal du porcelet. *Immunologie des animaux domestiques. CIRAD Montpellier (FRA), 6 novembre 2007. (Oral communication).*

Résumé

Le porcelet a un système immunitaire immature à la naissance, ceci est compensé par la protection systémique (colostrum) et humoral (lait) de la mère. Cette immunité passive n'est pas le seul transfert maternel, la microflore et probablement d'autres substances humorales sont aussi transmises, favorisant le développement de la réponse immune en Immunoglobuline A (IgA).

Lors d'un élevage conventionnel, la réponse IgA se développe autour de 3 semaines. La question est de savoir quelle est l'influence de la durée de lactation sur le développement de l'intestin du jeune porcelet. Pour cela, nous avons définis 3 groupes de porcelets sevrés à 1, 2 et 3 semaines et un groupe contrôle non sevré. Nous avons étudié en cinétique à 7, 14, 21 et 28 jours la concentration en IgA du sang et la microflore intestinale. De plus, l'analyse du répertoire VDJ (chaîne lourde) des IgA a été réalisée à 28 jours.

Les résultats montrent qu'une lactation très réduite (à 1 semaine) provoque, à 21 jours, une déficience en IgA sériques (spécifiques et totaux) et une diversification de la flore. Il en résulte une plus grande diversité du répertoire IgA dans le ganglion mésentérique.

Mots clés : Porcelet, lait, immunité passive, réponse immunitaire intestinale, plaques de Peyer, ganglion mésentérique, IgA, répertoire, flore.

Summary

The neonate piglet has an immature immune system, consequently it receives from its mother a systemic and local mucosal protect via the colostrum and milk respectively. The mother is not contribute only by passive immunity but also by transmission of microflora and presumably other humoral substances favouring the onset of Immunoglobulin A (IgA) immune response.

As IgA response increased in conventional breeding, i.e at 3 weeks of age, we ask the question of the influence of suckling onto the IgA development in neonatal gut. For that purpose we defined 3 groups of piglets weaned at 1, 2 and 3 weeks and 1 group no weaned. We looked IgA products in blood and intestinal microflora at days 7, 14, 21, 28 and the IgA heavy VDJ repertoire development at the same age, day 28.

The results show that very short suckling (1 week only) led to lower seric IgA (specific and total) concentration and higher flora diversity, at day 21 and consequently larger IgA diversity in the mesenteric lymph node (MLN).

Key words: Piglets, milk, passive immunity, intestinal immune response, Peyer's patches, MLN, IgA, repertoire, flora.