

CARACTÉRISATION DES CELLULES DU COLOSTRUM ET DU LAIT CHEZ LA TRUIE

C. LE JAN

*Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, 37380 Nouzilly.*

Le colostrum et le lait de truie contiennent $1,5 \cdot 10^6$ cellules / ml. Dans le colostrum, 12 % (± 3) des cellules sont des lymphocytes, dont 75 % de lymphocytes T; 40 % (± 10) sont des cellules épithéliales, dont 50 % présentent une expression moyenne à faible de composant sécrétoire.

Dans le lait, 3 % (± 2) des cellules sont des lymphocytes, dont 30 % des lymphocytes T; 68 % (± 14) sont des cellules épithéliales, dont plus de 90 % expriment fortement le composant sécrétoire.

La phase colostrale correspond à un transfert au nouveau-né de lymphocytes et d'immunoglobulines non sécrétoires à une période où l'intestin est ouvert aux macromolécules et aux cellules; la phase post-colostrale, à l'apport à la muqueuse intestinale d'Ig A sécrétoires et de cellules épithéliales pouvant être impliqués dans le transport d'Ig A sécrétoires, après la fermeture de la barrière intestinale.

Characterization of cells from colostrum and milk in sow

Colostrum and milk of sow contain $1,5 \cdot 10^6$ cells / ml. In colostrum, 12 % (± 3) of cells are lymphocytes, whom 75 % are T lymphocytes; 40 % (± 10) are epithelial cells, 50 % expressing a low density of secretory component.

In milk, 3 % (± 2) of cells are lymphocytes, whom 30 % are T lymphocytes T; 68 % (± 14) are epithelial cells, more than 90 % expressing high density of secretory component.

Colostrum period corresponds to transfer to neonate of lymphocytes and non secretory immunoglobulins at a time where intestinal mucosa is open to macromolecules and cells; post-colostrum period corresponds to transfer to intestinal mucosa of secretory Ig A and epithelial cells which could be implicated in secretory Ig A transportation, after intestinal barrier closure.

INTRODUCTION

Les cellules des sécrétions mammaires présentent des caractéristiques indiquant leur intervention possible dans l'immunologie du nouveau-né. Chez l'homme, les lymphocytes T du colostrum présentent le phénotype et les fonctions de cellules à mémoire, et une réactivité *in vitro* vis à vis d'antigènes ayant sensibilisé la mère (RITCHIE et al, 1980, BERTOTTO et al, 1990 ; CHERNISHOV et al, 1990) ; les lymphocytes B répondent secondairement à une stimulation *in vitro* par les antigènes du poliovirus (SLADE et al, 1989) ; les macrophages relarguent spécifiquement leurs Ig A intracytoplasmiques, après activation *in vitro* (WEAVER et al, 1982). Le rôle des polynucléaires pourrait être limité à l'alvéole mammaire (ÖZKARAGOZ et al, 1988). La capacité des cellules des sécrétions mammaires à pénétrer la muqueuse digestive, et à se disséminer dans l'organisme a été établie chez le rat (SEELIG, 1987), la souris (WEILER et al, 1983 ; PUENTE et al, 1984), le bovin (KMET et al, 1970), l'agneau (SCHNOR et al, 1984). Expérimentalement, les lymphocytes du colostrum protègent contre l'infection à rotavirus du veau (ARCHAMBAUD et al, 1988), les lymphocytes T du lait contre l'infestation expérimentale du rat par *Trichinella spiralis* (KUMAR et al, 1990). Le lait influence le développement du système immunitaire du nouveau-né (GLESSON et al, 1986 ; KOLDOVSKI, 1989 ; MIGLIORE-SAMOUR et JOLLES, 1988, JULIUS et al, 1988 ; JARRET et al, 1979). Les sécrétions mammaires transmettent la sensibilité à la tuberculine et aux antigènes de schistosomes (revue : CHERNISHOV, 1990) ; la réponse à médiation cellulaire après vaccination par le BCG à la naissance est augmentée si l'enfant est nourri au sein, et ce indépendamment du statut immunitaire de la mère vis à vis du BCG (PABST et al, 1989).

Quels que soient les mécanismes cellulaires ou moléculaires impliqués, il est clair qu'un lien cellulaire fonctionnel mère-nouveau né constitué par le colostrum et le lait doit être envisagé.

Le porcelet est, à la naissance, dépourvu d'anticorps spécifiques et de mémoire immunitaire. Son système immunitaire se développe dans un environnement constitué par le matériel immunologique maternel (anticorps, cellules, facteurs solubles du colostrum et du lait), les antigènes alimentaires et les germes du milieu ambiant. Les modalités de transmission d'une immunité humorale passive par le lait sont bien établies, le modèle en étant la protection apportée par les Ig A sécrétoires du lait contre le virus de la Gastro-entérite transmissible (BOHL et al, 1972 ; revue BERNARD et al, 1983). On dispose de peu de données sur les aspects cellulaires de l'immunité lactogène. Le porcelet ingère, journalièrement, 500 à 700.106 cellules vivantes d'origine maternelle, constituées de lymphocytes, de polynucléaires, de macrophages et de cellules épithéliales (EVANS et al, 1982 ; WEBER et al, 1982 ; SCHOLLENBERG et al, 1986).

Nous avons, dans ce travail, cherché à établir s'il existait une différence dans l'apport en lymphocytes (pouvant être impliqués dans des réactions immunitaires cellulaires) et en cellules épithéliales (responsables, dans la glande mammaire, du transit des Ig A sécrétoires), entre deux périodes: la phase colostrale, où la barrière intestinale laisse passer les macromolécules et probablement les cellules, et la phase post-colostrale, où cette barrière est fermée.

1. MÉTHODOLOGIE

1.1. Préparation des cellules

20 à 40 ml de colostrum (jours 1 et 2 suivant la mise-bas) et de lait sont obtenus par traite manuelle, après administration par voie intra-musculaire de 10 à 20 U.I. d'ocytocine. Les cellules sont préparées par trois cycles de lavage en tampon PBS (20 mn, 650g, 4° C).

1.2. Examen cytologique

L'examen cytologique est réalisé après cyto-centrifugation sur lame et coloration au May Grünwald Giemsa.

1.3. Marqueurs de membrane

Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés :

- MSA4 : révèle les lymphocytes T de porc (IgG 2a ; Hammerberg).
- K60 IFI : révèle le composant sécrétoire de porc (IgG 1 ; Bourne).

1.4. Lecture

Après marquage de membrane, les préparations sont lues sous microscope à fluorescence ou analysées en cytométrie de flux.

1.5. Culture *in vitro*

Des cultures et des sous-cultures, après trypsination, sont effectuées en milieu RPMI (Péni-Strepto-Fungizone), 10% SVF en incubateur à 37°C, 5% CO².

2. RÉSULTATS

2.1. Nombre de cellules totales dans le lait et le colostrum

Le lait et le colostrum contiennent de 1 à 2,5 millions de cellules par ml ; il n'y a pas de différences significatives entre le lait et le colostrum, quant à la teneur en cellules totales.

2.2. Lymphocytes

12 % (± 3) des cellules du colostrum, et 3 % (± 2) des cellules du lait sont classées comme lymphocytes sur des critères morphologiques (May Grünwald Giemsa).

Tableau 1 - Pourcentage de lymphocytes T dans le colostrum et le lait (immunofluorescence de membrane)

Jour de prélèvement	% sur cell. totales	sem.	Nombre de prélèvements
1-2	9,5	1,3	10
3-4	3,8	0,3	5
>=5	1,2	0,4	10

En phase colostrale (jours 1 et 2), 9,5 % ($\pm 2,6$) des cellules totales sont des lymphocytes T ; en phase intermédiaire (jours 3 et 4), il est de 3,8 % (± 1) ; en lactation établie, il est de 1,2 % ($\pm 0,7$).

2.3. Polynucléaires neutrophiles

En moyenne, le taux de polynucléaires observé en fin de préparation est inférieur à 10 %.

2.4. Monocytes et macrophages

1 à 5% des cellules totales des sécrétions sont des monocytes et des macrophages.

2.5. Cellules épithéliales

Elles constituent la population prédominante: 40 % (sem = 5,1) des cellules du colostrum, et 68 % (sem = 14,2) des cellules du lait sont des cellules épithéliales (tableau 2).

Tableau 2 - Caractéristiques des cellules épithéliales du colostrum et du lait

	Colostrum	Lait
% cell. totales (sem)	40 % (5,1)	68 % (14,2)
nombre	13	11
morphologie	petites peu vacuolisées mononucléées (> 95%)	grande taille très vacuolisées mono-, bi- ou anucléées
en culture	capacité division (une partie d'entre elles)	pas de division

Elles évoluent au cours du développement des sécrétions mammaires, quant à leurs caractéristiques morphologiques, membranaires et leur comportement en culture *in vitro* (tableau 3) :

- *dans le colostrum*, elles sont de petite taille et peu vacuolisées ; plus de 95 % sont mononucléées. En culture *in vitro*, une partie d'entre elles adhère, et est capable de se multiplier.

Tableau 3 - Expression membranaire de Composant Sécrétoire par les cellules totales du colostrum et du lait

	Colostrum	Lait
% (sem)	24,8 % (2,8)	66,2 % (11,6)
nombre	13	11
+	2 / 3	1 / 5
++	1 / 3	2 / 5
+++	0	2 / 5

+ : fluorescence par points
++ : fluorescence en anneau fin
+++ : fluorescence en anneau dense

a: proportion des cellules positives

- *en phase post-colostrale*, la morphologie de ces cellules évolue jusqu' au 5ème-6ème jour. La taille des cellules épithéliales augmente ; le cytoplasme se développe et se vacuolise. Les cellules épithéliales sont soit anucléées, soit mono- ou binucléées. En lactation établie, 35,4 % (\pm 12,8) des cellules épithéliales sont anucléées, 53,4 % (\pm 11,9) mononucléées et 10,6 % (\pm 9,6 %) binucléées. En culture, une partie de ces cellules adhère, ne se divise pas, et continue à excréter sur 48 heures des globules gras dans le milieu de culture.

Dans le colostrum, 24,8 % (\pm 6) des cellules totales expriment du composant sécrétoire en membrane ; la densité d'expression du composant sécrétoire de membrane est faible.

Dans le lait établi, 66 % (\pm 15) des cellules totales expriment une forte densité de composant sécrétoire en membrane.

L'expression du composant sécrétoire par la membrane des cellules épithéliales, dans le lait établi, est indépendante de la morphologie de la cellule (0, 1 ou 2 noyaux).

3. DISCUSSION

3.1. Nombre de cellules totales

Il n'y a pas de différences, dans le nombre de cellules totales, entre phase colostrale et phase lactée. Nos résultats sont en accord avec ceux d'EVANS (1982), et SCHOLLENBERG (1986) ; chez l'homme et le bovin, le nombre de cellules somatiques des sécrétions mammaires décroît au cours de la lactation (CRAGO et al, 1987 ; HEED et al, 1979).

3.2. Les lymphocytes

Leur taux, de 12 % (\pm 3 %) dans le colostrum, chute à 3 % (\pm 2 %) dans le lait ; les lymphocytes T prédominent dans le colostrum (9% \pm 2,6) des cellules totales, et sont minoritaires dans le lait (1,2 % \pm 0,8).

SCHOLLENBERG et al (1986) ont observé un taux moyen de lymphocytes de 11% chez le porc, sans variations significatives entre colostrum et lait, et une prédominance des lymphocytes B parmi les lymphocytes du lait (rapport de 1/6). Pour EVANS et al, le taux de lymphocytes, supérieur à 20 % dans les trois premiers jours suivant la mise-bas, est de 11 à 13 % en mi-lactation. En phase post-colostrale, nous observons sur des critères morphologiques (après coloration au May Grünwald Giemsa) un taux significativement inférieur à celui décrit par SCHOLLENBERG ; les différences observées peuvent tenir à des variations physiologiques entre lots expérimentaux. SCHOLLENBERG et al montrent que, après séparation sur Ficoll-Trisil d=1,076 et élimination des cellules adhérentes, 5,8% des cellules obtenues du colostrum forment rosettes avec des hématies de mouton, et 2 % des cellules obtenues à partir du lait ; dans nos essais de purification, les centrifugations sur coussin de densité 1,076 fournissent une population mixte de lymphocytes et de cellules épithéliales ; nous avons donc utilisé comme marqueur de cellules T l'antigène de membrane révélé par l'anticorps monoclonal MSA4, appliqué aux cellules totale. La présence d'immunoglobulines membranaires ne permet pas de caractériser les lymphocytes B du lait et du colostrum sur populations non purifiées de lymphocytes, d'autres cellules (épithéliales, macrophages) ayant ce caractère.

Chez le porc comme chez l'homme (RITCHIE, 1980 ; CRAGO, 1987 ; BERTOTTO, 1990), les lymphocytes T prédominent sur les lymphocytes B en phase colostrale.

3.3. Polynucléaires

Nous observons un taux de polynucléaires en moyenne inférieur à 10 %.

Des variations individuelles importantes peuvent être observées ; une cytologie accidentellement très élevée est toujours due à un taux élevé de polynucléaires. D'autre part, ce taux peut aussi varier en fonction du volume de prélèvement, les premiers jets étant toujours plus chargés en polynucléaires. Weber et al notent des taux de polynucléaires allant de 60 à 90 % dans les sécrétions de truie, avec une cellularité globale très élevée (5 à 60.10⁶ cellules par ml) ; ceci peut s'expliquer par le volume de sécrétions collecté (1 ml). SCHOLLENBERG (1986) et EVANS (1982) observent des taux de polynucléaires supérieurs à 30 %.

Nous expliquons les variations dans les taux de polynucléaires observés par le fait que le polynucléaire des sécrétions est une cellule qui a résidé un certain temps dans l'alvéole, y a exercé ses fonctions (ÖSKAGARÖZ et al, 1988), est éliminée intacte ou dégradée dans les sécrétions et se dégrade au cours des opérations de préparation des cellules.

3.4. Monocytes et macrophages

Nos résultats sont en accord avec les conclusions d'EVANS et de SCHOLLENBERG, qui notent le faible taux de monocytes et de macrophages dans les sécrétions mammaires du porc, par rapport à ce qui est observé dans d'autres espèces (homme, rat, ruminants).

Les capacités de phagocytose du macrophage du lait de truie sont faibles, mais augmentées après opsonisation (EVANS et al, 1982) ; ces cellules peuvent intervenir dans la présentation de l'antigène.

3.5. Les cellules épithéliales libres des sécrétions

Les sécrétions mammaires du porc se caractérisent, par rapport aux autres espèces (HEAD et BEER, 1979 ; CONCHA et al, 1978 ; DIAZ-JOUANEN et al, 1974), par un taux élevé de cellules épithéliales. Les cellules épithéliales du colostrum humain représentent moins de 0,5 % des cellules totales (CRAGO, 1987), et sont capables de division in vitro (TAYLOR-PAPADIMITRIOU). Ces cellules épithéliales ont été décrites chez le porc par EVANS (1982) et SCHOLLENBERG (1986),

à des taux ne différant pas significativement de nos observations.

Nous établissons une différence entre cellules épithéliales du colostrum : faible expression de composant sécrétoire, capacités de division, peu de vacuoles, et cellules épithéliales du lait : forte expression de composant sécrétoire, pas de capacités de division, vacuolisation.

L'évolution de leurs caractéristiques morphologiques et membranaires au cours de l'installation de la sécrétion mammaire, la capacité d'une partie des cellules épithéliales libres du colostrum à se diviser in vitro, indiquent que la mamelle termine sa différenciation en fin de période colostrale (divisions cellulaires et constitution des alvéoles, puis fonctions de sécrétion totalement établies). L'expression de composant sécrétoire, faible pour les cellules épithéliales du colostrum, forte pour celles du lait, est bien en accord avec cette différenciation.

CONCLUSION

Nos résultats montrent que dans la phase colostrale, le nombre de lymphocytes T est élevé, et le nombre de cellules épithéliales exprimant le composant sécrétoire faible ; cette expression réduite du composant sécrétoire en phase colostrale est en corrélation avec les résultats de PORTER (1973), qui établissent que, à la mise-bas, l'Ig A du colostrum est dépourvue de composant sécrétoire. Dans le lait, le nombre de lymphocytes est significativement inférieur, et le nombre de cellules épithéliales exprimant le composant sécrétoire très élevé.

La phase colostrale correspond à un apport de lymphocytes, majoritairement T, et d'immunoglobulines non sécrétoires à un nouveau-né dont la barrière intestinale permet le passage des macromolécules et, en partie, des cellules, vers le système général.

En phase lactée, les sécrétions apportent localement des Ig A sécrétoires, et des cellules épithéliales qui, par leur forte expression de composant sécrétoire, peuvent être impliquées dans un transport cellulaire d'Ig A sécrétoires, dans une période où la barrière intestinale ne permet plus le passage des macromolécules.

On peut faire l'hypothèse d'une possible contribution des lymphocytes T transmis par le colostrum à l'installation de l'immunité chez le jeune (immunité passive, éducation immunitaire et maturation du système immunitaire, tolérance et allergie alimentaire).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARCHAMBAULT D., MORING., ELAZHARY Y., ROY R. S., JONCAS J., 1988. *Am. J. Vet. Res.*, 49, 7, 1084-109.
- BERNARD S., AYNAUD J. M., SALMON H., 1983. *Journées Rech. Porc. Fr.*, 15, 401-412.
- BERTOTTO A., GERLI R., FABIETTI G., CRUPI S., ARCANGELI C., SCALISE F., VACCARO R., 1990. *Eur. J. Immunol.*, 20, 1877-1880.
- BOHLE H., GUPTKA R. K. P., McCLOSEKEY L. W., SAIF L. J., 1972. *J. Am. Vet. med. Assoc.*, 160, 543-549.
- CHERNISHOV V. P., SLUVKIN I. I., 1990. *Archivum Immunologiae Experimentalis*, 38, 145-164.
- CONCHA C., HOLMBERG O., MOREIN B., 1978. *J. Dairy Res.*, 45, 287-290.
- CRAGO S. S., MESTECKY J., 1987. In: *Cell separation: methods and selected applications*, vol. 5, Petlow ed., Acad. Press, 267-279.
- DIAZ-JOUANEN E., WILLIAMS R. C., 1973. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 3, 248-255.
- EVANS P. A., NEWBY T. J., STOKES C. R., BOURNE F. J., 1982. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 3, 515-527.
- GLEESON M., CRIPPS A. W., CLANCY R. L., HENSLEY M. J., DOBSON A. J., FIRMAN D. W., 1986. *Clin. exp. Immunol.*, 66, 216-22.

- HEED J.R., BEER A.E., 1979. In: Immunology of breast milk, Ogra éd., Raven Press, N.Y., 209-221
- JARRET E., HALL E., 1979. Nature, 1979, 280, 145.
- JULIUS M.H., JANUSZ M., LISOWSKI J., 1988; J. Immunol., 140, 5, 1366-1371.
- KMETZ M., DUNNE H.W., SCHUTZ R.D., 1970. Am. J. Vet. Res., 31, 637-641.
- KOLDOVSKI M., 1989. J. Nutr., 119, 1543-1551.
- KUMAR S.R., STEWART G.L., STEVEN U.M., SEELIG L.L., 1990. J. Reprod. Immunol., 17, 69-78
- MIGLIORE-SAMOUR D., JOLLES P., 1988. Experientia, 44, 188-193.
- ÖZKARAGOZ F., RUDLOFF H.B., RAJAMARAN S., MUSHTAHA A., SCHMALSTIEG F.C., GOLDMAN A.S., 1988. Pediatric Research, 23 (5), 449-452.
- PABST H.F., GODEL J., GRACE M., CHO H., 1989. The Lancet, 11, 295-297.
- PORTER P., 1973. Immunology, 24, 163-176.
- RITCHIE E.R., STEINMETZ K.D., MEISTRICH M.L., RAMIREZ I., HILLIARD J.K., 1980. J. of Immunology, 125, 5, 2344-2346.
- SCHNORR K.L., PEARSON L.P., 1984. J. Reprod. Immunol., 6, 329.
- SCHOLLENBERG A., FRYMUS T., DEGORSKI A., SCHOLLENBERG Ada, 1986. J. Vet. Med. Ass., 33, 31-38.
- SCHOLLENBERG A., FRYMUS T., DEGORSKI A., SCHOLLENBERG Ada, 1986. J. Vet. Med. Ass, 33, 39-46.
- SCHWARTZ S.A., SLADE H.B., 1986. J. Allerg. Clin. Immunol., 77, 174.
- SEELIG L.L., HEAD J.R., 1987. J. Reprod. Immunol., 10, 287-295
- SLASE H.B., SCHWARTZ S.A., 1989. Pediatric Research, 25 (3), 295-299.
- TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., 1983. In: Culture of animal cells, Alan R. Liss ed., N.Y., 260-262.
- WEAVER E.A., TSUDA H., GOLDBLUM A.S., DAVIS C.P., 1982. Inf. Imm., 38 (3), 1073-1077.
- WEBER A.J., FERGUSON F.G., 1982. IPVS, Mexico, 1982.
- WEILER I.J., HICKLER H., SPRENGER R., 1983. Am. J. Reprod. Immunol., 4, 95-98.