

ÉVALUATION DE L'INNOCUITE ET DES EFFETS IMMUNOSTIMULANTS D'EXTRAITS VEGETAUX SUR LIGNEES CELLULAIRES DE POULET

Laurine Allimonnier¹, Denis Bellenot², Benjamin Lemaire², Laurence A. Guilloteau³,

Angelique Travel⁴, Rodrigo Guabiraba¹

¹ INRA, UMR ISP, Université de Tours, Nouzilly, France. ² ITEIPMAI, Chemillé-en-Anjou, France. ³ INRA, UMR BOA, Université de Tours, Nouzilly, France. ⁴ ITAVI, INRA, Nouzilly, France

rodrigo.guabiraba-brito@inra.fr

RÉSUMÉ

Le maintien de conditions optimales de bien-être et de santé des animaux est une préoccupation quotidienne en élevage. L'utilisation d'extraits végétaux dans l'aliment des volailles semble un allié intéressant pour y contribuer, en renforçant les défenses naturelles des animaux. Néanmoins, cette voie de valorisation reste limitée par l'absence de références robustes et de bases méthodologiques solides. Notre objectif a été de mettre au point et d'éprouver une méthode *in vitro* simple, fiable et répétable qui permettrait d'évaluer l'innocuité cellulaire et la capacité immunostimulante d'extraits végétaux. Une étude bibliographique a permis d'identifier 4 extraits végétaux d'intérêt: Astragale, Echinacée, Ginseng et Mélisse. Un test d'activité métabolique (MTT) a été réalisé sur trois lignées cellulaires de poulets, représentatives des fonctions respiratoire (CLEC213), hépatique (LMH) et de la réponse immunitaire (macrophages HD11). L'immunostimulation induite chez les macrophages a été étudiée en évaluant la production de l'oxyde nitrique (NO), une molécule pro-oxydante et antimicrobienne, et l'activation de la voie pro-inflammatoire NFκB. Nous avons montré que les extraits d'Astragale, d'Echinacée, de Ginseng et de Mélisse sont peu ou pas toxiques pour les cellules. Les extraits de Mélisse et de Ginseng ont la capacité d'activer le métabolisme cellulaire de façon importante (50-100%) et induisent la production de NO (10 à 20 fois) ou l'activation de la voie NFκB (5 à 18 fois) de façon très marquée, suggérant des activités immunostimulantes. En conclusion, les différentes étapes de préparation des extraits, de choix des types cellulaires et des conditions de culture ont permis de définir une méthode pertinente pour évaluer l'innocuité et la capacité immunostimulante des extraits. Les extraits de Mélisse et de Ginseng semblent être des candidats non cytotoxiques, capables de stimuler les défenses naturelles des volailles.

ABSTRACT

Assessment of the innocuity and immunostimulant properties of plant extracts in chicken cell lines

Maintaining optimal conditions of welfare and animal health is a daily concern in livestock breeding. The use of plant extracts in poultry feed seems an interesting approach to reinforce the animals' natural defenses. However, this approach is limited by the lack of robust references and solid methodological bases. Our objective was to develop and test a simple, reliable and repeatable *in vitro* method to determine cytotoxic and immunostimulant capacities of plant extracts. A bibliographic study helped identifying 4 plant extracts: Astragalus, Echinacea, Ginseng and Melissa. A metabolic activity test (MTT) was carried out on three chicken cell lines, representative of the respiratory (CLEC213), hepatic (LMH) and immune (HD11 macrophages) functions. Immunostimulation was studied in macrophages by assessing the production of the pro-oxidant and antimicrobial molecule nitric oxide (NO) and the activation of the pro-inflammatory NFκB pathway. We have shown that Astragalus, Echinacea, Ginseng and Melissa had little or no cytotoxic effects. Melissa and Ginseng have the ability to significantly activate cell metabolism (50-100%), to induce the production of NO (10 to 20-fold) or the activation of the NFκB pathway (5 to 18-fold), thus suggesting immunostimulatory activities. In conclusion, extracts' preparation steps, cell type's choice and cell culture conditions allowed us to define a relevant methodology to assess cytotoxic and immunostimulant properties of the extracts. The Melissa and Ginseng extracts appear to be non-cytotoxic candidates, capable of stimulating the natural defenses of poultry.

INTRODUCTION

La sélection génétique a conduit à la production de poulets à très fort potentiel de croissance, avec des effets induits sur l'expression des comportements et sur les capacités d'adaptation. Les stratégies de sélection génétique, précédemment axées sur l'optimisation des critères de performances, ont permis ces gains de productivité avec néanmoins différentes conséquences sur la sensibilité et l'adaptabilité des animaux à des environnements changeants ou sub-optimaux (Koch et al., 2015). Il est aujourd'hui primordial de travailler à améliorer la robustesse des animaux au stress d'origine biotique ou abiotique, notamment sanitaire, et ainsi permettre de limiter le recours aux antibiotiques. L'utilisation d'extraits végétaux en tant qu'additifs dans l'aliment des volailles ouvre de nouveaux débouchés pour la filière des plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM). Elle constitue une solution intéressante pour soutenir le bon fonctionnement de l'organisme, notamment des systèmes de défense, prévenir l'usage des antibiotiques et pour améliorer l'image de l'élevage de volailles par des pratiques plus naturelles (Diaz-Sanchez et al. 2015). Néanmoins, cette voie de valorisation reste limitée par l'absence de références robustes et de bases méthodologiques solides permettant leur évaluation, aboutissant le plus souvent à des résultats peu reproductibles et parfois contradictoires. L'objectif du présent travail a été de mettre au point et d'éprouver une méthode *in vitro* simple, fiable et répétable qui permettrait d'évaluer l'innocuité cellulaire et la capacité immunostimulante d'extraits végétaux d'intérêt. Ce travail se place dans le développement d'une méthodologie globale d'évaluation de l'effet des extraits végétaux en filière avicole. Une étude bibliographique préalable a permis d'identifier 4 extraits végétaux d'intérêt pour stimuler les défenses naturelles des volailles (immunité, stress oxydatif et inflammatoire): Astragale (*Astragalus membranaceus*), Echinacée (*Echinacea purpurea*), Ginseng (*Ginseng panax*) et Mélisse (*Melissa officinalis*) (Travel et al., 2019).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Extraits végétaux

Les extraits d'Astragale, d'Echinacée, de Ginseng panax et de Mélisse ont été fournis et caractérisés (Tableau 1) par l'ITEIPMAI (Institut Technique Interprofessionnel des plantes à Parfum, Médicinales et Aromatiques). Ces extraits ont été produits à partir de l'appareil racinaire ou de l'appareil aérien des plantes. Un contrôle préalable de la qualité microbiologique des extraits a été réalisé avant mise en contact avec les lignées cellulaires. Pour ce faire, les extraits (dilués à 1 mg/ml d'eau) incubés dans un milieu de culture microbiologique riche du type BHI

(bouillon cœur-cervelle) pendant 5 jours n'ont présenté aucune contamination.

1.2. Lignées cellulaires

Afin d'évaluer l'innocuité et les effets immunostimulants des extraits végétaux, trois lignées cellulaires immortalisées de poulet (*Gallus gallus*) ont été utilisées. Les cellules épithéliales pulmonaires CLEC 213 ont été immortalisées à partir de cellules de poumon (Esnault et al., 2011). Les hépatocytes LMH ont été immortalisés à partir de cellules d'un carcinome hépatocellulaire (Kawaguchi et al., 1987). Ces deux lignées ont été maintenues dans du milieu DMEM-F12 contenant 2 mM de L-glutamine, 15 mM d'HEPES, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 100 U/ml de streptomycine et 100 µg/ml pénicilline. La lignée de macrophages aviaires HD11, immortalisée à partir de cellules mononucléaires de la moelle osseuse d'un poulet infecté par le virus de la myélocytomatose aviaire (MC29) (Beug et al., 1979), a été maintenue dans du milieu RPMI 1640 contenant 2 mM de L-glutamine, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 100 U/ml de streptomycine et 100 µg/ml pénicilline.

1.3. Test de Métabolisme

Afin d'évaluer l'activité métabolique de la cellule, un test MTT a été réalisé comme un indicateur de la viabilité cellulaire après stimulation par les extraits végétaux. Lorsque la cellule est viable, le sel de tétrazolum (MTT) est métabolisé par les mitochondries et réduit en cristaux de formazan. Une forte présence de ces cristaux indique une activité métabolique importante des cellules ou, le cas contraire, une potentielle cytotoxicité. Les cellules ont été cultivées en plaque de 96 puits à raison de 7×10^4 cellules par puits. Ensuite, les cellules ont été mises en présence de différentes concentrations d'extraits (de 10^{-1} à 10^{-6} mg/ml de milieu de culture) et incubées à 41°C durant 6 h, 24 h ou 48 h. Après ces temps d'incubation, le surnageant des cultures cellulaires ont été récupérés. Le dosage de l'oxyde nitrique a été effectué seulement sur les surnageants des cellules HD11. Pour toutes les cellules, le milieu de culture a été remplacé par un volume équivalent de milieu contenant 10 % de MTT à 5 mg/ml. Après une heure d'incubation à 41°C, le solvant organique diméthyl sulfoxyde (DMSO) a été ajouté afin de dissoudre les cristaux. Cent microlitres de la solution formée dans chaque puits ont été transférés dans une nouvelle plaque afin de mesurer le produit coloré formé au colorimètre (absorbance à 550 nm). La viabilité cellulaire de chaque lignée a été établie en fonction de l'absorbance des puits témoins, composés de cellules en présence de milieu de culture uniquement, dont la viabilité est considérée égale à 100 %.

1.4. Dosage de l'oxyde nitrique (NO)

La production de la molécule pro-oxydante et antimicrobienne oxyde nitrique (NO) est un marqueur d'intérêt pour évaluer l'immunostimulation. Afin de doser le NO dans le surnageant de culture des cellules HD11, le kit *Griess Reagent System* (Promega) a été utilisé. Le surnageant a été déposé en plaque 96 puits et une solution contenant de la sulfanilamide et du N-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED) a été ajoutée. Un produit coloré est formé, proportionnel à la quantité de NO présent, et l'absorbance est lue à 550 nm au colorimètre. En parallèle, une gamme étalon de nitrite a été effectuée afin de calculer la concentration de nitrite dans le surnageant comme indicateur de la présence du NO.

1.5. Dosage de l'activité NFκB sur cellules rapporteuses

La lignée cellulaire HD11-NFκB exprime de façon constitutive un gène rapporteur, la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur sensible à NFκB. Si une molécule active le facteur de transcription NFκB, fortement impliqué dans l'inflammation, les cellules vont produire de la luciférase. Les cellules ont été cultivées en plaque de 96 puits à raison de 7×10^4 cellules par puits. Ensuite, elles ont reçu deux concentrations d'extraits végétaux (10^{-1} à 10^{-2} mg/ml de milieu de culture) et incubés durant 6 h. Ensuite, les cellules ont été soumises à une lyse cellulaire en présence du substrat de la luciférase, la luciférine, afin d'obtenir une réaction luminométrique. La lecture de la plaque a été réalisée dans un luminomètre et les données exprimées en taux d'augmentation par rapport au contrôle (milieu de culture).

1.5. Analyses statistiques

Un test One-way ANOVA non paramétrique, suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé afin de réaliser une étude statistique (logiciel GraphPad Prism 6.0). Une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les différences entre le contrôle et les concentrations des extraits sont représentées par des astérisques : *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ et ****: $p \leq 0,0001$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Ici il est fait le choix de présenter les résultats chiffrés uniquement pour les extraits de Mélisse et de Ginseng, qui ont montré des résultats intéressants au regard de nos objectifs. Sur la lignée pulmonaire CLEC213, nous observons pour la Mélisse et pour le Ginseng une augmentation du métabolisme cellulaire à une forte concentration à 6 h (aux alentours de 20%). A 24 h et à 48 h, cette augmentation est toujours présente pour le Ginseng (Figure 1A), et pour la Mélisse (Figure 1B), même si à des concentrations inférieures une perte d'activité métabolique, considérée non-cytotoxique est observée, pouvant

aller de 4% à 20% (à 48 h). Sur la lignée cellulaire LMH, nous observons une forte augmentation de l'activité métabolique pour les deux extraits entre 6 h et 48 h (Figure 1A et B), plus notable pour le Ginseng (Figure 1A), qui induit une augmentation de l'activité métabolique de l'ordre de 30 à 40% même à 24 h. Aucun effet cytotoxique a été observé sur cette lignée cellulaire pour les deux extraits. Sur la lignée cellulaire HD11, le Ginseng (Figure 1A) et la Mélisse (Figure 1B) ont induit une augmentation du métabolisme cellulaire dès 6 h, avec un pouvoir d'induction relativement important, de l'ordre de 40-60%, à 24 h. Une perte d'activité métabolique est observée à 48 h pour les deux extraits à toutes les concentrations étudiées, un phénomène probablement lié à l'activation abondante et précoce observée dès 6 h. Néanmoins, sauf pour la concentration la plus élevée, aucune cytotoxicité significative est observée. En résumé, nos extraits présentent peu ou pas d'effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires étudiées. D'ailleurs, les seuils de cytotoxicité vis-à-vis du test MTT sont bien discutés dans la littérature, où un taux d'environ 50% de perte d'activité métabolique peut être réellement lié à un phénomène de cytotoxicité (ISO 10993-5:2009). D'ailleurs, le fait que tous les extraits mènent à une augmentation de l'activité métabolique dès 6 h peut expliquer pourquoi nous observons une chute de cette activité à 24 ou 48 h. Cela peut être expliqué par une perte de capacité métabolique intrinsèque due à un épuisement de la machinerie cellulaire. Les conséquences d'une augmentation de l'activité métabolique des lignées pulmonaires et hépatiques par les extraits végétaux ne sont pas clairement caractérisées, mais cela peut être lié à une augmentation de la synthèse de protéines pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines), parmi d'autres facteurs, suggèrent un effet immunostimulant. Afin de vérifier cette hypothèse, la production du NO et l'activation du facteur NFκB, deux biomarqueurs fortement liés à l'immunostimulation (Aktan, 2004), ont été évalués sur la lignée de macrophages HD11, représentative du système immunitaire. Pour le NO, l'extrait de Ginseng induit une production discrète, de l'ordre de 10 μ M, à la concentration la plus élevée d'extrait (10^{-1} mg/ml). Néanmoins, l'extrait de Mélisse induit une forte production du NO à cette même concentration, de l'ordre de 50 μ M. Par comparaison, notre témoin positif, le lipopolysaccharide (LPS d'*E. coli* O55:B5, 10 ng/ml) de paroi bactérienne, connu pour être un fort stimulateur de la production du NO par les macrophages, a induit à une production de l'ordre de 70 μ M (Figure 2A). De même, le profil d'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB, a été similaire à celui du NO: activation de l'ordre de 6 (Ginseng à 10^{-1} mg/ml) à 18 fois (Mélisse à 10^{-1} mg/ml) plus que le témoin négatif (Figure 2B). Le LPS induit une augmentation 23 fois supérieure au témoin négatif, ce qui indique que la Mélisse possède un effet très proche de celui observé avec le LPS, un composé de référence pour tester les propriétés

activatrices de l'immunité innée (Lu et al., 2008). En résumé, l'extrait de Mélisse possède une forte activité immunostimulante à deux concentrations (10^{-1} et 10^{-2} mg/ml) pour la lignée de macrophages aviaire, une activité nettement supérieure à celle observée avec l'extrait de Ginseng, qui reste néanmoins une molécule immunostimulante.

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aktan, F. 2004. Life Sci. Jun 25;75(6):639-53.
 Beug H., von Kirchbach A., Döderlein G., Conscience J.F., Graf T. 1979. Cell. Oct;18(2):375-90.
 Diaz-Sanchez S., D'Souza D., Biswas D., Hanning I. 2015. Poult Sci. Jun;94(6):1419-30.
 Esnault E., Bonsergent C., Larcher T., Bed'hom B., Vautherot J.F., Delaleu B., Guigand L., Soubieux D., Marc D., Quéré P. 2011. Virus Res. Jul;159(1):32-42
 ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
 Kawaguchi T., Nomura K., Hirayama Y., Kitagawa T. 1987. Cancer Res. Aug 15;47(16):4460-4.
 Koch A., Leterrier C., Collin A., Mercierand F., Rat C., Delaveau J., Grimaud I., Constantin P., Crochet S., Cailleau-Audouin E., Guilloteau L.A. 2015. 11èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras.
 Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. Cytokine. 2008 May;42(2):145-151.
 Travel A., Alleman F., Roinsard A., Tavares O., Bellenot D., Lemaire B., 2019. 13èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras. *In press*.

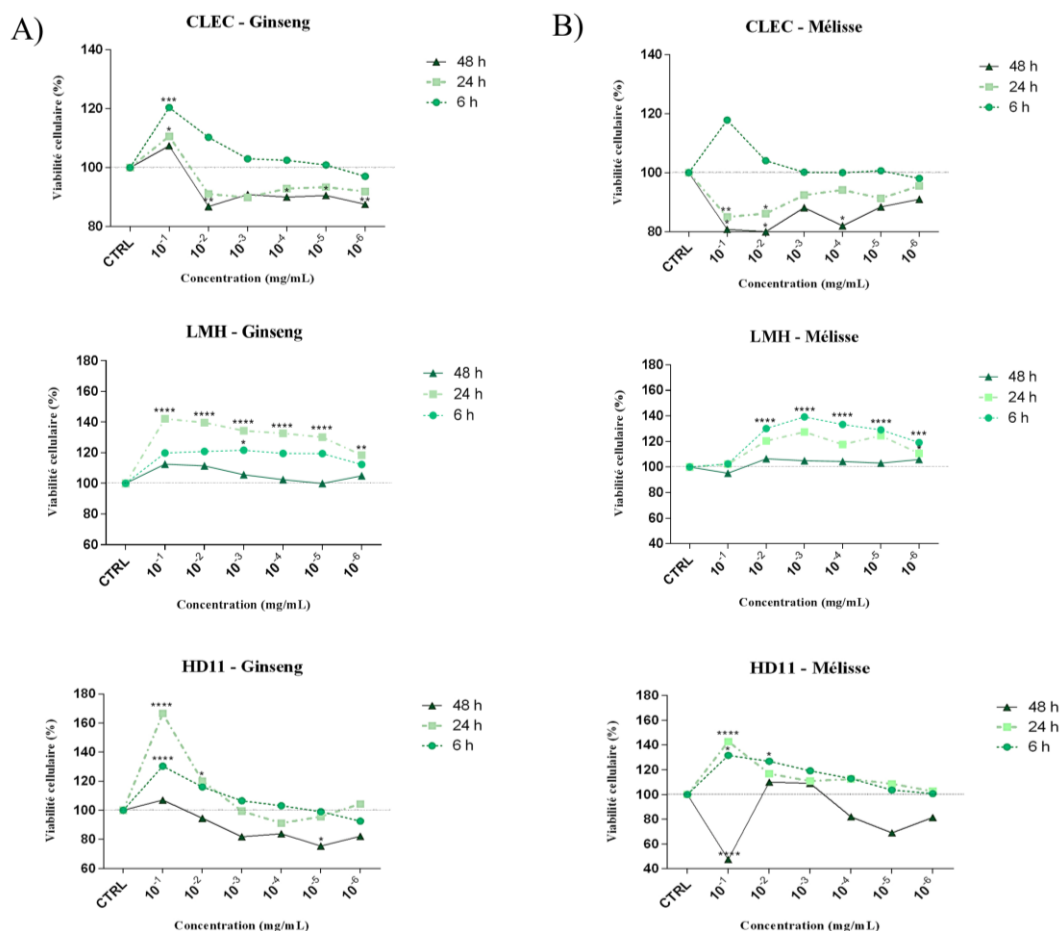


Figure 1. Test de métabolisme cellulaire pour la détermination indirecte de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des trois types cellulaires à des différentes concentrations d'extraits à différents temps d'incubation. En (A) l'effet de l'extrait de Ginseng. En (B) l'effet de l'extrait de Mélisse. N=3 réplicats/groupe/temps.

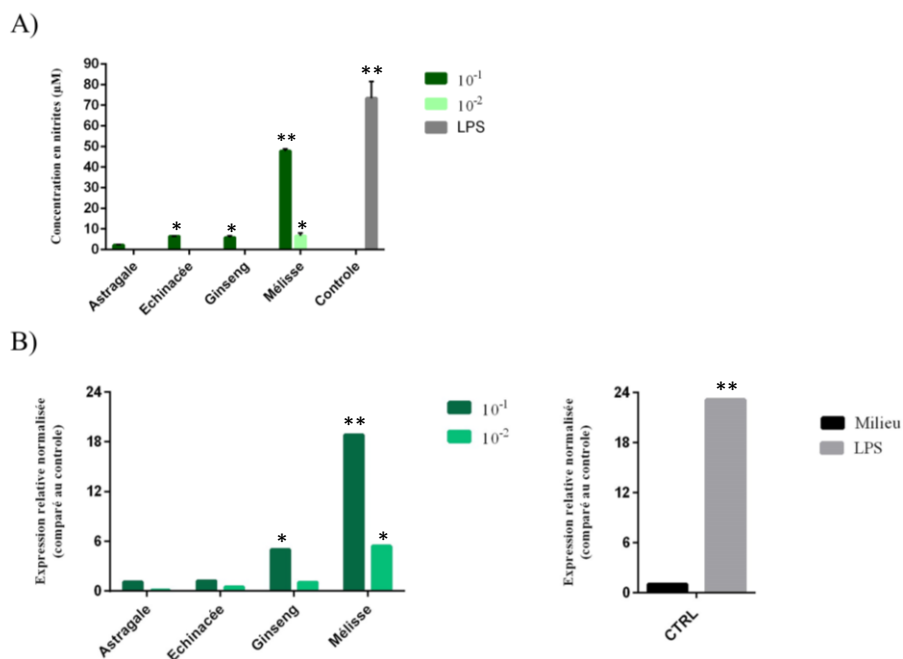


Figure 2. Effets immunostimulants des extraits végétaux sur une lignée cellulaire de macrophages de poulet (HD11). En (A) la production d'oxyde nitrique (NO) par les différents extraits végétaux 48 h après exposition. En (B) l'effet des extraits végétaux sur l'activité du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB, via la mesure de l'activité de la luciférase, 6 h après exposition. N=3 réplicats/groupe.

Plante	Partie utilisée	Solvant d'extraction	Substances détectées			
<i>Mélisse</i>	Parties aériennes	Eau/Ethanol (40/60 V/V)	Acide rosmarinique	Dérivés hydroxy cinnamiques	Maltodextrine	Cendres totales
<i>Echinacée</i>	Parties aériennes	Eau/Ethanol (40/60 V/V)	Acides caftarique, chlorogénique et cichorique	---	Maltodextrine	Cendres totales
<i>Ginseng</i>	Racine	Eau/Ethanol (40/60 V/V)	Ginsenosides	---	Maltodextrine	Cendres totales
<i>Astragale</i>	Racine	Eau/Ethanol (70/30 V/V)	Polysaccharides	Formononétine	Maltodextrine	Cendres totales

Tableau 1. Caractérisation physico-chimique des extraits végétaux.