

Une supplémentation précoce en fructooligosaccharides à courte chaîne (FOScc) stimule la maturation du système immunitaire intestinal des porcelets allaités et améliore la réactivité immunitaire ultérieure

Cindy LE BOURGOT (1), Emmanuelle APPER (1), Laurence LE NORMAND (2), Sophie BLAT (2), Frédérique RESPONDEK (1), Stéphanie FERRET-BERNARD (2), Isabelle LE HUËROU-LURON (2)

(1) Tereos, ZI et Portuaire, 67390 Marckolsheim, France

(2) Institut NuMeCan (Nutrition, Métabolismes et Cancer) INRA, INSERM, Université Rennes 1, 35590 Saint-Gilles, France
emmanuelle.apper@tereos.com

Une supplémentation précoce en fructooligosaccharides à courte chaîne (FOScc) stimule la maturation du système immunitaire intestinal des porcelets allaités et améliore la réactivité immunitaire ultérieure

La nutrition périnatale joue un rôle décisif dans la primo-colonisation bactérienne et constitue un facteur important pour la maturation de l'immunité intestinale. Les fructooligosaccharides à courte chaîne (FOScc) étant des prébiotiques connus pour moduler le microbiote, notre étude a évalué les effets d'une telle supplémentation sur la fonctionnalité du système immunitaire intestinal des porcelets. Des truies ont reçu un régime supplémenté en FOScc ou non (CTRL) en fin de gestation et pendant la lactation. La maturation du système immunitaire intestinal a été évaluée à 21 jours. Au sevrage à 28 jours, la moitié des porcelets de chaque portée a reçu le régime CTRL ou FOScc pendant 4 à 7 semaines. En post-sevrage, deux challenges vaccinaux ont été effectués séparément, un premier vaccin dirigé contre la bactérie intestinale *Lawsonia intracellularis* et le second contre le virus respiratoire *Influenza* afin d'évaluer la réactivité immunitaire ultérieure. La supplémentation maternelle en FOScc a stimulé le développement du système immunitaire du porcelet allaité. Une telle amélioration a entraîné des effets bénéfiques sur sa fonctionnalité ultérieure, objectivée par un renforcement des mécanismes de défense (cellules à mucus et sécrétion de cytokines) et de la réponse vaccinale (anticorps spécifiques). La supplémentation maternelle en FOScc a amélioré la réponse immunitaire au vaccin contre *L. intracellularis*, mais pas celle contre le virus *Influenza*. La supplémentation directe en FOScc en post-sevrage n'a augmenté que la réponse vaccinale au virus *Influenza*. Par conséquent, la fenêtre d'exposition nutritionnelle aux FOScc (maternelle versus post-sevrage) conditionne les effets sur le système immunitaire. Nos résultats soulignent le rôle joué par la supplémentation précoce en prébiotiques pour optimiser la fonctionnalité de l'immunité intestinale des porcelets afin d'obtenir des bénéfices sur la santé.

Early short-chain fructooligosaccharide (scFOS) supplementation stimulates maturation of the intestinal immune system of suckling piglets and improves its later immune responsiveness

Perinatal nutrition plays a decisive role in controlling gut bacterial primo-colonization and, thereby, is an important driver of the development and maturation of intestinal immunity. Since a short-chain fructooligosaccharide (scFOS) prebiotic was known to modulate microbiota, our study evaluated effects of such supplementation on intestinal immunity development and functionality of piglets. Sows received a standard diet supplemented with scFOS or not (CTRL) for the last third of gestation and the entire lactation. Intestinal immune system maturation was assessed at PND 21 during lactation. At postnatal day (PND) 28, piglets were weaned on a CTRL or scFOS diet for four to seven weeks. Then, during the post-weaning period, two vaccine challenges were performed individually; one vaccine directed against *Influenza* respiratory virus and the other directed against the intestinal bacterium *Lawsonia intracellularis*, to assess immune responsiveness later in life. Maternal scFOS supplementation stimulated the development of the offspring intestinal immune system before weaning. Such improvement induced beneficial effects on its functionality, later in life, by enhancing local defense mechanisms (number of goblet cells and cytokine secretion) and responsiveness to a bacterial vaccine challenge (production of specific antibodies). Interestingly, the maternal scFOS supplementation improved the immune response to *L. intracellularis* vaccine, but not that to the vaccine directed against the *Influenza* respiratory virus. The direct scFOS supplementation of weaned piglets increased the response to *Influenza* challenge, but not to *L. intracellularis* vaccine. Thus, the window of nutritional exposure to scFOS (maternal versus post-weaning) conditioned the consequences on the immune system. Our results highlight the role played by early prebiotic supplementation to optimize intestinal immune functionality in piglets to obtain health benefits.

INTRODUCTION

La nutrition fœtale ainsi que l'alimentation lors des premières semaines de vie sont essentielles pour la survie des porcelets. En effet, la nutrition périnatale joue un rôle décisif dans la primo-colonisation bactérienne qui est un facteur important pour le développement et la maturation de l'immunité intestinale, avec des conséquences ultérieures sur les fonctions physiologiques. Il a été établi que le système immunitaire des nouveau-nés est caractérisé par un déséquilibre de la balance entre les réponses Th1 (pro-inflammatoires) et Th2 (anti-inflammatoires)/Treg (régulateurs). Ce biais vers la réponse de type Th2/Treg engendre une susceptibilité élevée aux infections par les pathogènes et altère la réponse immunitaire à la plupart des vaccins chez les nouveau-nés (Adkins *et al.*, 2004). L'allaitement apporte une première protection aux nouveau-nés du fait de la présence d'anticorps maternels spécifiques (immunoglobulines G (IgG) et A (IgA)) et de cellules immunitaires (Harris *et al.*, 2006), pendant que le système immunitaire néonatal continue de se développer pour devenir complètement fonctionnel.

La colonisation progressive du tube digestif par le microbiote est essentielle à la maturation post-natale à la fois des défenses intestinales non spécifiques (sécrétion de mucus et d'IgA sécrétoires (sIgA) dans la lumière intestinale), mais également de la réactivité du système immunitaire muco-sal (différenciation des cellules immunitaires muco-sales, sécrétion de médiateurs immunitaires tels que les cytokines, etc.) (Sommer et Backhed, 2013).

La mise en place et la maturation des systèmes digestif et immunitaire jouent un rôle majeur dans le développement du porcelet et dans sa capacité à répondre aux infections. Dans le contexte actuel où l'utilisation des antibiotiques en élevage porcin doit être limitée et représente un enjeu majeur pour la filière, des alternatives se sont avérées efficaces et parmi celles-ci figurent l'utilisation de prébiotiques. Ces derniers sont définis comme des ingrédients fermentés sélectivement qui induisent des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal, conférant ainsi des bénéfices pour la santé de l'hôte (Roberfroid *et al.*, 2010). Parmi les prébiotiques reconnus, les fructooligosaccharides à courte chaîne (FOScc) montrent des effets bénéfiques intéressants sur le système immunitaire chez les jeunes animaux ou les adultes en consommant (Hosono *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2002). Cependant, peu d'études se sont intéressées aux effets de ces fibres prébiotiques lorsqu'elles sont présentes dans le régime maternel. Adogony *et al.* (2007) ont observé une augmentation de la teneur en Ig du colostrum de chiennes ayant reçu des FOScc en gestation (Adogony *et al.*, 2007). Ils ont également observé une tendance à une meilleure réponse vaccinale chez les chiots dont les mères avaient reçu des FOScc. Afin de mieux comprendre l'effet des FOScc distribués pendant la période *peripartum* sur la mise en place du système immunitaire, des truies ont été supplémentées pendant la fin de la gestation et toute la lactation. L'impact sur la santé du porcelet allaité et les conséquences ultérieures sur la fonctionnalité intestinale après le sevrage ont été évaluées, en condition basale et stimulée à l'aide d'un challenge vaccinal.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux, traitements et schéma expérimental

L'expérimentation animale a été réalisée au sein de l'Unité Expérimentale Porcine de Rennes (UE1421 UEPR, Saint-Gilles). Quarante-six truies Large White x Landrace gestantes (primipares ou multipares) inséminées artificiellement avec de la semence de verrat Piétrain, ont été réparties en deux groupes équilibrés selon leur parité et leur poids au début du 3^{ème} mois de gestation. Le régime du premier groupe de truies a été supplémenté avec des maltodextrines (MALDEX, Tereos ; groupe contrôle (CTRL)) alors que le régime du second groupe a été supplémenté avec des FOScc (Profeed P95, Beghin-Meiji ; groupe FOScc (scFOS)). Ces régimes ont été distribués pendant les 4 dernières semaines de gestation (truies restreintes à 3 kg d'aliment/jour) ainsi que pendant les 4 semaines de lactation (truies nourries *ad libitum* avec une consommation moyenne de 6 à 7 kg d'aliment/jour), soit 8 semaines au total. La supplémentation maternelle était de 3,3 g/kg d'aliment pendant la gestation et 1,5 g/kg d'aliment pendant la lactation, résultant en un apport journalier de maltodextrines et FOScc de l'ordre de 10 g.

Entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour de vie, les portées ont été égalisées à 11 ou 12 porcelets, en enlevant ou en ajoutant des porcelets. Les adoptions ont été réalisées entre portées appartenant au même traitement nutritionnel. Durant toute la période de lactation, les porcelets ont reçu uniquement le lait maternel et n'ont pas eu accès à l'aliment solide.

Tous les porcelets ont été sevrés à 28 jours et répartis en fonction de leur régime. La moitié des porcelets de chaque portée a été supplémentée en FOScc (1,5 g/kg d'aliment, scFOS) ou en maltodextrines (1,5 g/kg d'aliment, CTRL) jusqu'à l'âge de 56 à 77 jours conduisant à quatre groupes de porcelets après le sevrage selon leur lot d'affectation : mère CTRL/porcelet CTRL (CTRL/CTRL), mère CTRL/porcelet ccFOS (CTRL/scFOS), mère ccFOS/porcelet CTRL (scFOS/CTRL), mère ccFOS/porcelet ccFOS (scFOS/scFOS).

1.2. Prélèvements et mesures pendant la période de lactation

Dans les premières heures suivant la mise-bas, le colostrum des truies (n=13 CTRL et n=14 FOScc) a été prélevé. Une partie du colostrum a été immédiatement congelée à -20°C pour en mesurer la concentration en IgA et IgG par dosage ELISA (Bethyl Laboratories) et une autre partie a été centrifugée (400 g pendant 12 min à 4°C) pour récupérer la phase aqueuse et quantifier ensuite la teneur en TGFB1 par dosage ELISA (Promega Corporation) après congélation à -20°C

A l'âge de 21 jours, un sous-groupe de porcelets (n=34, issus de 34 portées différentes, 17/groupe) a été euthanasié par électronarcose, immédiatement suivie par une exsanguination, et leur tractus digestif a été prélevé. Afin de caractériser la maturation du système immunitaire muco-sal intestinal, les cellules mononucléées ont été isolées et purifiées à partir des sites inducteurs de la réponse immunitaire intestinale (plaques de Peyer (PP) jéjunale et iléale, et ganglions mésentériques). Ces cellules ont été mises en culture pendant 3 jours en présence de Concanavalline A (ConA, agent mitogène) pour évaluer la sécrétion de cytokines pro- (IFN γ) et anti-inflammatoires (IL-10) par dosage ELISA (R&D systems).

La sécrétion des sIgA a été mesurée après culture des mêmes cellules isolées des PP pendant 7 jours sans stimulation, par dosage ELISA (Bethyl Laboratories). Les caractéristiques phénotypiques des sous-populations de cellules immunitaires de la PP iléale ont été analysées par cytométrie de flux multi-couleurs.

1.3. Challenge vaccinal pendant la période post-sevrage

Afin d'évaluer la fonctionnalité du système immunitaire à moyen terme (en post-sevrage), nous avons réalisé deux challenges vaccinaux avec deux vaccins ayant des modes d'action différents, sur deux groupes de porcs distincts.

1.3.1. Vaccin Influenza

Le premier vaccin, dirigé contre le virus de la grippe porcine *Influenza* à tropisme respiratoire (Gripovac®3), a été administré par voie intramusculaire en deux fois (n=107 porcelets vaccinés): une 1^{ère} injection une semaine après le sevrage (35 jours d'âge) suivie d'un rappel trois semaines plus tard (56 jours). Des porcelets n'ont pas été vaccinés (n=11 CTRL/CTRL et n=10 scFOS/scFOS) afin de servir de contrôle non vacciné. Des prélèvements de sang ont été réalisés sur tous les porcelets au niveau de la veine jugulaire à l'âge de 29 jours (avant la vaccination), 56 jours (3 semaines après la vaccination), et 77 jours (3 semaines après le rappel). Les concentrations d'IgA et d'IgG sériques spécifiques du vaccin ont été mesurées par un dosage ELISA (ID Screen Influenza A Antibody Competition, ID-VET).

1.3.2. Vaccin *Lawsonia intracellularis*

Le second vaccin, dirigé contre la bactérie intestinale *Lawsonia intracellularis* à tropisme intestinal (Enterisol® Ileitis), a été administré à 33 jours d'âge par voie orale (n=117 porcelets vaccinés et n=16 porcs non vaccinés dont 4/groupe). Nous avons utilisé une dose concentrée 10 fois pour pouvoir mesurer la production d'Ig, difficile à détecter avec une dose unique (Nogueira *et al.*, 2013) malgré une bonne efficacité du vaccin. La réponse immunitaire a été évaluée par l'analyse des IgA et IgG sériques spécifiques à 54 jours d'âge (BioScreen Ileitis Antibody ELISA). A 56 jours d'âge, 40 porcs ont été sacrifiés, comme précédemment décrit, afin de collecter des échantillons de caecum pour analyse histologique des cellules à mucus, et des échantillons de tissu iléal pour la mesure de la sécrétion de cytokines mucosales (IL-4, IFN γ et TNF α), des sIgA totales, et des IgA spécifiques du vaccin, par dosage ELISA. Pour l'histologie du caecum, les échantillons ont été prélevés dans du PBS avec 4% de paraformaldéhyde pendant 24 h à 4°C puis transférés dans une solution de PBS + 30% de sucrose, congelés par de la glace carbonique et sectionnés (coupes 10 μ m) par un cryostat-microtome. Les sections ont ensuite été colorées au bleu alcian et à l'acide périodique Schiff avant d'être examinées au microscope optique pour mesurer la profondeur et l'aire des cryptes, ainsi que le nombre de cellules à mucus par crypte.

1.4. Analyses statistiques

Les données ont été analysées par ANOVA à l'aide du logiciel R Core Team (2013; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; URL <http://www.R-project.org/>). Pour les données obtenues pendant la période de lactation avec uniquement deux régimes (CTRL ou scFOS), les variables suivantes ont été analysées : régime maternel, répétition et interaction régime maternel x répétition. Pour les résultats post-sevrage, l'effet du régime post-sevrage a été ajouté dans

le modèle ANOVA, ainsi que l'interaction régime maternel x régime post-sevrage. La réponse vaccinale (comparaison des porcs vaccinés et non-vaccinés) a été analysée par un test de Student ou de Welch après un test de normalité et d'égalité des variances. Les différences significatives sont définies avec une P-value < 0,05 et les tendances avec une P-value < 0,10.

2. RESULTATS

2.1. Qualité immunitaire du colostrum

La concentration en IgA (CTRL : 8,7 \pm 0,9 mg/mL et scFOS : 13,1 \pm 2,4 mg/mL; $P < 0,05$) et en TGF β 1 (CTRL : 92,3 \pm 10,3 ng/mL et scFOS : 119,2 \pm 11,5 ng/mL; $P < 0,10$) est plus élevée dans le colostrum des truies supplémentées en FOScc que dans celui des truies CTRL, sans modification de la teneur en IgG.

2.2. Maturation du système immunitaire intestinal du porcelet allaité

L'apport de FOScc dans le régime des truies a augmenté ($P < 0,05$) la sécrétion d'IFN γ après culture *in vitro* pendant trois jours des cellules isolées à partir de trois sites (plaques de Peyer jéjunales et iléale et ganglions mésentériques), sans modification parallèle de la sécrétion d'IL-10 (Tableau 1). De plus, une augmentation de la sécrétion de sIgA par les plaques de Peyer jéjunales ($P < 0,10$) et iléale ($P < 0,05$) a également été mesurée après sept jours de culture chez ces mêmes animaux (Tableau 1).

Tableau 1 – Sécrétion d'IFN γ , d'IL-10 et de sIgA par les cellules mononucléées isolées des sites inducteurs de la réponse immunitaire chez les porcelets allaités âgés de 21 jours¹

	CTRL	scFOS
Sécrétion d'IFNγ (pg/mL)		
- plaque de Peyer iléale	23,4 \pm 4,6	97,2 \pm 28,6*
- plaques de Peyer jéjunales	143,4 \pm 53,3	845,6 \pm 297,3 [#]
- ganglions mésentériques	65,1 \pm 40,9	458,4 \pm 238,1 [#]
Sécrétion d'IL-10 (pg/mL)		
- plaque de Peyer iléale	90,3 \pm 29,8	135,0 \pm 53,4
- plaques de Peyer jéjunales	39,7 \pm 27,7	173,9 \pm 58,4
- ganglions mésentériques	408,0 \pm 90,4	506,0 \pm 119,1
Sécrétion de sIgA (ng/mL)		
- plaque de Peyer iléale	49,1 \pm 3,6	71,8 \pm 10,7*
- plaques de Peyer jéjunales	43,5 \pm 6,4	87,3 \pm 20,5 [#]

¹ Moyennes \pm SEM; n=13-16/groupe pour la plaque de Peyer iléale; n=3-6/groupe pour les plaques de Peyer jéjunales; n=8-11/groupe pour les ganglions mésentériques; * $P < 0,05$; [#] $P < 0,10$.

L'analyse spécifique des modifications phénotypiques de certaines populations immunitaires présentes au niveau de la plaque de Peyer iléale par cytométrie de flux a révélé une augmentation de la proportion de cellules T CD25+CD4 α + activées parmi l'ensemble des cellules T CD4+ (CTRL : 66,7 \pm 4,3% et scFOS : 86,5 \pm 5,6%; $P < 0,05$) avec la supplémentation maternelle en FOScc, positivement corrélées à la sécrétion d'IFN γ ($P < 0,05$; Pearson R square = 0,29).

2.3. Défenses intestinales non spécifiques du porc sevré

La supplémentation maternelle en FOScc a augmenté le poids du caecum des descendants à J56 ($P < 0,05$) et tendait également à augmenter le nombre de cellules à mucus par crypte ($P < 0,10$). Au niveau de la muqueuse iléale, la concentration d'IFN γ et d'IL-4 était augmentée chez les porcs dont les mères ont été supplémentées en FOScc ($P < 0,05$ et $P < 0,10$ respectivement).

La supplémentation directe en FOScc après le sevrage a, quant à elle, réduit la concentration de TNF α dans la muqueuse iléale

($P = 0,10$), et la teneur en sIgA ($P < 0,05$), sans modification des autres paramètres mesurés.

Tableau 2 – Morphométrie du cæcum et concentrations d'IFN γ , d'IL-10, de TNF α et de sIgA dans la muqueuse iléale des porcelets à 56 jours d'âge¹

	CTRL/CTRL	CTRL/scFOS	scFOS/CTRL	scFOS/scFOS	P-value		
					Régime maternel	Régime sevrage	Interaction
Poids du cæcum (g/kg PV)	1,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	0,01	NS	0,07
Cellules à mucines /crypte cæcale (n)	38,6 \pm 2,6	43,1 \pm 2,5	42,6 \pm 3,5	46,7 \pm 2,9	0,06	NS	NS
IFN γ (pg/mL)	83,8 \pm 3,0	90,8 \pm 3,4	116,0 \pm 20,1	93,8 \pm 4,4	0,05	NS	NS
IL-4 (pg/mL)	504,8 \pm 43,1	509,4 \pm 35,2	689,0 \pm 87,0	511,4 \pm 34,5	0,07	NS	NS
TNF α (pg/mL)	128,0 \pm 6,2	125,7 \pm 4,4	137,9 \pm 4,1	127,2 \pm 3,7	NS	0,10	NS
sIgA (ng/mL)	62,6 \pm 12,5	45,8 \pm 5,4	72,0 \pm 9,2	54,8 \pm 7,7	NS	0,04	NS

¹ Moyennes \pm SEM ; n=10/groupe ; PV : poids vif ; NS : non significatif $P > 0,10$.

2.4. Réponse immunitaire spécifique au vaccin *Influenza* du porc sevré

La supplémentation maternelle ainsi que la supplémentation directe en FOScc n'ont pas impacté les niveaux d'IgG spécifiques de la grippe porcine (Figure 1). Cependant, la consommation de FOScc après le sevrage a augmenté la réponse IgA spécifique dans le sérum ($P < 0,05$; Figure 1).

Aucune différence significative n'a été observée avec la supplémentation maternelle en FOScc.

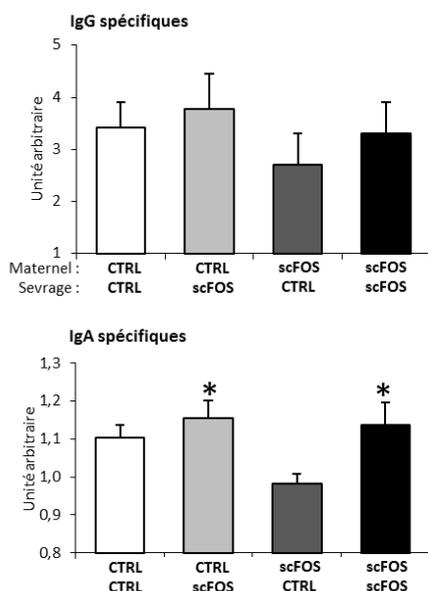


Figure 1 – Réponse des IgG et des IgA spécifiques du vaccin *Influenza* dans le sérum des porcs de 77 jours¹

¹ Moyennes \pm SEM ; * Effet significatif du régime post-sevrage $P < 0,05$.

2.5. Réponse immunitaire spécifique au vaccin *L. intracellularis* du porc sevré

La supplémentation maternelle en FOScc a augmenté la concentration d'IgA spécifiques du vaccin contre *L. intracellularis* dans le sérum des porcs sevrés ($P < 0,01$), sans modifier celle des IgG spécifiques. Une tendance à l'augmentation de ces IgA spécifiques dans la muqueuse iléale ($P = 0,08$) a également été observée chez les animaux dont les mères ont été supplémentées en FOScc.

La supplémentation directe en FOScc après le sevrage n'a pas influencé les teneurs en Ig spécifiques dans le sérum ou la muqueuse intestinale des porcs (Figure 2).

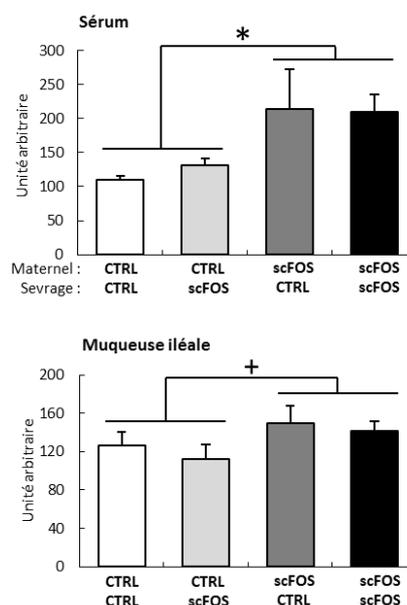


Figure 2 – Réponse IgA spécifique du vaccin *L. intracellularis* dans le sérum et la muqueuse iléale des porcs de 54 jours¹

¹ Moyennes \pm SEM ; * Effet significatif du régime maternel $P < 0,05$;

+ Tendance à un effet du régime maternel $P < 0,10$.

3. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'une supplémentation périnatale en prébiotiques (FOScc) sur le développement du système immunitaire intestinal du porcelet allaité et sur sa fonctionnalité intestinale après le sevrage. Nous avons tout d'abord montré que la consommation de FOScc par les truies gestantes, pendant le dernier mois avant la mise-bas, a amélioré la qualité immunitaire du colostrum objectivée par une augmentation de la teneur en IgA et en TGF β 1. Cette amélioration de l'immunité passive transmise aux nouveau-nés a également été démontrée par d'autres auteurs, avec l'utilisation d'autres types prébiotiques dans le régime maternel comme les GOS chez la souris (avec une dose plus élevée de 4% vs 0,33% dans notre étude) (Gourbeyre et al., 2012), ou les MOS (8 g/j) chez la truie (Czech et al., 2010). L'immunité dérivée du colostrum, et notamment la teneur en IgA et en TGF β 1, représente une composante importante pour le développement et la maturation de l'immunité jusqu'au sevrage, assurant une protection du porcelet contre les pathogènes intestinaux et l'acquisition d'une tolérance aux antigènes alimentaires (Salmon et al., 2009).

Nous avons ensuite évalué le développement et la maturation du système immunitaire intestinal des porcelets âgés de 21 jours. Nos résultats démontrent que la supplémentation en FOScc dans l'alimentation des truies en fin de gestation et en lactation a amélioré la maturation du système immunitaire intestinal des porcelets allaités, caractérisée par une augmentation de la sécrétion d'IFN γ par les cellules isolées des sites inducteurs de la réponse immunitaire mucoale intestinale. Cette augmentation d'IFN γ est le reflet d'une amplification de la réponse immunitaire du porcelet vers un profil Th1 favorable à l'établissement de l'équilibre essentiel entre les réponses immunitaires Th1 et Th2/Treg. L'analyse spécifique des modifications phénotypiques des populations immunitaires de la PP iléale a révélé une augmentation de la proportion de cellules T CD25+CD4 α + activées parmi l'ensemble des cellules T CD4+, positivement corrélées à la sécrétion d'IFN γ . De plus, une augmentation de la sécrétion de sIgA par les PP jéjunale et iléale a également été mesurée chez ces mêmes animaux, démontrant une amélioration des mécanismes de défense de la muqueuse intestinale chez les porcelets dont les mères ont été supplémentées en FOScc. Des résultats similaires sur la stimulation de la sécrétion d'IgA au niveau intestinal ont été obtenus chez les rongeurs directement supplémentés en FOScc (Hosono *et al.*, 2003) ou *via* le régime maternel (Nakamura *et al.*, 2004). L'ensemble de nos résultats démontre que la supplémentation maternelle en FOScc favorise le développement et la maturation du système immunitaire muc des porcelets allaités en association avec une amélioration de la qualité immunitaire du colostrum (Le Bourgot *et al.*, 2014).

Après avoir démontré que la supplémentation maternelle en scFOS permettait d'accélérer la mise en place et le développement de l'immunité intestinale des porcelets allaités, notre objectif était d'analyser la fonctionnalité intestinale après le sevrage. Pour cela, nous avons dans un premier temps analysé des marqueurs non spécifiques de défense intestinale (cellules à mucus, sécrétion de cytokines et sIgA). Puis, nous avons réalisé un challenge vaccinal pour évaluer la capacité du système immunitaire à répondre à une stimulation par un agent pathogène et mettre en évidence des modifications fonctionnelles du système immunitaire qui pourraient être non perceptibles en condition basale non stimulée. Deux fenêtres de supplémentation en FOScc ont été comparées : maternelle et/ou directe en post-sevrage, ainsi que le potentiel effet synergique entre les deux périodes de supplémentation. Les résultats ont montré, dans un premier temps, que la supplémentation maternelle en FOScc renforce les défenses intestinales non spécifiques des porcs sevrés en tendant à augmenter le nombre de cellules cœcales à mucus en association avec une amélioration de la production de certaines cytokines iléales. Les cellules à mucus sont des cellules épithéliales spécialisées sécrétant des mucines impliquées dans le maintien de l'intégrité de la surface de la muqueuse intestinale (Kim et Ho, 2010). Dans le même sens, Gourbeyre *et al.* (2012) ont démontré une augmentation de l'expression de MUC2 (une mucine majeure synthétisée par les cellules caliciformes) chez les souris exposées aux GOS pendant les périodes périnatale et post-sevrage (Gourbeyre *et al.*, 2012). Cet effet trophique sur la muqueuse intestinale pourrait être lié à la sécrétion augmentée de cytokines iléales observée en parallèle. En effet, l'IFN γ et l'IL-4 sont des inducteurs importants de l'expression génique des mucines (MUC1 et MUC2) sécrétées par les cellules caliciformes (Cornick *et al.*, 2015). Cette capacité augmentée à produire des

médiateurs immunitaires et à améliorer les mécanismes de défense intestinale après le sevrage pourrait être la résultante des modifications précoces de la maturation du système immunitaire mucoale pendant la période d'allaitement. Nous avons ensuite analysé la réponse du système immunitaire en condition de challenge, à l'aide de deux types de vaccination, l'un contre un virus à tropisme respiratoire, l'autre contre une bactérie à tropisme intestinal. De façon intéressante, la supplémentation maternelle en FOScc n'a pas modifié la réponse au vaccin dirigé contre *Influenza*, mais a augmenté celle dirigée contre *L. intracellularis* (Le Bourgot *et al.*, 2017). Au contraire, la réponse au vaccin *Influenza* a été optimisée par la supplémentation directe en FOScc après le sevrage (Le Bourgot *et al.*, 2016), sans modification de la réponse spécifique à *L. intracellularis*. Ainsi, la fenêtre d'exposition nutritionnelle aux FOScc (maternel *versus* post-sevrage) a conditionné les effets sur le système immunitaire.

L'optimisation de la maturation du système immunitaire intestinal pendant la vie néonatale par la supplémentation maternelle en FOScc, associée à une amélioration de la qualité immune transmise à la naissance, favorise la fonctionnalité du système immunitaire après le sevrage, comme en témoigne la réponse au challenge bactérien intestinal. Nous pouvons ainsi proposer que la supplémentation maternelle en FOScc a programmé le système immunitaire intestinal pour répondre de manière appropriée aux pathogènes intestinaux. A l'inverse, l'apport direct de FOScc au porc sevré pourrait impacter différemment l'immunité, *via* des modifications distinctes de la composition du microbiote. En effet, le processus abrupte de sevrage induit de fortes modifications de la composition et de la complexité du microbiote intestinal et plusieurs semaines sont nécessaires pour établir un équilibre bactérien (Hampson *et al.*, 1985). Dans ce contexte, la consommation de prébiotiques au cours de cette phase post-sevrage pourrait favoriser la croissance d'espèces bactériennes spécifiques avec des conséquences sur la réponse humorale. Il a en effet été montré qu'une diversité élevée du microbiote intestinal était corrélée à une amélioration de la protection contre un challenge immunitaire (Eloe-Fadrosh *et al.*, 2013; Seekatz *et al.*, 2013). La consommation de prébiotiques est associée à une plus grande diversité et richesse du microbiote intestinal (Sivieri *et al.*, 2014), et notamment une stabilisation plus rapide des communautés bactériennes après le sevrage chez les porcs supplémentés (Janczyk *et al.*, 2010; Konstantinov *et al.*, 2003). De plus, les FOScc sont bien connus pour stimuler la croissance de bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium spp.* et *Lactobacillus spp.* (Saulnier *et al.*, 2008). Cette dernière bactérie a été montrée comme ayant un rôle dans le contrôle de l'immunité adaptative après une infection respiratoire (Ichinohe *et al.*, 2011), mais cela a également été observé après une vaccination *Influenza* (Olivares *et al.*, 2007; Rizzardini *et al.*, 2012). Ainsi, une modification de la composition du microbiote avec la consommation de FOScc après le sevrage, dans le sens d'une diversité bactérienne plus élevée et de la croissance de bactéries bénéfiques, pourrait expliquer cette augmentation de la réponse humorale au vaccin *Influenza*. Cependant, en raison de la complexité du microbiote, il est difficile d'établir les déterminants bactériens exacts de la réponse immunitaire à un challenge vaccinal. Ainsi, la plasticité du système immunitaire intestinal et la faible diversité du microbiote chez les nouveau-nés, contrairement à un système immunitaire intestinal mature et un microbiote complexe chez le porc sevré, pourraient expliquer les effets distincts de

l'administration de prébiotiques à la mère ou à la descendance après le sevrage, et en conséquence les différences de réponses immunitaires observées.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats confirme le rôle joué par la supplémentation en prébiotiques sur le développement de

l'immunité intestinale chez le porcelet permettant d'atteindre une maturation bénéfique des défenses intestinales et de la réponse immunitaire après le sevrage.

L'utilisation de prébiotiques en élevage porcin représente donc une stratégie d'intérêt pour favoriser la santé du porcelet et optimiser la fonctionnalité de son système immunitaire pendant des périodes critiques de développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S., 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 553-564.
- Adogony V., Respondek F., Biourge V., Rudeaux F., Delaval J., Bind J.L., Salmon H., 2007. Effects of dietary scFOS on immunoglobulins in colostrums and milk of bitches. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 91, 169-174.
- Cornick S., Tawiah A., Chadee K., 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, 3, e982426.
- Czech A., Grela E.R., Mokrzycka A., Pejsak Z., 2010. Efficacy of mannanoligosaccharides additive to sows diets on colostrum, blood immunoglobulin content and production parameters of piglets. *Pol. J. Vet. Sci.*, 13, 525-531.
- Eloe-Fadros E.A., McArthur M.A., Seekatz A.M., Drabek E.F., Rasko D.A., Sztein M.B., Fraser C.M., 2013. Impact of oral typhoid vaccination on the human gut microbiota and correlations with s. Typhi-specific immunological responses. *PLoS One*, 8, e62026.
- Gourbeyre P., Desbouds N., Gremy G., Le Gall S., Champ M., Denery-Papini S., Bodinier M., 2012. Exposure to a galactooligosaccharides/inulin prebiotic mix at different developmental time points differentially modulates immune responses in mice. *J. Agric. Food. Chem.*, 60, 11942-11951.
- Hampson D.J., Hinton M., Kidder D.E., 1985. Coliform numbers in the stomach and small intestine of healthy pigs following weaning at three weeks of age. *J. Comp. Pathol.*, 95, 353-362.
- 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.
- Hosono A., Ozawa A., Kato R., Ohnishi Y., Nakanishi Y., Kimura T., Nakamura R., 2003. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 67, 758-764.
- Ichinohe T., Pang I.K., Kumamoto Y., Peaper D.R., Ho J.H., Murray T.S., Iwasaki A., 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 5354-5359.
- Janczyk P., Pieper R., Smidt H., Souffrant W.B., 2010. Effect of alginate and inulin on intestinal microbial ecology of weanling pigs reared under different husbandry conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 72, 132-142.
- Kim Y.S., Ho S.B., 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 12, 319-330.
- Konstantinov S.R., Zhu W.Y., Williams B.A., Tamminga S., Vos W.M., Akkermans A.D., 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 225-235.
- Le Bourgot C., Ferret-Bernard S., Le Normand L., Savary G., Menendez-Aparicio E., Blat S., Appert-Bossard E., Respondek F., Le Huerou-Luron I., 2014. Maternal short-chain fructooligosaccharide supplementation influences intestinal immune system maturation in piglets. *PLoS One*, 9, e107508.
- Le Bourgot C., Le Normand L., Formal M., Respondek F., Blat S., Apper E., Ferret-Bernard S., Le Huerou-Luron I., 2017. Maternal short-chain fructo-oligosaccharide supplementation increases intestinal cytokine secretion, goblet cell number, butyrate concentration and Lawsonia intracellularis humoral vaccine response in weaned pigs. *Br. J. Nutr.*, 117, 83-92.
- Le Bourgot C., Ferret-Bernard S., Blat S., Apper E., Le Huërou-Luron I., 2016. Short-chain fructooligosaccharide supplementation during gestation and lactation or after weaning differentially impacts pig growth and IgA response to influenza vaccination. *J. Funct. Foods*, 24, 307-315.
- Nakamura Y., Nosaka S., Suzuki M., Nagafuchi S., Takahashi T., Yajima T., Takenouchi-Ohkubo N., Iwase T., Moro I., 2004. Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 137, 52-58.
- Nogueira M.G., Collins A.M., Donahoo M., Emery D., 2013. Immunological responses to vaccination following experimental Lawsonia intracellularis virulent challenge in pigs. *Vet. Microbiol.*, 164, 131-138.
- Olivares M., Diaz-Ropero M.P., Sierra S., Lara-Villoslada F., Fonolla J., Navas M., Rodriguez J.M., Xaus J., 2007. Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23, 254-260.
- Rizzardini G., Eskesen D., Calder P. C., Capetti A., Jespersen L., Clerici M., 2012. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains Bifidobacterium animalis ssp. lactis, BB-12(R) and Lactobacillus paracasei ssp. paracasei, L. casei 431(R) in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br. J. Nutr.*, 107, 876-884.
- Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyle L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M.J., Leotoing L., Wittrant Y., Delzenne N.M., Cani P.D., Neyrinck A.M., Meheust A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.*, 104 Suppl 2, S1-63.
- Salmon H., Berri M., Gerdt V., Meurens F., 2009. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev. Comp. Immunol.*, 33, 384-393.
- Saulnier D. M., Gibson G. R., Kolida S., 2008. In vitro effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66, 516-527.
- Seekatz A.M., Panda A., Rasko D.A., Toapanta F.R., Eloe-Fadros E.A., Khan A.Q., Liu Z., Shipley S.T., Detolla L.J., Sztein M.B., Fraser C.M., 2013. Differential response of the cynomolgus macaque gut microbiota to Shigella infection. *PLoS One*, 8, e64212.
- Sivieri K., Morales M.L., Saad S.M., Adorno M.A., Sakamoto I.K., Rossi E.A., 2014. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME(R) model). *J. Med. Food*, 17, 894-901.
- Sommer F., Backhed F., 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 227-238.
- Swanson K.S., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bauer L.L., Healy H.P., Dawson K.A., Merchen N.R., Fahey G.C., Jr., 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J. Nutr.*, 132, 980-989.