

ACTIVITES ANTICOCIDIENNES D'EXTRAITS PROTEIQUES ET LIPIDIQUES DE LA MOUCHE SOLDAT NOIR (*HERMETIA ILLUCENS*)

Laura Sedano¹, Maryline Vian², Côme Guidou³, Françoise I. Bussi re¹, Christophe
Trespuech³, Anne Silvestre¹

¹ INRAE, Université de Tours, UMR ISP - 37550 Nouzilly

² INRAE, Université Avignon, UMR SQPOV - 84000 Avignon, France

³ MUTATEC - 84300 Châteaux-en-Vallée, France

Anne.Silvestre@inrae.fr

RÉSUMÉ

Pour améliorer l'autonomie protéique et le bien-être animal, la production d'insectes pour l'alimentation animale est un levier récent et innovant. Les larves de la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*) sont faciles à élever et valorisent des coproduits et des déchets alimentaires. Outre une teneur élevée en nutriments, les larves contiennent des composés bioactifs (chitine, acide laurique, peptides antimicrobiens) valorisables pour la santé animale. La coccidiose aviaire, caus e par *Eimeria*, est la principale maladie parasitaire en fil re avicole. Et son impact économique a récemment été réévalué à plus de 13 milliards de dollars par an dans le monde. La prophylaxie repose i) sur la vaccination (onéreuse, elle est réservée à la fil re œuf et aux productions longues de la fil re viande) et ii) sur l'usage de molécules coccidiostatiques. L'efficacité des coccidiostatiques est menacée par le développement de résistance. Face à la pression sociétale pour réduire les intrants en élevage, les extraits de larves *H. illucens* pourraient constituer un complément aux coccidiostatiques. Les activités anticoccidiennes d'extraits protéiques et lipidiques ont été évaluées. Deux réplicas biologiques ont été produits, à 20 et 35 g équivalent de matière sèche/L. La dose maximale non cytotoxique a été évaluée en cellule aviaire CLEC213. Les parasites ont été incubés 1h en présence des extraits, puis mis en contact avec les cellules pendant 2h ou 72h pour évaluer l'effet sur l'inhibition de l'invasion ou l'inhibition du développement, respectivement. Les mesures issues de 3 expériences indépendantes ont été réalisées en triplicats, et les valeurs (moyenne à SEM) ont été analysées par un test One-Way ANOVA. Les extraits lipidiques inhibent le développement d'*Eimeria*   0,6 mg équivalent de matière sèche/L, et les extraits protéiques entre 1 et 10 mg équivalent de matière sèche/L. Des recherches complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats *in vivo*, évaluer de potentiels effets antinutritionnels et fractionner les extraits afin d'optimiser les activités anticoccidiennes observ es.

ABSTRACT

Anticoccidial activity of protein and lipid extracts from the black soldier fly (*Hermetia Illucens*)

To improve protein autonomy and animal welfare, the production of insects for animal feed is a recent and innovative lever. The larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) are easy to rear, and can be used to enhance the value of by-products and food waste. In addition to their high nutrient content, *H. illucens* larvae contain bioactive compounds (chitin, lauric acid, antimicrobial peptides) that are valuable for animal health. Avian coccidiosis, caused by *Eimeria*, is the main parasitic disease in the poultry industry. The economic impact of the disease has recently been re-evaluated at over 13 billion dollars a year worldwide. Prophylaxis relies on i) vaccination (expensive, and reserved for the egg and meat industries) and ii) the use of coccidiostatic molecules. The effectiveness of coccidiostatic molecules is threatened by the development of resistance. Faced with societal pressure to reduce inputs to livestock farming, *H. illucens* larvae extracts could provide a relevant alternative to anticoccidial molecules. Anticoccidial activities of protein extracts and lipid extracts of *H. illucens* larvae were evaluated. Two biological replicates were produced, at 20 and 35 g dry matter equivalent/L. The maximum non-cytotoxic dose of each extract was assessed in CLEC213 avian cells, then the parasites were incubated for 1 h in the presence of the extracts, then placed in contact with avian cells for 2 h or 72 h to assess the effect on inhibition of cell invasion or inhibition of parasite development, respectively. Measurements from 3 independent experiments were performed in triplicates, and values (mean   SEM) were analysed by a One-Way ANOVA test. Lipid extracts inhibit *Eimeria* growth at 0.6 mg dry matter equivalent/L, and protein extracts between 1 and 10 mg dry matter equivalent/L. Further research is required to confirm these results *in vivo*, assess potential anti-nutritional effects and fractionate the extracts to optimize the observed anticoccidial activities.

INTRODUCTION

Les insectes sont une composante naturelle du régime alimentaire des oiseaux, mais leur utilisation dans l'alimentation des volailles est réglementée dans l'UE. L'utilisation d'insectes vivants, d'extraits lipidiques et, plus récemment, de protéines animales transformées dérivées d'insectes (PAPs d'insectes) sont désormais autorisées dans l'alimentation des volailles (Règlement de la Commission EU 2021/1372). La production d'insectes pour l'alimentation animale connaît un fort développement afin d'améliorer l'autonomie en protéines et le bien-être des animaux, par le biais de l'enrichissement du milieu (Ipema et al. 2020). Les larves de la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*) (black soldier fly, BSF) sont faciles à élever et peuvent valoriser des coproduits et des déchets alimentaires. Outre une teneur élevée en nutriments, les larves de BSF contiennent des composés (chitine, acide laurique, peptides antimicrobiens PAMs) intéressants pour le microbiote intestinal et la santé animale (Ravi et al. 2020). Dans le cahier des charges des Labels, des Indications Géographiques Protégées (IGP) et de l'agriculture biologique, les volailles doivent avoir accès à l'extérieur, dans des parcs leur permettant d'exprimer pleinement leur comportement naturel (course, grattage etc.). Mais la biosécurité étant moins bien assurée en extérieur, leur santé peut se voir menacée par un plus grand risque de contamination par des agents pathogènes dont des parasites. En outre, ils sont plus facilement menacés par des animaux sauvages et les agents pathogènes qu'ils peuvent aussi porter. Avec la contrainte de limiter les traitements antibiotiques et antiparasitaires, il devient plus difficile de contrôler certaines maladies. Le but de notre étude est d'évaluer les activités anticoccidiennes de plusieurs extraits de BSF.

Les coccidioses aviaires sont des maladies cosmopolites et elles représentent une menace économique considérable pour la filière avicole (Blake et al. 2020). Ces maladies sont causées par différentes espèces d'*Eimeria*, un parasite intracellulaire ubiquitaire obligatoire, qui infeste le tube digestif des animaux. Le cycle de vie d'*Eimeria* sp. se déroule chez un seul hôte et comprend des phases asexuées et sexuées, qui produisent de grandes quantités d'oocystes, excrétés par l'animal infesté dans l'environnement. Les premières étapes asexuées peuvent être reproduites *in vitro*. Nous avons développé des souches recombinantes d'*Eimeria tenella* (responsable de la coccidiose caecale chez le poulet) qui expriment la luciférase sous le contrôle de promoteurs spécifiques, afin de quantifier l'invasion ou le développement intracellulaire. Nous avons effectué un test cytotoxique pour déterminer la concentration non cytotoxique la plus élevée pour chaque extrait, puis nous avons évalué les activités

inhibitrices de l'invasion et du développement d'*E. tenella*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Souche de parasite et lignée cellulaire

Les coccidies ont été multipliées *in vivo* chez des poulets de souche PA12 (âgés de 4 à 6 semaines), infectés par voie orale avec 10^4 oocystes sporulés, comme décrit précédemment par Bussière et al., en 2015. Nous avons utilisé une souche modifiée, « Et-INRAE » (Ribeiro E Silva et al. 2021), exprimant le gène rapporteur de la nano-luciférase sous le contrôle du promoteur de l'actine d'*E. tenella*, selon le protocole décrit par Clark et al., en 2008. La souche parentale, « Et-INRAE », et la souche modifiée n'ont pas de résistance connue aux coccidiostatiques. Les oocystes non sporulés ont été prélevés dans les cæcums et purifiés comme décrit par Shirley en 1995. Les oocystes sporulés ont été obtenus après une incubation au bain-marie sous agitation mécanique à 27°C pendant 72h dans une solution de bichromate de potassium à 2,5% (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Les sporozoïtes ont été obtenus à partir d'oocystes sporulés : les parois des oocystes ont été brisées pendant 30 s avec des billes de verre de 0,5 mm et les sporocystes ont été incubés dans une solution de trypsine à 0,25 % provenant du pancréas de porc (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), 0,5 % de sels biliaires de porc (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) dans du PBS, pH 7,4 à 41°C pendant 1 heure. Enfin, les sporozoïtes ont été purifiés par une filtration sur coton suivie d'une filtration sur filtre en polycarbonate (5 µm ; Whatman).

En absence de lignée de cellules épithéliales digestives aviaires, nous avons utilisé des cellules épithéliales de poumon de poulet CLEC213 (Esnault et al. 2011). Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM-F12 (Gibco), contenant 10% de sérum bovin fœtal (Dutscher) et 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (Cytiva) à 41°C, 5% CO₂. Pour tous les essais anticoccidiens *in vitro*, les cellules ont été récoltées avec 0,05% de trypsine-EDTA (Gibco) et $1,5 \times 10^4$ cellules ont été ensemencées en plaque de 96 puits.

1.2. Production des extraits de larves BSF

Nous avons comparé des extraits protéiques solubilisés dans l'eau et des extraits lipidiques solubilisés dans le méthanol (Figure 1), à partir de larves BSF qui ont été :

- soit blanchies et lyophilisées (Extraits 1 et 2),
- soit séchées et pressées (Extraits 3 et 4).

Deux lots d'extraits ont été produits : le premier lot a été utilisé tel quel et le second a été stérilisé par filtration. La concentration équivalente en matière

sèche était de 20 g/L et de 35 g/L dans le lot 1 et 2, respectivement.

1.3. Test de cytotoxicité

Après 24h de culture, les cellules ont été incubées avec les extraits à différentes concentrations pendant 2h (pour l'invasion) ou 72h (pour le développement) à 41°C, 5% CO₂. Puis le milieu a été éliminé et remplacé par du milieu frais. Pour quantifier la cytotoxicité des extraits, du MTS a été ajouté (CellTiter 96® Assay ; Promega) et les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4h. L'absorbance du formazan produit par les cellules viables a été lue à 492nm sur un lecteur de microplaques (Thermo Multiskan ascent). La viabilité cellulaire relative a été calculée en pourcentage des cellules non traitées. Les données ont été analysées conformément à la norme ISO-10993-5 et une viabilité cellulaire de plus de 80% a été retenue comme valeur seuil de non-cytotoxicité.

1.4. Test d'inhibition de l'invasion et du développement parasitaire

La plus forte dose non cytotoxique de chaque extrait a été utilisée pour tester l'effet sur l'invasion cellulaire et sur le développement intracellulaire des sporozoïtes. 1,5x10⁴ sporozoïtes (MOI 1) ont été incubés avec chaque extrait pendant 1h à température ambiante. Certains parasites ont été incubés pendant 1h à température ambiante sans extrait pour le contrôle non traité (contrôle positif C+, établi à 100% d'invasion ou de développement) et un contrôle négatif a été préparé avec des parasites incubés pendant 1h à 60°C sans extrait, pour le contrôle des sporozoïtes tués par la chaleur. Le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été infectées avec les suspensions de sporozoïtes précédentes pendant 2h ou 72h à 41°C. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS à l'aide d'un laveur de microplaques (Hydroflex ; Tecan) pour éliminer les parasites extracellulaires. Pour quantifier l'invasion et le développement des sporozoïtes, 20µL d'un mélange de substrat Nano-Glo® Luciferase Assay et de tampon Nano-Glo® Luciferase Assay ont été ajoutés aux puits, en suivant les instructions du fabricant (Promega) et la luminescence a été mesurée dans un appareil Glo-Max®-Multi Detection System (Promega). L'effet des extraits sur l'inhibition de l'invasion des cellules CLEC213 et le développement intracellulaire des parasites a été établi en pourcentage du contrôle des sporozoïtes non traités.

1.5. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM et analysés par un test One-Way ANOVA à l'aide de GraphPad Prism v8.4.3. Les niveaux de signification statistique ont été considérés comme suit : valeur p

<0,05 (*), valeur p <0,01 (**), valeur p <0,001 (***) et valeur p <0,0001 (****).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans les conditions de l'invasion (2h d'incubation), seul l'extrait 1 a montré une cytotoxicité à la dose maximale testée (6,3 g/L équivalent de matière sèche). Dans les conditions du développement (72h d'incubation), les extraits 1 et 4 ont montré une cytotoxicité à partir de 0,63 g/L équivalent de matière sèche. Il s'agit des extraits lipidiques solubilisés en méthanol, dont la toxicité vis-à-vis des cellules est connue (Tanneberger et al. 2010).

Bien qu'une inhibition modérée de l'invasion (Figure 2) ait été observée avec le premier lot des 4 extraits natifs, l'effet n'a plus été observé après la stérilisation des extraits (lot 2). On peut supposer que la stérilisation par filtration a éliminé ou réduit la quantité de composés actifs.

En ce qui concerne l'inhibition du développement intracellulaire d'*Eimeria* (Figure 3), il y a là aussi de la variabilité entre les lots. Mais les effets étaient généralement conservés. Les extraits protéiques solubilisés dans l'eau inhibent le développement d'*Eimeria* à des concentrations comprises entre 1 et 10 mg/L équivalent de matière sèche. Les extraits lipidiques, solubilisés en méthanol, sont plus efficaces (activité observée à 0.6 mg/L équivalent de matière sèche).

Aucun effet dose-dépendant n'a pu être observé, empêchant l'estimation d'une concentration inhibitrice de 50%. Mais les extraits lipidiques ont été efficaces à des concentrations 10 fois plus faibles que les extraits protéiques, en moyenne.

Ces résultats acquis *in vitro* permettent d'objectiver les effets des extraits (protéiques versus lipidiques) sur les différentes étapes du cycle parasitaire.

La filtration des extraits (lot 1 versus lot 2) indique que des composés actifs présents dans les extraits sont impliqués dans l'activité anticoccidienne. Après filtration, la pré-incubation des parasites n'altère plus l'invasion des cellules, ce qui semble suggérer que certains composés actifs ont une activité antiparasitaire directe sur les sporozoïtes. D'autres composés, toujours présents après la filtration permettent de limiter le développement parasitaire. Divers candidats pourraient être étudiés plus en détail, en combinant le fractionnement des extraits, leur caractérisation (Ravi et al. 2020) et l'évaluation de l'activité anticoccidienne *in vitro*. L'effet des défensines (Park et al. 2015, Guyot et al. 2020), de la chitine (Osho and Adeola 2019) ainsi que de l'acide laurique (Fortuoso et al. 2019, Yang et al. 2019) ont été démontrés.

Dans une perspective à plus long terme, la sélection des matrices sur lesquelles les larves BSF sont nourries permettrait d'orienter la composition en PAMs et en composés actifs d'intérêt (Vogel et al.

2018). Des études complémentaires sont encore nécessaires pour valider ces résultats encourageants, il conviendra notamment de s'assurer que les activités anticoccidiennes observées n'altèrent pas les paramètres zootechniques, certains composés actifs pouvant présenter des propriétés anti nutritionnelles à forte dose (Gasco et al. 2021).

Ces travaux ont été financés par l'institut Carnot France Futur Elevage (projet PINHS coordonné par B. Méda, INRAE, UMR BOA).

CONCLUSION

En conclusion, bien que les extraits protéiques natifs aient montré une activité anticoccidienne modérée, seuls les extraits lipidiques ont montré une activité statistiquement fiable, dans nos conditions. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les composés responsables des effets observés et pour confirmer ces résultats dans des conditions se rapprochant de l'*in vivo*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blake D. P., Knox J., Dehaeck B., Huntington B., Rathinam T., Ravipati V., et al. (2020). Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet. Res.* 51(1). doi: 10.1186/s13567-020-00837-2.
- Bussiere F. I., Brossier F., Le Vern Y., Niepceon A., Silvestre A., de Sablet T., et al. (2015). Reduced Parasite Motility and Micronemal Protein Secretion by a p38 MAPK Inhibitor Leads to a Severe Impairment of Cell Invasion by *Eimeria tenella*. *Plos One* 10(2), e0116509. doi: 10.1371/journal.pone.0116509.
- Clark J. D., Billington K., Bumstead J. M., Oakes R. D., Soon P. E., Sopp P., et al. (2008). A toolbox facilitating stable transfection of *Eimeria* species. *Mol. Biochem. Parasit.* 162(1), 77-86. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.07.006.
- Esnault E., Bonsergent C., Larcher T., Bed'hom B., Vautherot J. F., Delaleu B., et al. (2011). A novel chicken lung epithelial cell line: Characterization and response to low pathogenicity avian influenza virus. *Virus Res.* 159(1), 32-42. doi: 10.1016/j.virusres.2011.04.022.
- Fortuoso B. F., dos Reis J. H., Gebert R. R., Barreta M., Griss L. G., Casagrande R. A., et al. (2019). Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microb. Pathogenesis* 129, 161-167. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.005.
- Gasco L., Jozefiak A. and Henry M. (2021). Beyond the protein concept: health aspects of using edible insects on animals. *J. Insects Food Feed* 7(5), 715-741. doi: 10.3920/jiff2020.0077.
- Guyot N., Meudal H., Trapp S., Iochmann S., Silvestre A., Jousset G., et al. (2020). Structure, function, and evolution of Gga-AvBD11, the archetype of the structural avian-double-beta-defensin family. *PNAS* 117(1), 337-345. doi: 10.1073/pnas.1912941117.
- Ipema A. F., Bokkers E. A. M., Gerrits W. J. J., Kemp B. and Bolhuis J. E. (2020). Long-term access to live black soldier fly larvae *Hermetia illucens* stimulates activity and reduces fearfulness of broilers, without affecting health. *Scientific Reports* 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-74514-x.
- Osho S. O. and Adeola O. (2019). Impact of dietary chitosan oligosaccharide and its effects on coccidia challenge in broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 60(6), 766-776. doi: 10.1080/00071668.2019.1662887.
- Park S.-I., Kim J.-W. and Yoe S. M. (2015). Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly *Hermetia illucens* larvae. *Dev. Comp. Immunol.* 52(1), 98-106. doi: 10.1016/j.dci.2015.04.018.
- Ravi H. K., Degrou A., Costil J., Trespeuch C., Chemat F. and Vian M. A. (2020). Effect of devitalization techniques on the lipid, protein, antioxidant, and chitin fractions of black soldier fly *Hermetia illucens* larvae. *Eur. Food Res. Technol.* 246(12), 2549-2568. doi: 10.1007/s00217-020-03596-8.
- Ribeiro E Silva A., Sausset A., Bussiere F. I., Laurent F., Lacroix-Lamande S. and Silvestre A. (2021). Genome-Wide Expression Patterns of Rho GTPases during the *Eimeria tenella* Life-Cycle. *Microorganisms* 9(8), 1621. doi: 10.3390/microorganisms9081621.
- Shirley M. W. (1995). *Eimeria* Species and Strains of Chicken. European Commission: Luxembourg. Eckert J., Braun, R., Shirley, M.W. and Coudert, P.: 1-24.
- Tanneberger K., Rico-Rico A., Kramer N. I., Busser F. J. M., Hermens J. L. M. and Schirmer K. (2010). Effects of Solvents and Dosing Procedure on Chemical Toxicity in Cell-Based *in vitro* Assays. *Environ. Sci. Technol.* 44(12), 4775-4781. doi: 10.1021/es100045y.
- Vogel H., Mueller A., Heckel D. G., Gutzeit H. and Vilcinskas A. (2018). Nutritional immunology: Diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly, *Hermetia illucens*. *Dev. Comp. Immunol.* 78, 141-148. doi: 10.1016/j.dci.2017.09.008.
- Yang W.-Y., Lee Y., Lu H., Chou C.-H. and Wang C. (2019). Analysis of gut microbiota and the effect of lauric acid against necrotic enteritis in *Clostridium perfringens* and *Eimeria* side-by-side challenge model. *Plos One* 14(5). doi: 10.1371/journal.pone.0205784.

Figure 1. Mode d'obtention des extraits lipidique et protéique à partir de larves vivantes d'*Hermetia illucens*.

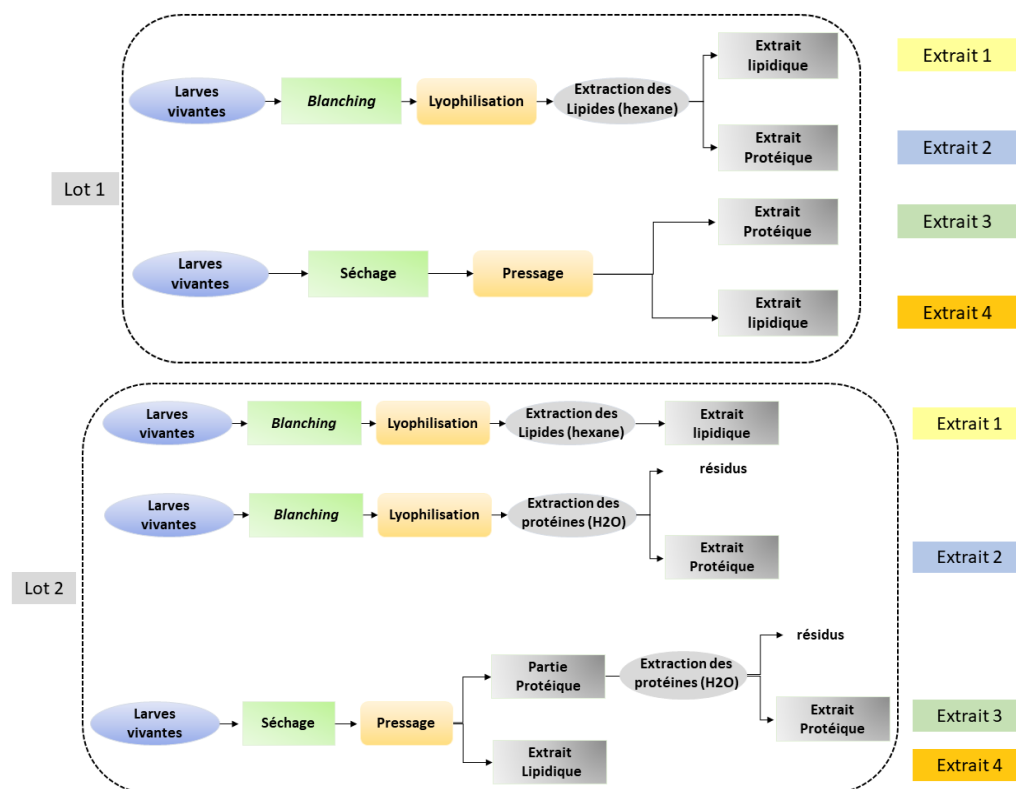


Figure 2. Effet des extraits sur l'invasion des cellules CLEC213 par les sporozoïtes d'*E. tenella*. Les codes couleurs des extraits sont identiques à ceux de la Figure 1. Le contrôle positif C+ correspond aux parasites incubés sans extrait, le contrôle négatif C- correspond aux parasites inactivés par la chaleur.

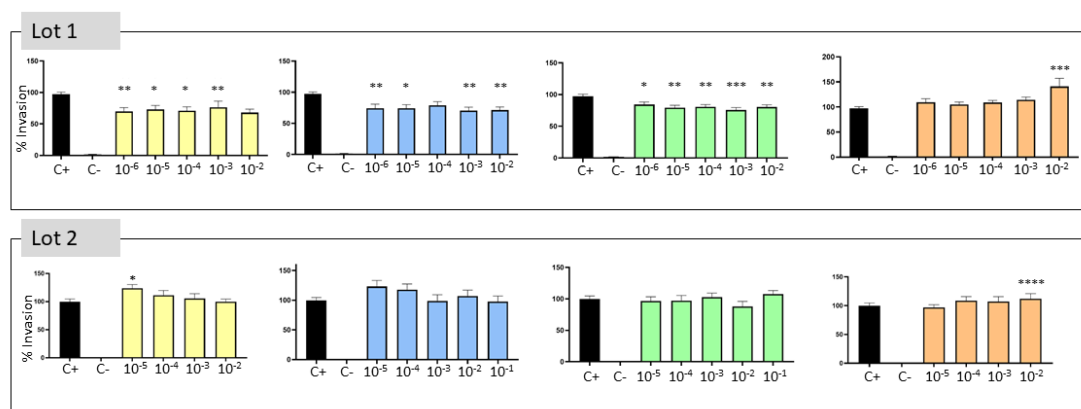


Figure 3. Effet des extraits sur le développement intracellulaire des sporozoïtes d'*E. tenella*.

