

## DEVENIR DES CELLULES COLOSTRALES CHEZ LE PORC NOUVEAU-NÉ

C. LE JAN (1), J. LE DIVIDICH (2), Claire CHEVALEYRE (1), J.C. HULIN (2)

*Institut National de la Recherche Agronomique*

(1) *Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie - 37380 Nouzilly*

(2) *Station de Recherches Porcines - 35590 Saint-Gilles*

Le porcelet ingère, par ml de colostrum, 1 à 2.106 cellules maternelles (en majorité des lymphocytes et des cellules épithéliales). Des porcelets ont reçu, par intubation oesophagogastrique, des cellules colostrales maternelles marquées par fluorochrome, et sont suivis pendant 40 heures suivant l'inoculation. Nous mettons en évidence des cellules maternelles dans le sang périphérique, la rate, les ganglions mésentériques et la muqueuse intestinale. La zone préférentielle d'absorption est la muqueuse duodénale. Quarante heures après l'ingestion, des cellules sont encore présentes dans la *lamina propria* des villosités et des cryptes du duodénum, ce qui suggère, outre un transfert vers la circulation générale, une persistance de cellules maternelles dans la muqueuse intestinale. Ces résultats nous conduisent à envisager la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules maternelles qui migrent dans l'intestin néonatal.

### **Fate of colostrals cells in newborn pig**

Sow colostrum contains 1 to 2,106 (per ml) maternal cells mainly as lymphocytes and epithelial cells. Piglets, tube-fed maternal colostrals cells labelled by fluorochrome, were studied during 40 hours after inoculation. We have established the presence of maternal cells in peripheral blood, spleen, mesenteric lymph nodes and intestinal mucosa. The preferential site of absorption is duodenal mucosa. Forty hours after ingestion, maternal cells were still present in *lamina propria* of crypts and villi, which suggests that, in addition to systemic transfer, there is a persistence of maternal cells in the intestinal mucosa. Future research should focus on phenotypic and functional characterization of maternal cells which migrate in neonatal intestine.

## INTRODUCTION

Les sécrétions mammaires contiennent, chez toutes les espèces de mammifères, des cellules maternelles. La contribution de ces cellules au développement de l'immunité du nouveau-né n'a pas encore été établie expérimentalement, mais leur rôle biologique est très probable (BERTOTTO et al, 1990). Le colostrum de porc (1 à 2.106 cellules/ml) se caractérise par sa richesse en lymphocytes (15-25% des cellules totales, avec prédominance de lymphocytes T) et en cellules épithéliales (>20% des cellules totales) (EVANS et al, 1982; SCHOLLENBERG et al, 1986; MAGNUSSON et al, 1991; LE JAN, 1993, 1994). Le passage actif des cellules colostrales à travers la barrière intestinale a été démontré chez le porcelet nouveau-né par des expériences d'administration par voie digestive de cellules colostrales et sanguines marquées radioactivement (TUBOLY et al, 1988) et par fluorochrome (WILLIAMS, 1993). Huit heures après l'inoculation, Tuboly et al (1988) mettent en évidence des cellules colostrales maternelles dans les muqueuses duodénale et jéjunale, ainsi que dans les ganglions mésentériques; les cellules sanguines maternelles, les cellules colostrales inactivées par traitement thermique et les cellules d'un colostrum non maternel ne franchissent pas la barrière intestinale. WILLIAMS (1993) détecte des cellules colostrales maternelles dans les ganglions mésentériques, le sang, la rate et le foie des porcelets 24 heures après l'inoculation; dans un modèle d'interaction *in vitro* entre explants d'intestin néonatal et cellules colostrales maternelles marquées, il montre l'invasion des muqueuses duodénale et jéjunale, mais pas de la muqueuse iléale, par ces cellules. Dans le travail que nous présentons, nous avons cherché à établir *in vivo* le site d'absorption et la localisation des cellules du colostrum maternel, pour disposer des données de base nécessaires à des études ultérieures sur les fonctions de ces cellules.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux

Le lot expérimental est constitué de 8 porcelets de race Piétrain x Large White issus de deux truies (A et B) dont la mise-bas est synchronisée par injection de prostaglandines. Les porcelets sont identifiés de la manière suivante: 388A, 389A, 391A, 392A (portée A), 393B, 394B, 395B, 396B (portée B). Dès la naissance les porcelets sont séparés de leur mère, puis sous anesthésie générale ils sont équipés d'un cathéter à la veine jugulaire et d'une sonde oesophago-gastrique. Les porcelets ne reçoivent aucune alimentation jusqu'à l'inoculation de cellules colostrales.

### 1.2. Préparation des cellules de colostrum

Le colostrum est prélevé par traite manuelle au cours de la mise-bas. Après séparation par 2 lavages en PBS PH 7.2, les culots cellulaires sont resuspendus en RPMI 4% SVF (sérum de veau foetal). Les cellules sont numérotées, et la vitalité évaluée par le test d'exclusion du bleu trypan. Les cellules sont marquées par incubation, 15 mn à 37°C, avec un volume égal d'isothiocyanate de Rhodamine (Sigma, lot 34F-0186, à la concentration de 12 µg/ml en RPMI), puis centrifugées sur un coussin de sérum de veau foetal, selon la méthode décrite par BINNS et al (1981). Un aliquot de chaque préparation est fixé en paraformaldéhyde 1% pour le contrôle de la qualité du marquage, et les volumes de suspension ajustés à 16 ml.

### 1.3. Inoculation intragastrique des cellules colostrales marquées

Lors de l'inoculation, les porcelets sont âgés de 7 à 8 heures. A l'issue d'une période de récupération de l'anesthésie de 90 minutes à 34°C, chaque porcelet reçoit, à la seringue par la sonde oesophago-gastrique, 4 ml de la suspension de cellules marquées, puis 20 ml de colostrum maternel. Les sondes oesophago-gastriques sont alors retirées, et les porcelets replacés sous la mère jusqu'à la fin de l'expérience.

### 1.4. Prélèvements

Un ml de sang est prélevé sur héparine juste avant l'inoculation des cellules colostrales, puis 2,5h, 18h, 24h et 40h après l'inoculation. Aux temps 2,5h, 18h, 24h et 40h suivant l'inoculation, un porcelet de chaque portée est anesthésié au fluothane et sacrifié par exsanguination. La rate, les ganglions mésentériques et un échantillon de duodénum, de jéjunum et d'iléon sont prélevés. La rate et les ganglions mésentériques sont inclus en Tissue-Tek (O.C.T. compound, Miles), immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. La lumière des échantillons d'intestin est remplie à la seringue de Tissue-Tek, le prélèvement inclus en Tissue-Tek, puis congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

### 1.5. Mise en évidence dans les prélèvements des cellules marquées par le fluorochrome

#### 1.5.1. Sang

Les échantillons sont centrifugés, et les culots repris dans 200 µl de PBS. Après dépôt sur lame, pour chaque échantillon, de 10 aliquots de 20 µl, les lames sont séchées à l'air puis montées sous lamelle en PBS-glycérol. La présence de leucocytes fluorescents est recherchée par examen sous microscope U.V. (Leitz, objectif à immersion 40/1,30).

#### 1.5.2. Organes

Des coupes à 10 microns sont effectuées sur les échantillons de rates, de ganglions mésentériques et d'intestins au cryotome à -20°C. Après fixation 20 mn en acétone à -20°C, les lames sont conservées à -80°C jusqu'à examen. Les lames sont décongelées, réhydratées 10 mn en eau déminéralisée, contre-colorées à l'hématoxyline et montées sous lamelle en PBS-glycérol.

Les cellules fluorescentes sont dénombrées sur 4 surfaces de coupe pour la rate et les ganglions mésentériques. Pour les échantillons d'intestin, 3 surfaces de coupe sont examinées, les cellules fluorescentes dénombrées et leur localisation notée. L'association de la fluorescence aux structures cellulaires est contrôlée par la contre-coloration à l'hématoxyline.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Inoculum

Pour les deux échantillons de colostrum (A et B), la vitalité cellulaire, évaluée au bleu trypan, est supérieure à 80%. Toutes les cellules sont marquées par le fluorochrome. Chaque porcelet de la portée A a reçu 35 millions de cellules marquées, et chaque porcelet de la portée B 12 millions.

## 2.2. Sang périphérique

Les prélèvements sanguins effectués de 2,5 à 40 heures suivant l'inoculation contiennent des leucocytes fluorescents, dont le nombre varie de 2 à 10 par échantillon; les prélèvements effectués au temps 0 sont négatifs.

## 2.3. Rate

À 2,5 heures après l'administration de cellules colostrales, la présence d'un faible nombre de cellules maternelles est détectée uniquement chez un des deux animaux sacrifiés. Les rates prélevées 18, 24 et 40 heures après l'inoculation présentent un nombre significatif de cellules marquées, avec un maximum à 18-24 heures (tableau 1 et figure 1)

## 2.4. Ganglions mésentériques

Des cellules maternelles sont mises en évidence dans les ganglions mésentériques examinés de 2,5 heures à 40 heures après l'inoculation, avec un maximum à 18-24 heures (tableau 1 et figure 1).

**Tableau 1** - Mise en évidence de cellules colostrales maternelles dans la rate et les ganglions mésentériques

Animal	h(1)	rate(2)	ganglions(3) mésentériques
392A	2,5	+ (2)	n.t.
394B	2,5	- (0)	+ (2)
391A	18	+ (23)	+ (15)
396B	18	+ (14)	+ (15)
388A	24	+ (7)	+ (12)
395B	24	+ (25)	+ (20)
389A	40	+ (7)	+ (3)
393B	40	+ (15)	+ (8)

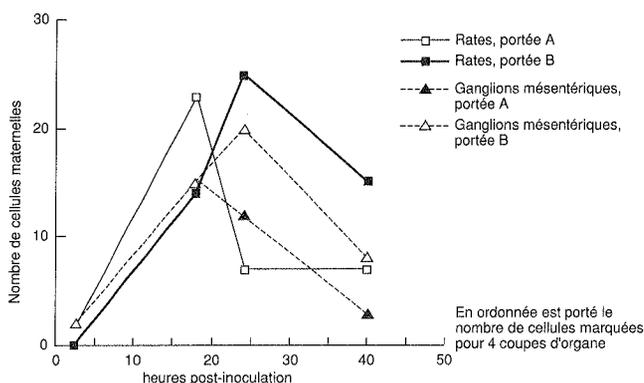
(1) temps en heures entre l'administration intragastrique de cellules colostrales marquées et l'abattage

(2) + : mise en évidence de cellules marquées

- : pas de cellules marquées

le chiffre entre parenthèse indique le nombre de cellules maternelles (fluorescentes) pour 4 coupes histologiques

**Figure 1** - Rate et ganglions mésentériques



## 2.5. Duodénum

Des cellules maternelles marquées sont mises en évidence dans le duodénum de tous les porcelets, de 2,5 heures à 40 heures suivant l'inoculation (tableau 2 et figure 2.a p 94). Ces cellules sont localisées dans l'épithélium intestinal, la *lamina propria* et la sous-muqueuse. Il est à noter d'une part la présence de cellules maternelles dans la sous-muqueuse dès le premier temps de prélèvement (2,5 heures post-inoculation), d'autre part la quasi-disparition des cellules marquées en position intra- et sous-épithéliale 40 heures après l'inoculation. Il n'y a pas de différences visibles entre les deux portées, mais le nombre de sujets et les résultats ne permettent pas une comparaison statistique.

## 2.6. Jéjunum

Des cellules maternelles sont mises en évidence dans tous les prélèvements de jéjunum, sauf pour l'un d'entre eux (portée B, 24 heures post-inoculation). Leur nombre est inférieur à celui observé dans le duodénum, et, à partir de 18 heures post-inoculation, les cellules sont localisées essentiellement dans la *lamina propria* (figure 2b p 94 et tableau 3 p 95).

## 2.7. Iléon

De 2,5 à 24 heures suivant l'inoculation, quelques cellules maternelles sont observées dans 5 des 6 échantillons examinés, essentiellement dans la *lamina propria*. A 40 heures, les deux prélèvements examinés sont négatifs. Le nombre de cellules maternelles dénombrées dans l'iléon est significativement réduit par rapport au duodénum et au jéjunum (figure 2c p 94 et tableau 4 p 95).

## 3. DISCUSSION

Nos résultats confirment la présence de cellules colostrales maternelles dans la circulation générale, la rate et l'intestin du porcelet nouveau-né. En raison du nombre réduit de sujets et des particularités des marquages par fluorochrome, cette expérimentation ne permet pas d'établir une cinétique (entre 2,5 heures et 40 heures) de passage transépithélial des cellules maternelles, ni de comparer les portées en fonction de la quantité de cellules maternelles inoculées. La décroissance dans le temps du marquage par fluorochrome des cellules inoculées a pu réduire le seuil de détection de ces cellules lors de l'examen. Par contre, la contre-coloration par l'hématoxyline permet de conclure que les structures fluorescentes que nous dénombrons sont bien des cellules morphologiquement intactes. Nous démontrons un passage de cellules colostrales maternelles dans la circulation générale: ces cellules se retrouvent dans les ganglions mésentériques, le sang périphérique et la rate, ce qui est en accord avec les résultats de TUBOLY et al (1988) et de WILLIAMS (1993). La pénétration des cellules colostrales dans l'intestin s'effectue à divers niveaux (duodénum, jéjunum et iléon), mais le duodénum est la zone de passage préférentielle. Ces cellules sont localisées dans l'épithélium intestinal, la *lamina propria* et la sous-muqueuse; 40 heures après l'inoculation, la majorité des cellules marquées est observée dans la *lamina propria*. Ceci suggère soit que les cellules maternelles observées sont en cours de migration vers la circulation générale, soit qu'une partie des cellules reste localisée dans la muqueuse intestinale.

Les questions restant posées sont la nature des cellules passant la barrière épithéliale, et leur devenir à long terme. On sait que les lymphocytes et les cellules épithéliales prédominent dans le colostrum de porc (LE JAN, 1993) et l'on peut envisager un passage préférentiel des lymphocytes dans la circulation générale, et une localisation intestinale des cellu-

les épithéliales, ou que seuls les lymphocytes aient la capacité de traverser la barrière épithéliale. Sur la base des données établies, la recherche d'une persistance à long terme de cellules colostrales au niveau duodénal doit être entreprise, ainsi que la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules qui franchissent la barrière intestinale.

Figure 2a, 2b et 2c - Duodenum, Jejunum, Iléon

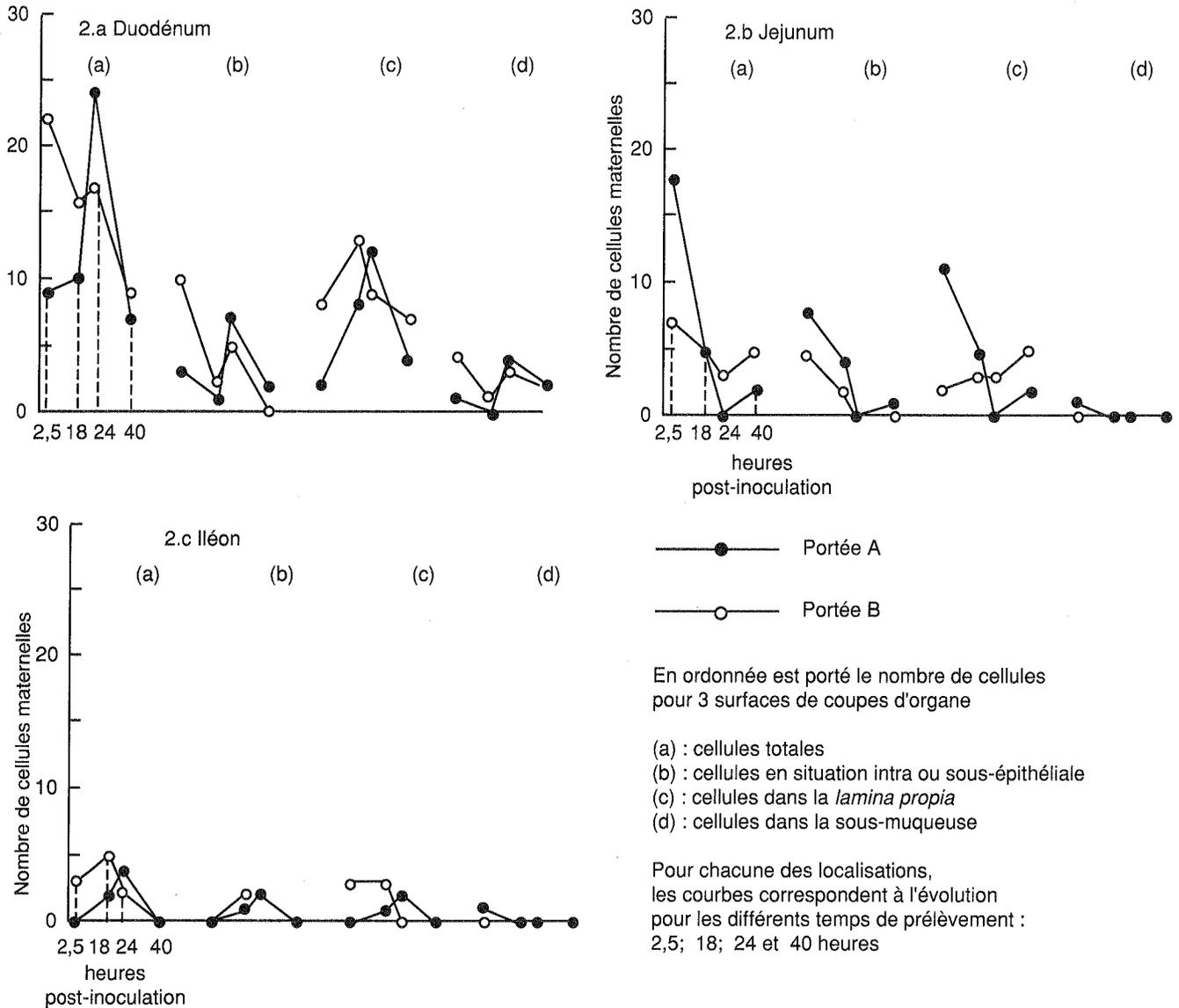


Tableau 2 - Mise en évidence de cellules colostrales maternelles dans le duodénum (muqueuse et sous-muqueuse)

Animal	h(1)	T(2)	IE(3)	SE(4)	LPV(5)	LPC(6)	SM(7)
392A	2,5	22	7	3	5	3	4
394B	2,5	9	3	0	2	3	1
391A	18	16	2	0	11	2	1
396B	18	10	1	0	8	1	0
388A	24	17	3	2	5	4	3
395B	24	24	7	0	12	1	4
389A	40	9	0	0	4	3	2
393B	40	7	1	1	3	0	2

(1) à (5) voir tableau 3

**Tableau 3** - Mise en évidence de cellules colostrales maternelles dans le jéjunum (muqueuse et sous-muqueuse)

Animal	h(1)	T(2)	IE(3)	SE(4)	LPV(5)	LPC(6)	SM(7)
392A	2,5	7	4	1	1	1	0
394B	2,5	18	6	0	8	3	1
391A	18	5	1	1	2	1	0
396B	18	5	0	0	4	1	0
388A	24	3	0	0	3	0	0
395B	24	0	0	0	0	0	0
389A	40	5	0	0	2	3	0
393B	40	2	0	0	1	1	0

(1) : temps en heures entre l'administration intragastrique de cellules colostrales marquées et l'abattage

(2) : nombre total de cellules maternelles pour 3 coupes histologiques

(3) : nombre de cellules maternelles en position intra-épithéliale

(4) : nombre de cellules maternelles en position sous-épithéliale

(5) : nombre de cellules maternelles dans la *lamina propria* des villosités

(6) : nombre de cellules maternelles dans la *lamina propria* des cryptes

(7) : nombre de cellules maternelles dans la sous-muqueuse

**Tableau 4** - Mise en évidence de cellules colostrales maternelles dans l'iléon (muqueuse et sous-muqueuse)

Animal	h(1)	T(2)	IE(3)	SE(4)	LPV(5)	LPC(6)	SM(7)
392A	2,5	3	0	0	0	3	0
394B	2,5	0	0	0	0	0	0
391A	18	5	0	2	1	2	0
396B	18	2	0	1	0	1	0
388A	24	2	1	1	0	0	0
395B	24	4	0	2	1	1	0
389A	40	0	0	0	0	0	0
393B	40	0	0	0	0	0	0

(1) à (7) : voir tableau 3

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Y. LEBRETON pour la pose des cathéters et des sondes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTOTTO A., GERLI R., FABIETTI G., CRUPI S., ARCANGELI C., SCALISE F., VACCARO R., 1990. Eur. J. Immunol., 20, 1877-1880.
- BINNS R.M., BLAKELEY D., LICENCE S.T., 1981. Int. Arch. Appl. Immunol., 341-349.
- EVANS P.A., NEWBY T.J., STOKES C.R., BOURNE F.J., 1982. Vet. Immunol. Immunopathol., 3, 515-527.
- LE JAN C., 1993. Res. Vet. Sci, 55, 265-270.
- LE JAN C., 1994. Res. Vet. Sci, 57, 300-304.
- MAGNUSSON U., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., EINARSSON S., 1991. Vet. Rec., 129, 485-490.
- SCHOLLENBERG A., FRYMUS T., DEGORSKI A., SCHOLLENBERG A., 1986. J. Vet. Med., 33, 31-38.
- TUBOLY S., BERNATH S., GLAVITS R., MEDVECZY I., 1988. Vet. Immunol. Immunopathol., 20, 75-85.
- WILLIAMS P.P., 1993. Can. J. Vet. Res., 57, 1-8.