



**HAL**  
open science

# Immunophenotypage et applications envisageables pour l'amélioration génétique des volailles

Fany Blanc

► **To cite this version:**

Fany Blanc. Immunophenotypage et applications envisageables pour l'amélioration génétique des volailles. Quinzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, Mar 2024, Tours, France. pp.255-263. hal-04515238

**HAL Id: hal-04515238**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04515238>**

Submitted on 21 Mar 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# IMMUNOPHENOTYPAGE ET APPLICATIONS ENVISAGEABLES POUR L'AMELIORATION GENETIQUE DES VOLAILLES

**Blanc Fany**

*Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France*  
[fany.blanc@inrae.fr](mailto:fany.blanc@inrae.fr)

## RÉSUMÉ

Le suivi de la réponse immunitaire des volailles est essentiel pour évaluer leur santé. L'immunophénotypage est une technique qui mesure les paramètres immunologiques après un défi immunitaire, tel qu'une vaccination ou une infection. Elle peut également fournir des paramètres indiquant l'immunocompétence des animaux à l'état basal. Différentes stratégies sont utilisées pour évaluer l'immunocompétence : mesurer la résistance/tolérance à un pathogène particulier ou par la mesure d'un panel de paramètres immunitaires. Certaines mesures sont directement effectuées à partir des cellules sanguines et du plasma, et permettent de mesurer la composition des cellules sanguines, les taux d'anticorps (totaux, naturels ou spécifiques), les protéines plasmatiques, les activités enzymatiques et bactéricides. D'autres paramètres, mesurables par stimulation *in vitro*, évaluent la capacité de phagocytose, la réponse à la stimulation du sang total ou la réactivité des lymphocytes T. Il est essentiel de comprendre les paramètres immunitaires qui sont des corrélats de la protection lors d'une vaccination ou d'une infection et qui caractérisent l'immunocompétence d'un animal. L'intégration des connaissances sur les paramètres qui contrôlent la réponse immunitaire et les compromis qui peuvent exister avec d'autres caractéristiques importantes telles que la performance, le stress et le bien-être des animaux est également cruciale si l'on veut les exploiter pour l'amélioration génétique des volailles. L'exploitation de la variabilité naturelle des caractéristiques immunitaires pour améliorer génétiquement l'immunocompétence des animaux pourrait être une approche prometteuse, intégrée de manière complémentaire aux stratégies actuelles telles que la vaccination pour promouvoir la durabilité de l'élevage.

## ABSTRACT

### **Immunophenotyping and possible applications for poultry breeding**

Monitoring the immune response in poultry is crucial to assess their health. Immunophenotyping is a technique that measures immunological parameters after an immune challenge, such as vaccination or infection. It can also provide parameters that indicate the immunocompetence of the animals in their normal state. Different strategies are used to assess immunocompetence: measuring resistance/tolerance to a particular pathogen or measuring a panel of immune parameters. Some measurements are taken directly from blood cells and plasma, which can measure the composition of blood cells, antibody levels (total, natural, or specific), plasma proteins, enzymatic and bactericidal activities. Other parameters, measurable by *in vitro* stimulation, assess phagocytosis capacity, response to whole blood stimulation, or T lymphocyte reactivity. Understanding the immune parameters that are correlates of protection during vaccination or infection, and that characterize the immunocompetence of an animal is essential. Integrating knowledge about the parameters that control the immune response and the trade-offs that may exist with other important traits such as performance, stress, and animal welfare is also crucial if they are to be exploited for the genetic improvement of poultry. Exploiting the natural variability of immune characteristics to genetically improve the immunocompetence of animals could be a promising approach, integrated in a complementary way with current strategies such as vaccination to promote sustainable breeding.

## INTRODUCTION

Certains animaux résistent mieux aux maladies, répondent mieux à la vaccination ou plus généralement montrent une robustesse plus importante au cours de leur vie. Comprendre ce qui détermine cette variabilité et en avoir des indicateurs mesurables permettrait de pouvoir envisager de nouveaux phénotypes en sélection.

De fortes pressions sociétales et environnementales sont exercées sur l'élevage, avec de nouvelles considérations liées au bien-être animal et à la durabilité des élevages. De plus, des pathologies chroniques ou émergentes existent en élevage et sont responsables de pertes économiques importantes. Dans ce contexte, améliorer la robustesse et la résistance des animaux aux pathogènes devient une priorité. Introduire des critères de santé dans les futurs schémas de sélection pour produire des animaux globalement plus résistants à des pathologies et stress divers, et bons répondeurs à la vaccination, devient un enjeu majeur.

L'immunophénotypage (ou mesure de paramètres immunitaires) permet non seulement de suivre l'évolution de la réponse immunitaire suite à un challenge immunitaire (vaccination, infection) mais également d'évaluer les effets de perturbations d'autres natures que peuvent rencontrer les animaux en élevage comme le stress, les changements climatiques ou de conditions d'élevage. Par ailleurs, immunophénotyper des animaux au cours de leur vie « en conditions normales », sans perturbation majeure identifiée a priori, constitue une source d'informations pouvant servir d'indicateurs de leur statut immunitaire et potentiellement de leur immunocompétence, c'est-à-dire de leur capacité à déclencher une réponse immunitaire efficace en réponse à des pathogènes.

Nous allons revenir dans cet article sur les stratégies pour mesurer l'immunocompétence. Nous recenserons ensuite les outils disponibles pour l'immunophénotypage à des fins d'études génétiques sur les volailles. Enfin, nous discuterons des conditions pour envisager des applications pour l'amélioration génétique des volailles.

## 1. STRATEGIES POUR EVALUER L'IMMUNOCOMPETENCE DES VOLAILLES

### 1.1. Concept et définition de l'immunocompétence

L'immunocompétence représente "la capacité de l'organisme à produire une réponse immunitaire appropriée et efficace lorsqu'il est exposé à divers agents pathogènes" (Hine *et al.*, 2014). C'est « une mesure de la capacité d'un organisme à minimiser les coûts d'adaptation d'une infection par quelque moyen que ce soit » (Owens and Wilson, 1999). C'est donc l'ensemble des fonctions immunitaires qui favorisent la résistance et/ou la tolérance aux maladies et contrôlent l'inflammation dans les maladies

infectieuses ainsi que dans d'autres causes de stress inflammatoire. Les mécanismes de résistance et de tolérance contribuent à la résilience aux maladies, c'est-à-dire à la capacité d'un animal à maintenir sa productivité lorsqu'il est confronté à une maladie (Bishop, 2012). L'immunocompétence contribue donc à cette résilience aux maladies et plus généralement à la résilience générale, considérée comme la capacité d'un animal à maintenir sa productivité face à divers défis environnementaux, biotiques et/ou abiotiques.

Plus récemment, le concept de résilience immunitaire est apparu et est défini comme la capacité de préserver et/ou de restaurer rapidement l'immunocompétence suite à un stress pathogénique ou d'une autre nature (Ahuja *et al.*, 2023). L'immunocompétence est donc un concept à considérer tout au long de la vie des animaux.

Des stratégies de gestion intégrée de la santé incluant l'approche génétique visant à améliorer l'immunocompétence et la résilience immunitaire auraient donc le potentiel de contribuer à réduire à la fois l'incidence et la gravité des maladies, ce qui aurait pour effet d'améliorer la santé et le bien-être des animaux et de réduire le recours aux antibiotiques pour prévenir et traiter les maladies.

### 1.2. Stratégies pour mesurer l'immunocompétence

#### Stratégie directe : résistance/tolérance à un pathogène particulier

Pour évaluer l'immunocompétence, des stratégies directes ciblent la résistance/tolérance des animaux à des agents pathogènes spécifiques. La stratégie repose sur l'hypothèse que même si les réponses immunitaires sont hautement spécifiques d'un antigène donné, la capacité à produire une réponse immunitaire fonctionnellement efficace pourrait être en grande partie un caractère générique. La mesure de la réponse immunitaire à un pathogène serait donc susceptible d'être représentative des réponses à d'autres pathogènes. Cependant, cela n'est pas toujours le cas. En effet, la réponse d'un animal à un agent pathogène donné n'est pas forcément liée à sa réponse à d'autres agents pathogènes comme démontré chez la drosophile et le cricket (Fellowes *et al.*, 1999; Letendre *et al.*, 2022). Parfois même, les mécanismes de réponses diffèrent et sont négativement corrélés. Une relation défavorable a ainsi été rapportée entre la production d'anticorps et la sensibilité à *Leishmania tropica*, un parasite intracellulaire des macrophages chez des souris (Hale and Howard, 1981). Chez les bovins laitiers, une corrélation génétique défavorable a également été rapportée entre les réponses immunitaires cellulaires et humorales (Thompson-Crispi *et al.*, 2012).

De plus, la sélection génétique pour la résistance à un pathogène pourrait avoir des effets contreproductifs à long terme en exerçant une pression de sélection qui pourrait entraîner des stratégies d'échappement par les pathogènes et réduire l'effet de la sélection pour la résistance à la maladie (Hulst *et al.*, 2022).

Cette stratégie directe semble donc risquée et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les effets sur le long terme de la sélection pour la résistance à une maladie spécifique sur la susceptibilité à d'autres maladies.

### **Stratégie indirecte : mesure d'un panel de paramètres immunitaires**

Une approche indirecte et supposée globale se concentre sur l'analyse de la variabilité individuelle d'un panel de paramètres immunitaires qui permettraient de prédire les réponses aux agents pathogènes dans leur ensemble. Le sang est une source précieuse d'informations sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme et sur le statut immunitaire des animaux (Chaussabel, 2015). Etant de plus relativement facile d'accès, il constitue un compartiment de choix pour cette recherche de paramètres indicateurs d'immunocompétence.

Les paramètres mesurés doivent refléter les différents types d'immunité développés lors d'infections par des pathogènes ou lors d'une vaccination : immunité innée et adaptative (anticorps maternels passivement transmis, réponses humorales et cellulaires).

Différentes méthodes ont ainsi été proposées pour mesurer des index d'immunocompétence dans d'autres espèces que le poulet (Wilkie and Mallard, 1999; Reverter *et al.*, 2021) ou chez le poulet de chair (Sivaraman and Kumar, 2013).

Plus de travaux de recherche sont nécessaires pour déterminer s'il existe une corrélation entre ces paramètres d'immunocompétence et les réponses à différents agents pathogènes, et l'importance d'une telle corrélation. Cette approche globale aurait néanmoins un potentiel d'exploitation moins risqué.

## **2. IMMUNOPHENOTYPAGE DES VOLAILLES : QUELLES POSSIBILITES DE MESURES ADAPTEES AUX ETUDES GENETIQUES ?**

Pour que ces mesures soient adaptées aux études génétiques en recherche, il est important de pouvoir mesurer ces paramètres sur un grand nombre d'animaux et, idéalement, suivre leur évolution tout au long de la vie des animaux. Cette quantité importante d'échantillons implique une gestion rigoureuse et beaucoup de savoir-faire pour la réalisation des prélèvements (tubes de sang avec anticoagulants adaptés, identification des animaux, traçabilité des prélèvements), la préparation des tubes de sang au laboratoire (préparation des plasmas, aliquotes et stockage) et la réalisation des différentes mesures. La durée et les conditions de stockage doivent être adaptées à chacune des mesures à réaliser. Il est aussi indispensable d'avoir des protocoles répétables et standardisés pour obtenir des données robustes. Les analyses statistiques doivent évaluer si un facteur expérimental doit être considéré. La faisabilité pratique et le coût des mesures sont également des critères non négligeables pour ces études.

Selon les espèces considérées, il existe plus ou moins d'outils disponibles pour mesurer ces paramètres au laboratoire. Pour certaines espèces, cela restreint les possibilités d'analyse ou leur précision. Certaines analyses sont des prestations proposées par des laboratoires d'analyse vétérinaires privés ou par des plateformes dédiées. Nous proposons ici de recenser et de décrire certains paramètres immunitaires mesurés chez la poule dans notre laboratoire, principalement dans le sang (Figure 1).

### **2.1. Mesures directes dans le sang - monitoring**

#### **Analyse de la composition des cellules sanguines**

L'analyse de la composition des cellules sanguines est utilisée en médecine humaine et vétérinaire pour évaluer l'état immunitaire et sanitaire d'un individu (Samour, 2009). Les granulocytes, les monocytes et les cellules tueuses naturelles (NK) sont impliqués dans la détection et l'élimination immédiate des agents pathogènes, ainsi que dans la transmission de signaux à d'autres cellules. Les lymphocytes B et T développent une réponse hautement spécifique à un antigène particulier et créent une mémoire immunologique avec la capacité de répondre très rapidement et efficacement aux agents pathogènes lors d'une seconde rencontre. Des changements dans les leucocytes d'un individu peuvent être un indice d'infections virales, bactériennes ou parasitaires, d'une immunosuppression induite par un toxique, d'un stress ou d'une inflammation aiguë (Fairbrother and O'Loughlin, 1990; Maxwell and Robertson, 1998; Samour, 2009).

La réalisation de formules sanguines ou comptages automatisés des cellules sanguines par des hémacytomètres est une technique rapide et précise utilisée chez les mammifères. Cependant, ces systèmes ne font pas la différence entre les érythrocytes, les thrombocytes et les leucocytes des oiseaux car toutes ces cellules sont nucléées. L'utilisation d'anticorps spécifiques des populations de cellules sanguines est donc nécessaire pour une analyse automatisée par cytométrie en flux chez les espèces aviaires. Selon les espèces, la disponibilité de ces anticorps est très inégale. Chez le poulet, plusieurs stratégies ont été développées (Fair *et al.*, 2008; Seliger *et al.*, 2012; Bílková *et al.*, 2017). D'après ces stratégies, nous en avons développé une permettant le comptage et l'identification des cellules sanguines par cytométrie en flux à relativement haut-débit (Figure 2). Selon l'âge des animaux et leur lignée, des différences peuvent être observées dans l'expression de certains marqueurs et la stratégie doit être adaptée. A partir de ces analyses, certains ratios calculés sont décrits comme étant des marqueurs de stress comme le ratio hétérophiles/lymphocytes (Lentfer *et al.*, 2015) ou de la balance entre immunité humorale et cellulaire comme le ratio CD4/CD8. En plus des données de comptage absolu ou de la proportion de chacun des types cellulaires, les niveaux d'expression de certains marqueurs peuvent également être des

paramètres à considérer pour évaluer l'immuno-compétence s'ils sont révélateurs du statut d'activation des cellules. C'est le cas de l'expression de CD8 $\alpha$  par les lymphocytes T $\gamma\delta$  (Pieper *et al.*, 2011).

Des réactions croisées entre les anticorps dirigés contre différents marqueurs du poulet et d'autres espèces aviaires ont été répertoriées mais nécessiteraient d'être confirmées (Lu, Lee and Lillehoj, 2023). Quoiqu'il en soit, ces anticorps ne permettraient pas de réaliser des identifications aussi complètes et précises que celles possibles chez le poulet. Pour le canard, une analyse des différents leucocytes sanguins a été établie par cytométrie de flux en appliquant une combinaison d'anticorps monoclonaux nouvellement générés ainsi que des anticorps qui croisent avec le poulet (Jax *et al.*, 2023). Chez la dinde, il est également possible d'utiliser les réactions croisées des anticorps avec le poulet (Lindenwald *et al.*, 2019). Chez le lapin, un certain nombre d'anticorps sont aussi disponibles (Jeklova *et al.*, 2020).

Pour les espèces pour lesquelles il n'y a pas d'anticorps spécifiques commercialisés ou croisant avec d'autres espèces, certaines stratégies d'analyse par cytométrie en flux basées sur la taille et la structure des cellules (en utilisant un colorant fluorescent pour la coloration des organelles) ont été proposées (Uchiyama *et al.*, 2005). Enfin, la réalisation de frottis sanguins colorés peut s'avérer être la seule solution pour identifier les différents types cellulaires, mais c'est une technique plus laborieuse et moins précise qui nécessite une expertise pointue. L'émergence et la disponibilité d'algorithmes d'intelligence artificielle pour des analyses d'images peuvent considérablement aider à l'analyse de ces lames en routine (Sparavigna *et al.*, 2017).

D'autres paramètres sont évalués lors de la réalisation de formules sanguines, notamment différentes caractéristiques des globules rouges (volume, teneur en hémoglobine, ...). Certaines de ces mesures sont assez facilement réalisables comme l'évaluation de l'hématocrite (la fraction du sang constituée de globules rouges) par centrifugation de tubes micro-hématocrites.

### Mesures des taux d'anticorps

Trois classes d'immunoglobulines (IgA, IgM et IgY) existent et peuvent être mesurées chez la poule. La présence d'anticorps homologues des IgE et IgD des mammifères a également été suspectée (Carlander *et al.*, 1999) mais il n'existe pas d'anticorps spécifiques de ces classes d'Ig pour les doser. Les IgM sont les premiers anticorps exprimés au cours de la réponse immunitaire. Elles agissent en tant que récepteur à la surface des lymphocytes B et jouent un rôle important dans l'activation du système du complément. Les IgA ont un rôle de défense immunitaire dans les muqueuses. Les IgY aviaires sont génétiquement et structurellement différentes de leurs homologues mammifères, les IgG, mais sur le plan fonctionnel,

elles jouent des rôles biologiques similaires. Ce sont toutes deux des immunoglobulines majeures qui assurent la défense contre les agents infectieux et apparaissent dans la circulation sanguine à des concentrations élevées à la suite d'une exposition à un antigène.

Différents types d'anticorps peuvent être mesurés à l'aide de tests ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) ou en fonction de leur activité, par exemple leur capacité à agglutiner des particules recouvertes d'antigènes (hémagglutination), à neutraliser des virus ou à favoriser la phagocytose (opsonisation).

La mesure des taux d'anticorps totaux des 3 différents sous-types permet de refléter l'immunité humorale globale (Kramer *et al.*, 2003). Les anticorps naturels (NAb) sont des anticorps présents chez un individu sain sans qu'il soit nécessaire de l'exposer préalablement à un antigène exogène. Les NAb sont considérés comme une partie humorale de l'immunité innée. Ils présentent un large répertoire de spécificité et agissent comme une première ligne de défense contre les infections (Palma *et al.*, 2018). Chez les poules pondeuses, des niveaux élevés de NAb ont été associés à une plus grande probabilité de survie pendant la période de ponte (Star *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011; Wondmeh *et al.*, 2015) et une protection contre l'infection à *Escherichia coli* pathogène aviaire (Berghof *et al.*, 2019). Les anticorps spécifiques de pathogènes sont mesurés pour suivre les réponses humorales suite à des infections ou à des vaccinations. De nombreux kits de dosage ELISA sont commercialisés par différents fournisseurs, avec plus ou moins de possibilités selon les espèces de volaille.

### Mesures de protéines plasmatiques ou d'activités enzymatiques et bactéricides

Des mesures des taux de protéines sériques ou plasmatiques totales peuvent être réalisées à l'aide de différentes méthodes comme la réfractométrie, la méthode du biuret ou la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay). Une diminution des protéines totales peut indiquer une hémorragie chronique, une mauvaise absorption intestinale, une insuffisance hépatique ou rénale ou une immunodépression. En cas d'augmentation des protéines totales, il convient d'abord d'exclure une activité reproductive chez les femelles, puis de rechercher une déshydratation ou un état pathologique inflammatoire (Harr, 2009).

Une électrophorèse des protéines sériques ou plasmatiques sépare les composants des protéines en cinq fractions principales en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Un automate permettant la réalisation d'électrophorèse capillaire peut être utilisé et permet d'obtenir une mesure à relativement haut-débit, nécessitant un faible volume d'échantillon. Les fractions d' $\alpha$ -globuline sont constituées de protéines inflammatoires de la phase aiguë telles que l' $\alpha$ -lipoprotéine, l' $\alpha$ 1-antitrypsine, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et l'haptoglobine. La fraction  $\beta$ -globuline est notamment composée de fibrinogène, de  $\beta$ -lipoprotéine, de

transferrine et de protéines du complément. Des augmentations des taux des  $\alpha$ - et  $\beta$ -globulines ont été décrites lors d'infections parasitaires, bactériennes et fongiques (Harr, 2009; Hamzic *et al.*, 2015). La fraction  $\gamma$ -globuline contient principalement les immunoglobulines. L'avantage de ces électrophorèses plasmatiques des protéines est que la méthode peut être réalisée pour toutes les espèces de volailles, aucun réactif spécifique n'étant nécessaire. L'interprétation des profils pourra cependant être différente selon les espèces.

Un examen plus précis de molécules particulières pour les différentes fonctions qu'elles exercent lors de la réponse immunitaire (innée et acquise) peut également être informatif. Ces molécules circulent à l'état basal et sont induites lors d'une inflammation chronique, liée à une infection ou encore après une vaccination (Janmohammadi *et al.*, 2020). Des dosages de protéines inflammatoires de la phase aigüe (O'Reilly and Eckersall, 2014) (protéine C-réactive, sérum amyloïde A protéine, haptoglobine), de certains composants du complément, ou encore de cytokines constitueraient donc une source potentielle de paramètres immunitaires d'immunocompétence.

L'activité de certaines de ces molécules peuvent aussi être mesurées comme des activités enzymatiques : lysozyme, peroxydase, espèces réactives de l'oxygène. Une mesure de l'activité bactéricide pourrait également permettre de mettre en évidence l'activité de peptides anti-microbiens (Cuperus *et al.*, 2013).

### **Transcriptome ou protéome sanguin**

Des approches sans a priori de mesure du transcriptome ou du protéome sanguin peuvent aussi être considérées comme une source de biomarqueurs d'immunocompétence (Burgess, 2004; Désert *et al.*, 2016). Ces analyses sont très complètes mais néanmoins très coûteuses pour les envisager à très grande échelle.

### **2.2. Paramètres mesurables suite à des stimulations *in vitro***

Un autre type de mesures de paramètres immunitaires repose sur l'analyse des réponses des cellules suite à des stimulations *in vitro*. Ces mesures nécessitent en général l'utilisation de cellules fraîches. Si elle est parfois techniquement possible, la congélation des cellules n'est pas indiquée car la variabilité du phénotype mesuré pourrait être impactée par la qualité de la congélation et induire un biais expérimental très fort. Ces mesures nécessitent donc un travail de laboratoire intense et contraint dans le temps.

#### **Capacité de phagocytose**

Le système immunitaire utilise le processus de phagocytose pour détruire les cellules infectées par des pathogènes. Il existe des méthodes relativement rapides permettant d'évaluer la capacité de phagocytose globale des cellules sanguines en évaluant l'internalisation d'un colorant, le rouge

neutre (Song *et al.*, 2022). La cytométrie en flux peut également permettre de mesurer la phagocytose de particules ou de bactéries marquées par un fluorochrome. Chez les espèces aviaires, la combinaison avec un marquage par un anticorps anti-CD45 est nécessaire. Les activités de phagocytose des différents types cellulaires identifiés par leur taille et structure sont alors mesurables (Naghizadeh *et al.*, 2019).

#### **Stimulations sang total**

La réactivité des cellules sanguines à différents stimuli est considérée comme une mesure d'immunocompétence. Un large éventail de stimuli peut être utilisé comme des bactéries et des virus entiers ou des agonistes spécifiques des différents récepteurs de l'immunité innée (Duffy *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2021; Lesueur *et al.*, 2022). L'adaptation de ce test aux volailles repose sur la possibilité de pouvoir doser la signature cytokinique suite à ces stimulations. Chez le poulet, il existe des tests ELISA mesurant les cytokines une à une et même des dosages en multiplex de panel de cytokines.

#### **Activité des cellules T**

L'activité des cellules T dans la circulation (échantillonnage non destructif) ou dans la rate ou les ganglions lymphatiques (échantillonnage destructif) peut être déterminée en mesurant leur capacité à proliférer ou à sécréter des cytokines produites en réponse à l'exposition à un mitogène ou à un antigène. Les tests de détection de l'IFN $\gamma$  par ELISpot sont particulièrement sensibles et indiqués pour évaluer la réponse cellulaire à une vaccination.

## **3. QUELLES APPLICATIONS SONT ENVISAGEABLES POUR L'AMELIORATION GENETIQUE DES VOLAILLES ?**

### **3.1. Immunophénotypage : une source d'indicateurs d'immunocompétence**

L'immunophénotypage des volailles permet de mesurer la réponse immunitaire induite lors d'une infection ou d'une vaccination. Parmi les nombreux paramètres immunitaires mesurables, si certains sont décrits comme étant modulés lors de ces perturbations, aucun d'entre eux ne mesure nécessairement l'efficacité de la réponse immunitaire. Toutefois, en comparant les paramètres cliniques et immunologiques au sein d'une population d'hôtes, il est possible d'identifier des "corrélats de protection" immunologiques robustes.

Une « bonne » réponse à une vaccination n'est pas nécessairement déterminée par une quantité importante d'anticorps produits. Si des seuils de séropositivité sont établis, la corrélation avec l'efficacité vaccinale n'est pas si simple. Par exemple, pour des pathogènes intracellulaires tels que *Eimeria*, la réponse des anticorps n'est pas un corrélat fiable de la protection contre la maladie. Le test de référence pour évaluer l'efficacité protectrice des vaccins reste

encore de regarder leur réponse suite à une infection (présence et transmission du pathogène, signes cliniques et performances) (Souther *et al.*, 2020). L'apparition et la persistance de l'immunité sont également importantes, bien que la pertinence de ces paramètres varie en fonction de la population cible (poulets de chair ou poules pondeuses par exemple). Lors d'une infection, les réponses immunitaires devraient aussi être évaluées en fonction de l'efficacité avec laquelle elles protègent un individu. D'un point de vue immunologique, « plus » n'est pas nécessairement mieux. La réponse immunitaire maximale n'est pas nécessaire dans tous les cas. Parfois même, les dommages causés par l'emballement du système immunitaire sont importants. C'est le cas par exemple lors d'infection par le virus Influenza chez les poules mais pas chez les canards (Burggraaf *et al.*, 2014). La recherche de corrélats de protection (à l'échelle de l'individu, mais aussi du troupeau voire du territoire) reste donc un enjeu pour mesurer des réponses efficaces aux vaccinations et aux infections. Dans ce contexte, les données d'immunophénotypage constituent une source importante d'indicateurs potentiels (Hamzic *et al.*, 2015).

L'immunophénotypage des animaux à l'état basal pourrait permettre d'évaluer l'immunocompétence des animaux. Il n'est plus question de déterminer des indicateurs des réponses mais plutôt des prédicteurs de ces réponses. L'acquisition de connaissances sur des données d'immunophénotypage des animaux avant et après différentes perturbations est encore cruciale pour déterminer des paramètres indicateurs de l'immunocompétence. Des valeurs cibles et des optima de ces paramètres immunitaires restent donc encore à définir.

### **3.2. Variabilité individuelle des paramètres immunitaires et déterminisme génétique**

Pour déterminer si ces paramètres immunitaires peuvent être exploités dans les programmes de sélection, il est nécessaire de comprendre et déterminer ce que sont les caractéristiques d'un système immunitaire sain, quels sont les facteurs de variation – génétiques et environnementaux – des paramètres immunitaires mesurés, et quelle est l'importance de leur variation.

Chez différentes espèces, y compris la volaille, il existe une variabilité importante des réponses à la vaccination, aux infections ou à d'autres stress abiotiques. Il y a également une forte variabilité individuelle des paramètres immunitaires à l'état basal. Chez les poules, les effets du sexe (Minozzi *et al.*, 2007; Jax *et al.*, 2023), de l'âge (Song *et al.*, 2021; Jax *et al.*, 2023) ou encore du mode d'élevage sont souvent rapportés (Hofmann *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2022; Sarrigeorgiou *et al.*, 2023). Les effets du microbiote sur ces paramètres immunitaires sont également étudiés par des modèles de perturbations

par des antibiotiques (Schokker *et al.*, 2017; Lecoeur *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2022) ou encore par des analyses d'association (Aruwa *et al.*, 2021; Borey *et al.*, 2022).

Les effets de la génétique sont évalués par comparaison de différentes races ou par la sélection de lignées divergentes sur des caractères immunitaires mais également à l'échelle de la variabilité individuelle au sein de populations (mesures d'héritabilité pour évaluer la part attribuée à la génétique dans la variabilité des paramètres immunitaires, GWAS pour identifier des marqueurs génétiques).

#### **Comparaison de races**

Des comparaisons de races montrent des différences plus ou moins importantes selon les paramètres immunitaires considérés. Cette variation reflète une combinaison de sélection artificielle et naturelle agissant sur les caractères liés à la santé et au stress. Cela a par exemple été démontré chez les poules pour la composition en cellules sanguines (Bílková *et al.*, 2017), les NAb (Sun *et al.*, 2011), ou d'autres paramètres (Kramer *et al.*, 2003). Nous avons également récemment mis en évidence des différences de réponses à la vaccination (Lecoeur *et al.*, 2022). Ces différences entre races ou lignées pourraient être exploitées dans le cadre de croisements afin d'obtenir des animaux plus robustes.

#### **Sélection de lignées divergentes**

Plusieurs études rapportent la sélection divergente de volailles basée sur la quantification de paramètres immunitaires, montrant ainsi l'existence d'un contrôle génétique des variations de ces paramètres immunitaires. Ainsi, le rôle de la génétique de l'hôte dans la variation de la réponse vaccinale a été démontré par des sélections génétiques de poules pondeuses White Leghorn pour une réponse humorale élevée à une vaccination contre le virus de la maladie de Newcastle (NDV), une réponse immunitaire à médiation cellulaire élevée et une activité phagocytaire élevée (Pinard-van der Laan, 2002). D'autres expériences de sélection ont été menées sur la réponse anticorps (Dan Heller *et al.*, 1992; Parmentier *et al.*, 2004), la présence d'anticorps naturels (Berghof *et al.*, 2018) ou le ratio H/L (Wang *et al.*, 2023). Des sélections sur des index d'immunocompétence définis par plusieurs paramètres ont également été réalisées avec succès (Kean *et al.*, 1994; Sivaraman and Kumar, 2013).

#### **Estimations des héritabilités**

Des estimations d'héritabilités ont été réalisées pour un certain nombre de paramètres immunitaires tels que la réponse anticorps, la réponse à médiation cellulaire T ou la phagocytose chez les poules pondeuses après des challenges *in vivo* (Cheng, Rothschild and Lamont, 1991), à des réponses anticorps contre différents pathogènes dans une étude de terrain (Psifidi *et al.*, 2016), ou encore pour des taux de NAb et d'anticorps totaux (Berghof *et al.*,

2015; Berghof *et al.*, 2018). Ces héritabilités sont variables selon les caractères et les populations étudiées. Peu d'études d'héritabilités ont finalement été réalisées sur l'ensemble des paramètres immunitaires qu'il est possible d'immunophénotyper chez les volailles.

### **Etudes d'associations génétiques**

Quelques études d'associations génétiques ont été conduites et ont permis d'identifier de potentiels loci de traits quantitatifs (QTL) de l'immunité. Par exemple, pour les NAb et les anticorps totaux, une région du chromosome 4 a été trouvée comme significativement associée avec un variant causal probable dans le gène *TLR1A* (Berghof *et al.*, 2018). D'autres QTL potentiels pour l'immunité ont été associés aux titres d'anticorps naturels et acquis et à la réactivité du complément, mettant en évidence les rôles des gènes *IL17A*, *IL12B* et *MHC* dans la fonction immunitaire (Biscarini *et al.*, 2010). Une autre étude a révélé des associations génétiques entre des régions du génome et des taux d'IgY, les quantités d'hétérophiles et de lymphocytes dans le sang, et les réponses anticorps à un vaccin contre le virus Influenza et des érythrocytes de mouton (Zhang *et al.*, 2015).

Le déterminisme génétique des paramètres immunitaires est donc généralement établi et montre que leur sélection génétique est théoriquement possible.

### **Vers l'étude du déterminisme hologénétique des paramètres d'immunocompétence**

Les microbiotes des animaux peuvent également avoir des effets sur ces paramètres immunitaires et sur la réponse des animaux aux infections. Il a été montré par exemple que l'administration d'antibiotiques ou de probiotiques exerce des effets immunomodulateurs sur des paramètres immunitaires, notamment dans le sang (Jankowski *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2022). Par ailleurs, la prise en compte du microbiote en plus de la génétique a permis d'améliorer la prédiction de caractères immunitaires chez le porc (Calle-García *et al.*, 2023). Intégrer ces informations sur les microbiotes et les interactions hôtes - microbiotes va nécessiter des évolutions dans les modèles d'évaluation génétique pour prendre en compte ce déterminisme hologénétique (Estellé, 2019).

### **3.3. Corrélations phénotypiques et génétiques entre immunocompétence et autres fonctions importantes**

Les relations phénotypiques et génétiques entre l'immunocompétence et les caractéristiques de production doivent être évaluées à la lumière de la théorie de l'allocation des ressources, car l'investissement de ressources supplémentaires dans un domaine fonctionnel peut être préjudiciable à d'autres (Friggens *et al.*, 2017). Il a notamment été établi que la sélection génétique des volailles en vue d'obtenir un taux de croissance supérieur ou de

meilleures performances s'est traduite par une diminution de la résistance aux maladies ou une réduction de la réponse immunologique (Bayyari *et al.*, 1997; Van Der Most *et al.*, 2011; Zerjal *et al.*, 2021). Cependant d'autres études concluent différemment, comme Kean *et al.* (1994) montrant qu'une sélection divergente pour des paramètres immunitaires n'a pas impacté des paramètres de production liés à la ponte, ou Psifidi *et al.* (2016) n'estimant pas de corrélations génétiques significatives entre les caractéristiques d'immunité, de maladie et de production. Finalement, en comparant des lignées historiques et modernes, il a été mis en évidence que les concentrations en protéines inflammatoires de la phase aigüe n'ont pas été affectées par la sélection (O'Reilly *et al.*, 2018).

Il est donc nécessaire de contrôler les compromis entre fonctions immunitaires et performances dans les différentes études menées. En plus de l'étude de ces compromis, il apparaît nécessaire d'étudier également les compromis avec d'autres types de phénotypes comme le stress et le bien-être des animaux, dans des contextes d'élevages durables.

## **CONCLUSION**

L'exploitation de la variabilité naturelle des caractéristiques immunitaires pour améliorer génétiquement l'immunocompétence des animaux pourrait être une approche prometteuse en l'intégrant de manière complémentaire aux stratégies actuelles comme la vaccination pour promouvoir un élevage durable. Il faudrait néanmoins pouvoir cibler plus pertinemment les paramètres immunitaires qui définissent l'immunocompétence d'un animal et sa résilience immunitaire et intégrer toutes les connaissances acquises sur les paramètres qui les contrôlent et les compromis qui peuvent exister avec les autres traits d'importance tels que la performance, le stress et le bien-être des animaux pour pouvoir les exploiter pour l'amélioration génétique des volailles. Des questions se posent également sur les stratégies de sélection qui devraient être appliquées pour ces caractères de compétence immunitaire. Quel poids donner à ces nouveaux caractères ? L'utilisation de modélisations épidémio-génétiques apparaît ici comme une approche intéressante pour y répondre. Plus globalement, l'impact économique et la gestion des risques sanitaires doivent également être considérés dans les réflexions.

## **REMERCIEMENTS**

Merci au Dr Marie-Hélène Pinard van der Laan pour sa relecture et ses conseils. Merci au personnel des unités expérimentales qui veillent sur les animaux au quotidien. Merci également aux chercheurs et aux techniciens de l'équipe Génétique, Microbiote, Santé de l'unité INRAE GABI qui s'investissent sur ces questions de recherche.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahuja, S.K. *et al.* 2023 *Nat. Commun.*, (14).
- Aruwa, C.E. *et al.* 2021 *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, (12), 1–15.
- Bayyari, G.R. *et al.* 1997 *Poult. Sci.*, (76), 289–296.
- Berghof, T.V.L. *et al.* 2015 *PLoS One*, (10), 1–13.
- Berghof, T. V.L. *et al.* 2018 *Vaccine*, (36), 1444–1452.
- Berghof, T.V.L. *et al.* 2018 *Front. Immunol.*, (8).
- Berghof, T.V.L. *et al.* 2019 *Dev. Comp. Immunol.*, (93), 45–57.
- Bílková, B. *et al.* 2017 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (188), 71–77.
- Biscarini, F. *et al.* 2010 *Anim. Genet.*, (41), 26–38.
- Bishop, S.C. 2012 *Front. Genet.*, (3), 1–7.
- Borey, M. *et al.* 2022 *Sci. Rep.*, (12), 1–14.
- Burgess, S.C. 2004 *Poult. Sci.*, (83), 552–573.
- Burggraaf, S. *et al.* 2014 *Virus Res.*, 23–31.
- Calle-García, J. *et al.* 2023 *Genet. Sel. Evol.*, (55), 1–12.
- Carlander, D., Ståhlberg, J. and Larsson, A. 1999 *Ups. J. Med. Sci.*, (104), 179–189.
- Chaussabel, D. 2015 *Semin. Immunol.*, (27), 58–66.
- Cheng, S., Rothschild, M.F. and Lamont, S.J. 1991 *Poult. Sci.*, (70), 2023–2027.
- Cuperus, T. *et al.* 2013 *Dev. Comp. Immunol.*, (41), 352–369.
- Dan Heller, E. *et al.* 1992 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (34), 159–172.
- Désert, C. *et al.* 2016 *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics*, (20), 1–9.
- Duffy, D. *et al.* 2014 *Immunity*, (40), 436–450.
- Estellé, J. 2019 *J. Anim. Breed. Genet.*, (136), 75–76.
- Fair, J.M. *et al.* 2008 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (125), 268–273.
- Fairbrother, A. and O’Loughlin, D. 1990 *J. Wildl. Dis.*, (26), 76–82.
- Fellowes, M.D.E., Kraaijeveld, A.R. and Godfray, H.C.J. 1999 *Evolution (N. Y.)*, (53), 966–972.
- Friggens, N.C. *et al.* 2017 *Animal*, (11), 2237–2251.
- Hale, C. and Howard, J.G. 1981 *Parasite Immunol.*, (3), 45–55.
- Hamzic, E. *et al.* 2015 *J. Anim. Sci.*, (93), 1830–1840.
- Harr, K.E. 2009 in G.J. Harrison and T. Lightfoot (eds) *Clin. Avian Med.*
- Hine, B.C. *et al.* 2014 *Breed. Focus 2014 – Improv. Resil.*, 49–64.
- Hofmann, T. *et al.* 2020 *Animals*, (10), 1–26.
- Hulst, A.D., Bijma, P. and De Jong, M.C.M. 2022 *Genet. Sel. Evol.*, (54), 1–19.
- Jankowski, J. *et al.* 2022 *Animals*, (12).
- Janmohammadi, A. *et al.* 2020 *PLoS One*, (15), 1–9.
- Jax, E. *et al.* 2023 *Microbiol. Spectr.*, (11), 1–15.
- Jeklova, E. *et al.* 2020 *Vet. Res.*, (51), 1–15.
- Kean, R.P. *et al.* 1994 *Poult. Sci.*, (73), 18–32.
- Kramer, J. *et al.* 2003 *Br. Poult. Sci.*, (44), 577–585.
- Lecoeur, A. *et al.* 2022 *Proc. 12th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod.*, 442–445.
- Lentfer, T.L. *et al.* 2015 *Br. Poult. Sci.*, (56), 157–163.
- Lesueur, J. *et al.* 2022 *Front. Immunol.*, (13), 1–15.
- Letendre, C. *et al.* 2022 *J. Anim. Ecol.*, (91), 1471–1488.
- Lindenwald, R. *et al.* 2019 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (210), 46–54.
- Lu, M., Lee, Y. and Lillehoj, H.S. 2023 *Dev. Comp. Immunol.*, (138), 104525.
- Maxwell, M.H. and Robertson, G.W. 1998 *Worlds. Poult. Sci. J.*, (54), 168–178.
- Minozzi, G. *et al.* 2007 *Poult. Sci.*, (86), 1316–1322.
- Van Der Most, P.J. *et al.* 2011 *Funct. Ecol.*, (25), 74–80.
- Naghizadeh, M. *et al.* 2019 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (207), 53–61.
- O’Reilly, E.L., Bailey, R.A. and Eckersall, P.D. 2018 *Poult. Sci.*, (97), 3847–3853.
- O’Reilly, E.L. and Eckersall, P.D. 2014 *Worlds. Poult. Sci. J.*, (70), 27–43.
- Owens, I.P.F. and Wilson, K. 1999 *Trends Ecol. Evol.*, (14), 170–172.
- Palma, J. *et al.* 2018 *Cent. Eur. J. Immunol.*, (43), 466–475.
- Parmentier, H.K. *et al.* 2004 *Dev. Comp. Immunol.*, (28), 39–49.
- Pieper, J., Methner, U. and Berndt, A. 2011 *Infect. Immun.*, (79), 822–829.
- Pinard-van der Laan, M.H. 2002 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (87), 199–205.
- Psifidi, A. *et al.* 2016 *Genet. Sel. Evol.*, (48), 1–16.
- Reid, C. *et al.* 2021 *Sci. Rep.*, (11), 1–13.
- Reverter, A. *et al.* 2021 *J. Anim. Sci.*, (99), 1–7.
- Samour, J. 2009 in G.J. Harrison and T. Lightfoot (eds) *Clin. Avian Med. Spix Publi.*
- Sarrigeorgiou, I. *et al.* 2023 *Biology (Basel)*, (12).
- Schokker, D. *et al.* 2017 *BMC Genomics*, (18), 1–14.
- Seliger, C. *et al.* 2012 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (145), 86–99.
- Sivaraman, G.K. and Kumar, S. 2013 *Vet. World*, (6), 628–631.
- Song, B. *et al.* 2021 *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, (12), 1–12.
- Song, B. *et al.* 2022 *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, (13), 1–26.
- Soutter, F. *et al.* 2020 *Front. Vet. Sci.*, (7), 1–12.
- Sparavigna, A.C., Sparavigna, A.C. and Torino, P. 2017.
- Star, L. *et al.* 2007 *Poult. Sci.*, (86), 1090–1099.
- Sun, Y. *et al.* 2011 *Poult. Sci.*, (90), 2263–2274.
- Thompson-Crispi, K.A. *et al.* 2012 *J. Dairy Sci.*, (95), 401–409.
- Uchiyama, R. *et al.* 2005 *J. Vet. Med. Sci.*, (67), 441–444.
- Wang, J. *et al.* 2023 *Commun. Biol.*, (6), 1–12.
- Wilkie, B. and Mallard, B. 1999 *Vet. Immunol. Immunopathol.*, (72), 231–235.
- Wondmeneh, E. *et al.* 2015 *Poult. Sci.*, (94), 1493–1498.
- Zerjal, T. *et al.* 2021 *Genet. Sel. Evol.*, (53), 1–17.
- Zhang, L. *et al.* 2015 *PLoS One*, (10), e0117269.

