



Booster l'immunité innée avec des bêta-glucanes pour réduire les lésions pulmonaires chez le cochon

Tadele KIROS (1), Lucie CHABRAND (2), Lucie VERHAEGHE (2), Julie SCHULTHESS (1)

(1) Phileo by Lesaffre, 59520 Marquette-Lez-Lille, France

(2) Lesaffre, 59520 Marquette-Lez-Lille, France

j.schulthess@phileo.lesaffre.com

Boosting innate immunity to sustainably prevent diseases

In recent years, a new concept in immunology has emerged called immune training. It is the ability of beta glucan (BG) molecules found in yeasts or fungi to prepare the innate immune system to "remember" to defend itself better against pathogens. It has been demonstrated by several research teams around the world. This mechanism differs greatly from the traditional immune memory developed by the adaptive system of T and B lymphocytes. In immune training, phagocytes undergo epigenetic reprogramming associated with a metabolic change. To reduce antibiotic use, immune training is an interesting concept that could decrease sensitivity of pigs to environmental pathogens. Our research has demonstrated that the use of BG induced the immune training of CD14+ monocytes isolated from pig PBMCs by promoting the production of the cytokine TNF α . To supplement these results, an in vivo study was conducted on piglets fed or not with a feed containing BG before being infected with the swine flu virus. Its results indicated that piglets fed yeast cell wall rich in BG had significantly fewer lung lesions than the control group which did not receive yeast cell wall. In addition, piglets fed yeast cell walls rich in BG had a higher titer of antibodies against swine flu. Overall, these results indicate that our BG product can train the innate immune system and thus help protect animals against the swine flu virus.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, un nouveau concept en immunologie a émergé. Certains motifs moléculaires comme les bêta-glucanes présents chez des pathogènes ont la capacité de préparer le système immunitaire inné à se « souvenir » pour se défendre plus efficacement lors de la rencontre avec de futurs pathogènes (Netea *et al.*, 2016). Ce mécanisme est très différent de ce qui est classiquement appelé la mémoire immunitaire développée par les lymphocytes T et B du système adaptatif. Pour éviter toute confusion avec la mémoire portée par les lymphocytes T et B, la communauté scientifique a décidé de parler d'entraînement immunitaire (TI) quand il s'agit de la mémoire des cellules de l'immunité innée. Ainsi, il a été montré que les bêta-glucanes sont capables d'induire cette fonction de TI chez les phagocytes. Le mécanisme de TI implique une reprogrammation épigénétique et métabolique des cellules immunitaires innées.

Les bêta-glucanes (BG) sont des polysaccharides naturels composés de monomères D-glucose répétés liés par des liaisons (1,3)-beta-glycosidiques en tant que squelette avec des chaînes latérales liées par des liaisons (1,6)-beta-glycosidiques. Ils sont un composant majeur de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais sont également retrouvés dans les bactéries, les algues et certaines céréales comme l'orge et l'avoine (Williams *et al.*, 2013). Toutes les origines de BG ne sont pas équivalentes dans l'induction de la TI. L'objectif de l'étude

a été de caractériser l'induction de la fonction de TI par un BG issu de levure sur des monocytes porcins et dans un second temps de montrer que ce BG donné par voie orale à des porcs infectés par la grippe porcine était capable de réduire l'apparition des lésions pulmonaires.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Isolement des cellules immunitaires mononuclées du sang périphérique (PBMC) et stimulation

Les cellules immunitaires du sang ont été isolées par ficoll à partir de 60 mL de sang de huit porcs pietrain Belge (4 males, 4 femelles) de 10-12 semaines d'âge. Après récupération des cellules immunitaires, les CD14+ porcins sont isolés avec le kit d'enrichissement des monocytes CD14+ humains (Miltenyi) (pureté >70 %) puis mis en culture à une densité de 1.10^6 cellules/ml en présence de RMPI, SVF (10 %) (Gibco), et de pénicilline et streptomycine (1 %) (Gibco). Les monocytes porcins ont ensuite été stimulés pendant 24 h avec du LPS O55:B5 (100ng/mL) (Sigma) ou par un BG extrait à partir de levure *Saccharomyces cerevisiae* (100 μ g/mL) (pureté >55%) (Safglucan, Phileo By Lesaffre). Après cette première incubation, les surnageants ont été collectés et les puits ont été rincés avec du PBS. Puis du milieu frais est ajouté sur les puits de cultures. Les monocytes sont incubés 5 jours sans stimulation. A la fin de cette période de repos, les monocytes sont challengés avec du LPS (100ng/ml) pendant 24 h. C'est

durant cette deuxième stimulation qu'il est possible d'évaluer la capacité à induire du TI. La concentration en TNF α porcine dans les surnageants est déterminée par Elisa (Duoset RD systems).

1.2. Modèle de challenge des porcs par la grippe

16 porcelets mâles large white séronégatifs pour le virus de la grippe porcine sevrés à l'âge de trois semaines ont été achetés et placés dans l'animalerie de niveau 2 (organisation des vaccins et des maladies infectieuses (VIDO), Université de la Saskatchewan, Canada). Les porcelets ont été répartis au hasard dans l'un des deux groupes de traitement : A) Régime témoin - vacciné, B) 250 g/tonne de BG (Safglucan, Phileo By Lesaffre) - vacciné. Les BG ont été administrés par voie orale aux porcelets pendant environ 14 jours avant le premier vaccin (Jour -14). Puis le vaccin anti-virus de la grippe porcine (MaxiVac excel 5.0 de Merck) a été administré au jour 0 et au jour 14 conformément aux instructions du fabricant. Tous les porcs ont été infectés 14 jours après le deuxième vaccin (jour 28) avec le virus SIV/SK-WT (1×10^7 PFU dans un volume de 4 ml) par voie intra-trachéale. Les porcelets ont été sacrifiés 7 jours après l'infection (jour 35). Des signes cliniques ont été observés et des échantillons de sang ont été prélevés à différents moments avant que les porcelets ne soient sacrifiés pour un examen post-mortem des poumons à la fin de la période d'étude.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La production de TNF α par les monocytes porcins est induite par la stimulation 1 (S1) avec du LPS, ce qui est attendu. En revanche, les monocytes stimulés avec du BG ne produisent pas de TNF α lors de la S1 (Figure 1). Les monocytes sont ensuite stimulés une seconde fois (S2). Les monocytes déjà stimulés par du LPS en S1 sont incapables de répondre et ne produisent plus de TNF α alors que les monocytes qui ont été stimulés précédemment avec du BG sont capables de générer une production de TNF α . Ces résultats indiquent la capacité du BG isolé de la levure à induire de l'entraînement immunitaire. Cette fonction peut être très intéressante en condition d'élevage pour réduire le risque d'infection et ainsi l'utilisation d'antibiotiques.

Pour vérifier l'intérêt de l'utilisation de BG, deux groupes d'animaux ont été nourris ou non avec du BG et vaccinés contre la grippe. Ils ont ensuite été infectés avec le virus de la grippe porcine. La température corporelle des porcs du groupe supplémenté est inférieure de près d'un degré à la température corporelle du groupe non supplémenté pendant les 1^{ères} 24 heures suivant le challenge (40.8C pour le groupe control et 39.9C pour le groupe BG). L'analyse des sera des deux groupes montrent que le groupe traité avec du BG a développé un titre d'anticorps contre le virus de la grippe plus fort (Figure 2A). De plus, au cours de l'autopsie, les scores de lésions pulmonaires chez les porcs supplémentés avec 250 g/tonne de BG sont significativement inférieurs au groupe témoin (Figure 2B). Ces résultats démontrent que l'utilisation de BG permet de

promouvoir l'entraînement des phagocytes et ainsi une meilleure protection des animaux lors d'un challenge pathogénique.

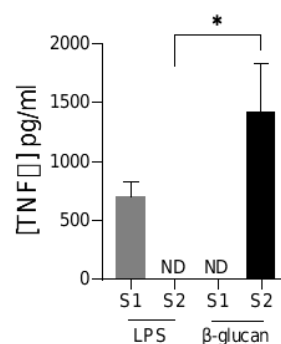


Figure 1 – Induction de l'entraînement immunitaire par un BG de levure sur des monocytes purifiés de cochon. S1 : la stimulation 1 est réalisée soit avec du LPS (1^{er} histogramme), soit avec du BG (3^{ème} histogramme), S2 : la stimulation 2 permet d'évaluer l'induction de l'entraînement immunitaire. Lors de la S2, les cellules sont stimulées uniquement avec du LPS. N = 8. * p value < 0,05.

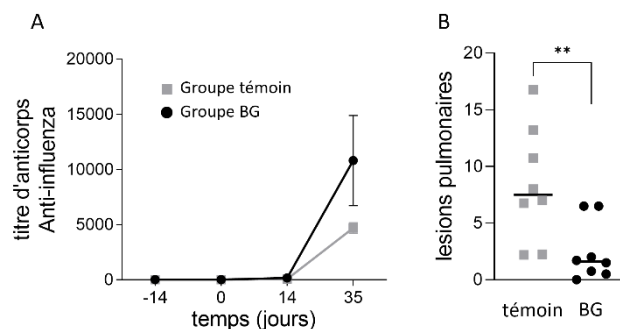


Figure 2 – Réponse vaccinale (A) et lésions pulmonaires (B) chez les porcs traités ou non avec du BG. A : quantification du titre d'anticorps contre le virus de la grippe porcine au cours du temps dans les deux groupes d'animaux (carré : témoin ; rond : groupe traité avec 250g/tonne de BG). A droite : l'évaluation des lésions pulmonaires dans les deux groupes. ** p value < 0,005, n = 8/groupe

CONCLUSION

En résumé, le polymère ramifié, (1,3/1,6)-bêta-glucanes, extrait de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable de stimuler l'immunité locale et systémique grâce à l'initiation de l'entraînement immunitaire et ainsi permet d'améliorer la protection contre la grippe chez les porcs comme le montre la diminution significative des scores de lésions pulmonaires des porcs vaccinés supplémentés avec 250 g/tonne d'aliments. La capacité des BG à promouvoir le TI offre une alternative intéressante à l'utilisation d'agent anti-microbiens en conditions d'élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Netea M., Joosten L., Latz E., Mills K., Natoli G., Stunnenberg H., O'Neill L., Xavier RJ., 2016. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, 6284 s
- Williams DL., Lowman DW., Reale M., Ensley HE., 2013. Insights into the physicochemical characterization, chemistry, structure and synthesis of (1-3,1-6)- β -glucans. *Chemistry and Biology of (1-3)- β -glucans*, p. 29–82.