

ACTIVATION DES LEUCOCYTES HÉTÉROPHILES ET DES MONOCYTES CHEZ LE POULET DE CHAIR PAR UN EXTRAIT D'ALGUE ET SA FORMULATION COMMERCIALE

Bussy Frédérick¹, Guriec Nathalie², Mathiaud Olivier³, Le Goff Matthieu¹, Delarue
Jacque², Nyvall Collen Pi¹

¹OLMIX - ZA du Haut du Bois - 56580 BREHAN,

²Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé – 22 avenue Camille Desmoulins – 29100
BREST,

³R&D BREIZH – 56500 MOUSTOIR AC
fbussy@olmix.com

RÉSUMÉ

Chez les volailles, deux types cellulaires majeurs sont impliqués dans l'immunité innée : les leucocytes hétérophiles et les monocytes. Les monocytes peuvent se différencier en cellules dendritiques et en macrophages, jouant un rôle important dans le développement des réponses innée et adaptative via leurs fonctions respectives de présentation des antigènes et de phagocytose. L'objectif du projet était d'étudier l'effet de deux produits (un extrait issu d'*Ulva armoricana* récemment renommée *Ulva laetevirens* (appelé produit algal), et l'association du même extrait avec d'autres composés comme des vitamines (appelé produit formulé)), sur des leucocytes hétérophiles et les monocytes. Les produits ont été administrés via l'eau de boisson pendant vingt-quatre heures. Les cellules immunitaires ont été isolées à partir de prélèvements sang réalisés quotidiennement entre J0 et J3. L'activation des hétérophiles a été mise en évidence par notamment la libération de glucuronidase et, celle des monocytes par la libération d'oxyde nitrique. L'activation des deux types cellulaires a été mise en évidence dès 24 heures après l'application des produits testés. La transcription des gènes de différents médiateurs a été démontrée pour l'interleukine 1 β (IL1 β), l'interféron α (IFN α) et l'interféron γ (IFN γ), de façon dose et temps dépendant pour le produit algal et de façon temps dépendant pour le produit formulé. Les évolutions les plus significatives, pour les deux extraits ont concerné : l'IFN α , l'IFN γ , l'IL1 β et l'OAS pour les hétérophiles et l'IFN γ , l'IL1 β et l'OAS pour les monocytes. Ces résultats suggèrent que l'association de l'extrait d'algue étudié avec d'autres composés pourrait renforcer le système immunitaire et aider à la gestion des challenges immunitaires.

ABSTRACT

Activation of heterophils and monocytes from broilers by a seaweed extract and its commercial formulation

In the poultry species, two different cells are involved in innate immunity: heterophils and monocytes. The last ones can differentiate into dendritic cells and macrophages and thus playing an important role in the development of innate and adaptative responses, due to their roles in antigen presentation and phagocytosis. The objective of the study was to evaluate the effect of two products (an extract from *Ulva armoricana*, recently renamed *Ulva laetevirens* (named algal product) and its formulated version including other compounds such as vitamins (named formulated product)), on avian monocytes and heterophils.

Activation was demonstrated, in heterophils, via glucuronidase release and, in monocytes, by nitric oxide release. Activation of both cell types was observed as soon as one day after product application. Gene transcription of different immune mediators was demonstrated for interleukin 1 β (IL1 β), interferon α (IFN α) and interferon γ (IFN γ) and was dose and time dependent for the purified extract and time dependent for the commercial version. The most significant evolution was observed for both extracts on IFN α , IFN γ , IL1 β and OAS in heterophils and IFN γ , IL1 β and OAS in monocytes. These results suggest that the seaweed extract, as well as its association with other compounds, can reinforce the immune system and help to manage immune challenges.

INTRODUCTION

Le système immunitaire inné assure une première ligne de défense et permet de recruter des cellules immunitaires, diriger la réponse immunitaire adaptative. Comme pour les mammifères, les réponses Th1/ Th2 s'appliquent chez la volaille (Lowenthal et al, 2013). La réponse Th1 implique l'immunité cellulaire avec notamment les lymphocytes cytotoxiques, en réponse aux pathogènes intracellulaires et aux virus et nécessitant l'interféron gamma (IFN γ) (Lowenthal et al, 2013). Les cytokines libérées pour la réponse Th2 sont plus spécifiquement les interleukines 10 et 13 (IL10, IL13), en réponse aux pathogènes extracellulaires, incluant les bactéries et les virus (Lowenthal et al, 2013).

Les macro-algues rouges, vertes et brunes sont des sources importantes de composés bioactifs, parmi eux, les polysaccharides sulfatés comme les ulvans issus des macro-algues vertes possédant des activités biologiques (Xu et al, 2017).

Il a été récemment démontré qu'un extrait d'*U. laetevirens* pouvait activer les hétérophiles et les monocytes aviaires via les récepteurs TLR2 et TLR4 (Guriec et al, 2018). L'objectif de cette étude est de déterminer si cette activation est conservée quand l'extrait d'*U. laetevirens* est associé à des vitamines A et D3.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expérimentation *in vivo*

Cent vingt-cinq poulets de vingt-huit jours d'âge de génétique ROSS ont été répartis dans cinq groupes. Un groupe contrôle, trois groupes ont reçu un extrait d'*Ulva* sp par eau de boisson à différents dosages (dix, vingt-cinq et cinquante mg/l d'eau de boisson), un groupe a reçu un produit commercial (Searup®) à la dose d'un ml/l d'eau de boisson au cours de trois répétitions (vingt-quatre à vingt-six poulets/groupe/répétition). L'administration des deux produits a été incorporé dans l'eau de boisson pendant vingt-quatre heures consécutives.

Le projet a reçu l'avis favorable du comité d'éthique de Brest.

1.2. Isolement des cellules

Un ml de sang a été prélevé à J0 (avant distribution des produits), J1 (à la fin des administrations des produits), J2 (24 heures après la fin de l'administration des produits) et J3 (48 heures après la fin de l'administration des produits) pour chaque animal. L'isolation des cellules a été réalisée après avoir poolés les prélèvements sanguins de 3 animaux d'un même groupe.

Les leucocytes hétérophiles et les monocytes ont été isolés à partir des prélèvements sanguins puis purifiés afin de tester leurs activations puis congelés jusqu'au dosage de l'expression des cytokines par RT-qPCR selon la méthodologie décrite préalablement (Farnell et al 2013 ; Guriec et al 2018).

La dégranulation des hétérophiles a été estimée sur les cellules fraîches via l'activité de la β -D-glucuronidase par mesure de la fluorescence générée par le clivage de la 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide en 4-méthylumbellifère.

La concentration en oxyde nitrique (NO) a été déterminée en triplicats avec le réactif de Griess sur les cellules fraîches.

1.3. Analyses statistiques

Les comparaisons ont été effectuées par un test d'ANOVA et une correction de Bonferroni avec le logiciel PRISM. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne $\pm$ écart type de la moyenne. P values < 0.05 ont été considérées comme significatives.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'extrait d'*U. laetevirens* et le produit formulé ont induit une sécrétion d'oxyde nitrique qui augmente avec le temps (Figure 1). Chez les volailles, la synthèse d'oxyde nitrique reflète, principalement, l'activation des monocytes. La cinétique de l'oxyde nitrique observée, correspond à celle des expressions des gènes iNOS et IFN γ , avec un pic à J1 puis une diminution à J2 et un retour au niveau basal à J3 (Figure 2). Lors d'études précédentes, il a été démontré que l'augmentation de la transcription de ces gènes était associée à une augmentation de la concentration d'IFN γ dans le plasma (Guriec et al, 2018 et 2019). L'IFN γ aviaire a pour fonctions principales de réguler la production d'oxyde nitrique (Goossens et al, 2013), et d'agir notamment sur les virus de Gumboro et Newcastle (Mallick et al, 2011 et Lambrecht et al, 1999).

Contrairement aux mammifères, les hétérophiles aviaires ne peuvent pas synthétiser d'oxyde nitrique à cause de l'absence de myéloperoxydase (Genovese et al, 2013). Cependant, leur activation peut être mise en évidence par la libération de β -D glucuronidase (St. Paul et al, 2011). Après 24 heures d'administration du produit formulé, une augmentation de la β -D glucuronidase est observée avec une activité maximale à J1 (Figure 3). La β -D-glucuronidase contribue à la protection contre les virus et les bactéries (Genovese et al, 2013, Van Dijk et al, 2008 et 2009). Comme pour la β -D-glucuronidase, l'OAS joue également un rôle dans la protection contre les virus via le clivage des transcrits d'ARN viraux et des ARN des cellules hôtes (Goossens et al, 2013). Le gène de l'OAS est induit par l'extrait d'*Ulva* et le produit formulé, selon la même cinétique dans les hétérophiles et les monocytes, avec une transcription maximale à J2 (Figures 2 et 4). Les

transcriptions sont maximales entre J1 et J2 pour la majorité des gènes étudiés avec une diminution à J3 excepté pour TLR2 et TLR4 dans les monocytes pour lesquels une légère augmentation est observée à J3. Ces récepteurs semblent également être plus exprimés dans les hétérophiles que les monocytes (Figures 2 et 4). L'activation des hétérophiles entraîne une transcription d'IFN α , comme dans le cas d'une réponse virale, par exemple lors d'une infection par le virus de la grippe aviaire ou le virus de la maladie de Newcastle (Goossens et al 2013).

CONCLUSION

En conclusion, une distribution orale via l'eau de boisson, pendant vingt-quatre heures du produit formulé, à la dose de 1ml/l, active des hétérophiles et les monocytes permettant de stimuler les réponses immunitaires. De plus, les gènes des cytokines exprimées suggèrent que l'extrait d'*U. laetevirens* ainsi que le produit pourraient renforcer le système immunitaire acquis.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Farnell MB, Crippen TL, He H, Swaggerty CL, Kogut MH (2003) Dev Comp Immunol 27(5): 423-429.
 Genovese KJ, (2013) Dev Comp Immunol 41(3): 334-340.
 Goossens K, (2013) Dev Comp Immunol 41(3): 370-376.
 Guriec N, (2018). Front Immunol 9: 2725-2744.
 Guriec N, (2021). J Vet Sci Res 6(1).
 Lambrecht B, (1999) Vet Immunol Immunopathol 70(3-4): 257-267.
 Lowenthal JW., 2013. Dev. Comp. Immunol., (3), 307-309.
 Mallick AI, (2011) J Interf Cyt Res 31(6): 493-500.
 St. Paul M, (2011) Vet Immunol Immunopath 144(3-4): 228-237.
 Van Dijk A, (2008) Vet Immunol Immunopathol 124(1-2): 1-18.
 Van Dijk A, (2009) Mol Immunol 46(7): 1517-1526.
 Xu SY, Huang X, Cheong KL (2017) Mar Drugs 15(12): 388-404.

Figure 1. Evolution de la concentration d'oxide nitrique dans les monocytes issus de poulet recevant, via l'eau de boisson, pendant 24 heures, un extrait d'*Ulva* sp ou un complexe extrait d'*Ulva*- vitamines (nommé produit formulé dans le graphique).

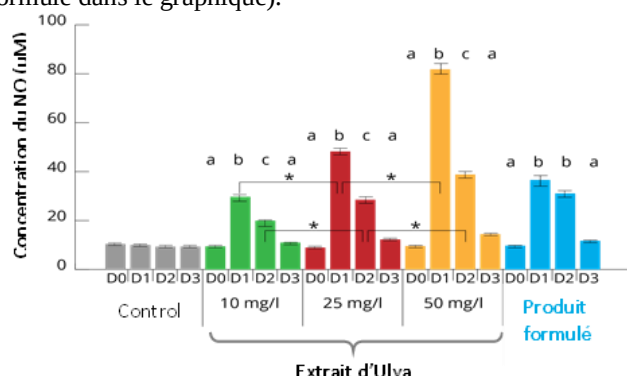


Figure 2. Evolution de l'expression des cytokines en réponse à l'activation des monocytes par un complexe extrait d'*Ulva*- vitamines, administré via l'eau de boisson, pendant 24 heures.

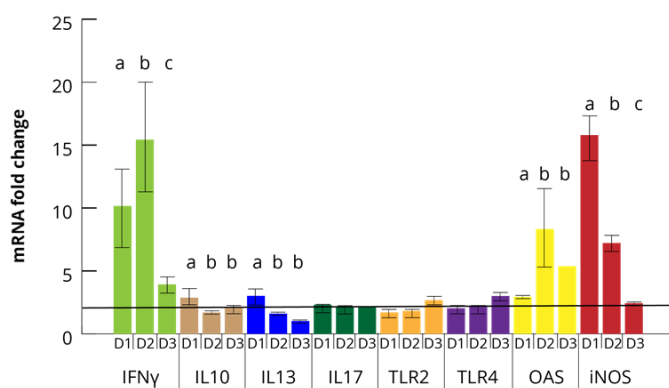


Figure 3. Evolution de la concentration de glucuronidase dans les leucocytes hétérophiles issus de poulet recevant, via l'eau de boisson, pendant 24 heures, un extrait d'Ulva sp ou un complexe extrait d'Ulva- vitamines (nommé produit formulé dans le graphique).

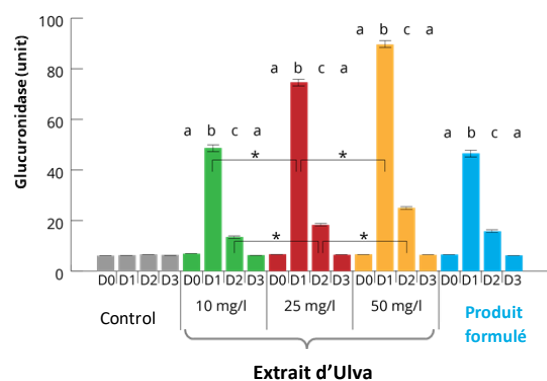


Figure 4. Evolution de l'expression des cytokines en réponse à l'activation des hétérophiles par un complexe extrait d'Ulva- vitamines.

