

# Effets des médiateurs du stress sur la mémoire immunitaire innée des monocytes porcins

**Solenn Gavaud**

Université de Rennes 1  
Master 2<sup>ème</sup> Année  
Parcours Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Année universitaire 2018-2019

Maîtres de stage :

**Blandine Lieubeau**, Chargé de recherche, INRA  
**Julie Hervé**, Maître de conférences, Oniris

Laboratoire d'Immuno-Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire  
(IECM)

## Remerciements

Au terme de ces 5 mois de stage, je tiens à remercier toute l'Unité IECM, de m'avoir accueillie avec tant de gentillesse. Votre bonne humeur et votre dynamisme ont été d'un grand soutien tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Marie Bach de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour effectuer mon stage de Master 2.

Je tiens à remercier tout particulièrement Blandine Lieubeau et Julie Hervé pour m'avoir encadrée et soutenue pendant mon stage. Votre bienveillance et vos conseils m'ont beaucoup aidé tout au long de cette expérience.

Un grand merci aussi à Karine Haurogné et Marie Allard de m'avoir soutenue lors de mes manipulations, votre expérience m'a beaucoup aidé.

Je remercie Arnaud Buchet d'avoir participé à mes travaux *via* notamment le projet Sevrobust ainsi que pour ses précieux conseils.

Je remercie Stéphanie Le Bas-Bernardet (CRTI, UMR 1064, INSERM, Université de Nantes) ainsi qu'Elodie Merlot et Françoise Thomas (UMR INRA Pégase, Saint Gilles) pour m'avoir donné accès aux échantillons de sang de porc.

Je remercie le GIS Avenir Elevages pour m'avoir financée pour ce projet de master 2.

Pour terminer, je tiens à remercier Céline Raguènes-Nicol de m'avoir suivie tout au long de ce stage.

# Table des matières

Remerciements

Résumé

Liste des figures

Liste des abréviations et noms commerciaux

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	4
1. <i>Réactifs</i> .....	4
2. <i>Isolement des PBMC et monocytes porcins</i> .....	4
3. <i>Conditionnement des monocytes porcins</i> .....	5
4. <i>Analyse des cellules par cytométrie en flux</i> .....	6
5. <i>Analyse de la production de cytokines</i> .....	6
6. <i>Quantification des taux de catécholamines circulantes</i> .....	6
7. <i>Quantification du taux d'IL-6</i> .....	7
8. <i>Analyses statistiques</i> .....	7
<b>Résultats</b> .....	8
1. <i>Obtention des monocytes porcins à partir de sang de porc</i> .....	8
2. <i>Conditionnement des monocytes porcins par le <math>\beta</math>-glucane</i> .....	9
3. <i>Effets des catécholamines sur le conditionnement par le <math>\beta</math>-glucane des monocytes porcins</i> .....	11
4. <i>Taux de catécholamines dans le plasma des porcelets avant sevrage</i> .....	12
5. <i>Dosage de l'IL-6 dans le sérum des porcelets après sevrage</i> .....	12
<b>Discussion</b> .....	14
<b>Références bibliographiques</b>	

# Effects of stress mediators on the innate immune memory of porcine monocytes

**Key Words:** Trained immunity, pig, stress, monocytes, catecholamines.

In intensive husbandry, pigs are exposed to multiple stressful events such as premature weaning, overpopulation and mixing with unfamiliar pigs. By challenging homeostasis, these stressors promote the occurrence of infectious diseases, leading to the overuse of antibiotics with the risk of selecting multi-resistant bacteria. Stressors activate the hypothalamic-pituitary-adrenal and sympatho-adreno-medullary systems, which respectively release glucocorticoids and catecholamines (especially norepinephrine and epinephrine). Catecholamines are known to modulate immune responses by acting directly on immune cells such as macrophages, blocking their polarization to a pro-inflammatory M1 phenotype. Besides, macrophages are essential players of trained immunity, which allows a more efficient immune response following exposition to a second pathogen. This phenomenon, also named innate immune memory, was shown to be T and B lymphocyte independent. Numerous studies in human and mouse highlighted the ability of  $\beta$ -glucan to induce a monocyte trained phenotype characterized by a functional reprogramming. These modifications leads to a more strongest cellular response following a second stimulation, with increased pro-inflammatory cytokine production. To our knowledge, no study has already described this phenomenon in porcine monocytes.

In this context, our objective was to study the ability of commercial  $\beta$ -glucan to induce training in porcine monocytes and to analyse catecholamines effects on this conditioning. The training was evaluated by measuring pro-inflammatory cytokine (TNF $\alpha$  and IL-8) production.

Our second objective was to explore whether the exposure of pigs to stressors just before weaning, measured by circulating catecholamine levels, is indicative of their immune competence evaluated one week after weaning. Indeed, our hypothesis is that exposition to stress factors has long-term deleterious effects on immune competence. The immune competence of piglets after weaning was evaluated *in vitro* by measuring the ability of their blood cells to secrete IL-8 in response to LPS stimulation. Two groups of piglets low and high responders were defined.

In the *in vitro* experiments, we found non-statistically significant slight increases in TNF $\alpha$  and IL-8 production after LPS stimulation of  $\beta$ -glucan-conditioned monocytes as compared to

cells not exposed to  $\beta$ -glucan. Thus  $\beta$ -glucan conditioning of porcine monocytes did not induce training. We have therefore not been able to study catecholamines effects on this phenomenon.

Plasma catecholamine levels of piglets before weaning were not different between high and low responders. Thus, the ability of pigs to respond to an infectious agent after weaning does not appear to depend on the level of stress perceived by the piglets before weaning. To complete this study, we also quantified serum IL-6 levels one week after weaning. In 85% of piglets, serum IL-6 levels were below the detection threshold of the assay. It was detected in the serum of only 12 animals of which 11 were found in the "high responder" group and came from the same husbandry with degraded sanitary conditions.

In conclusion, this study did not prove the existence of trained immunity in pigs. In addition, we did not demonstrate any correlation between catecholamine levels before weaning and piglets immune competence after weaning. We identified different points to improve the conditioning protocol, but time constraints did not allow us to set-up these experiments. Thus, more studies are warranted to assess the effect of stress mediators on trained immunity in porcine monocytes.

## Liste des figures

**Figure 1** : Mécanismes de mise en place de l'immunité entraînée.

**Figure 2** : Schéma du conditionnement *in vitro* des monocytes porcins.

**Figure 3** : Exemple d'analyse des monocytes (CD14+) par cytométrie en flux lors des étapes de purification.

**Figure 4** : Effet du conditionnement par le  $\beta$ -glucane sur les productions de TNF $\alpha$  et d'IL-8 induites par le LPS sur les monocytes isolés du porc #757.

**Figure 5** : Effet du conditionnement par le  $\beta$ -glucane sur les productions de TNF $\alpha$  et d'IL-8 induites par le LPS sur les monocytes porcins dans les différentes expériences.

**Figure 6** : Effet du conditionnement par le  $\beta$ -glucane en présence de catécholamines sur les productions de TNF $\alpha$  et d'IL-8 induites par le LPS sur les monocytes porcins.

**Figure 7** : Mesure des taux de catécholamines circulantes dans le plasma de 80 porcelets avant sevrage.

## Liste des abréviations et noms commerciaux

7-AAD : 7-aminoactinomycine D

Ad : Adrénaline

Akt : Protéine kinase B

BCG : Bacillus Calmette-Guérin

CD: Cluster of Differentiation

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

E. coli : Escherichia coli

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FSC : Forward Scatter

HHS : Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

IL : Interleukine

LPS : Lipopolysaccharide

M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor

mTor : mechanistic Target of rapamycin

NA : Noradrénaline

ns: non significatif

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

Pancoll : Milieu de séparation des lymphocytes

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SAM : Sympatho-Adrénal-Médullaire

SSC : Side scatter

SVF : Sérum de veau fœtal

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

WBA : Whole Blood Assay

# Introduction

Depuis les années 70, les pratiques d'élevage se sont intensifiées avec la sélection génétique des porcs, celle-ci étant conduite essentiellement sur des critères de performance de production. Cependant, il serait raisonnable d'inclure de nouveaux critères basés notamment sur la sélection des animaux robustes alliant un fort potentiel de production et une forte résistance aux facteurs de stress. En effet, au sein des élevages intensifs, les animaux sont exposés à de nombreux éléments stressants tels que le sevrage précoce, les ré-allotements successifs, la surpopulation et le transport. Tous ces facteurs de stress peuvent affecter leur capacité de production. Ces facteurs de stress perturbent l'homéostasie de l'organisme, favorisant ainsi l'apparition d'infections, ce qui conduit les éleveurs à utiliser de façon massive des antibiotiques, avec le risque de voir émerger des bactéries multi-résistantes (revu par Lyte et Lyte, 2019).

Dans l'organisme, le stress induit l'activation des systèmes hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et sympatho-adréno-médullaire (SAM), qui libèrent respectivement des glucocorticoïdes et des catécholamines dont la noradrénaline et l'adrénaline. Ces médiateurs du stress ont un effet direct sur le fonctionnement des cellules immunitaires, et par conséquent sur la réponse immunitaire elle-même (revu par Dhabhar, 2015). Des travaux du laboratoire ont montré que les macrophages porcins expriment des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques dont l'activation, conjointement à une stimulation par le LPS (Lipopolysaccharide), empêche la polarisation des macrophages porcins vers un phénotype M1 pro-inflammatoire (Bacou *et al.*, 2017).

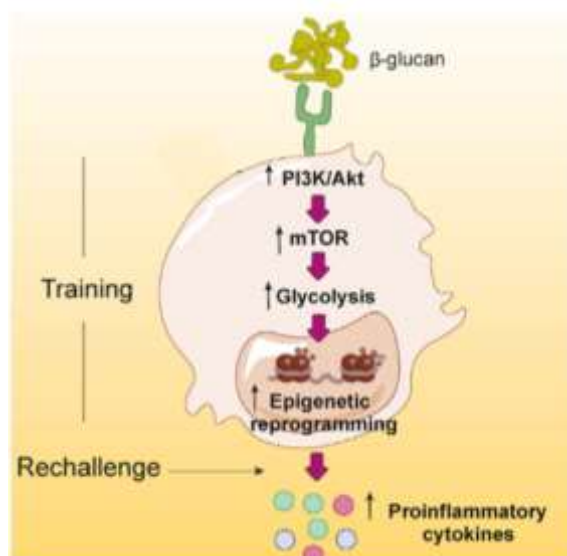
Les macrophages sont des cellules clés dans la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes. Ces cellules, ainsi que les progéniteurs myéloïdes (Mitroulis *et al.*, 2018, Kaufmann *et al.*, 2018) et les cellules Natural Killer (Smith *et al.*, 2017) sont également des acteurs de l'immunité entraînée, aussi appelée mémoire immunitaire innée (revu par Netea *et al.*, 2011).

Le phénomène de mémoire immunitaire a longtemps été considéré comme une caractéristique fondamentale et spécifique de l'immunité adaptative. Cependant, ce dogme a été bouleversé par des travaux mettant en évidence l'existence d'une mémoire immunitaire innée chez les plantes (revu par Durrant et Dong, 2004) et les animaux invertébrés (revu par Kurtz, 2005). Ce phénomène a également été observé chez les mammifères, en particulier chez les nouveau-nés dont l'immunité adaptative n'est pas encore opérationnelle (revu par Levy et Wynn, 2014). Ce processus a été étudié surtout chez l'Homme et dans les modèles murins. Par exemple, Arts *et al.* ont montré que la vaccination par le BCG induisait une reprogrammation épigénétique des monocytes humains (2018). Ce processus entraîne une protection lors de la



réinfection *in vitro* des monocytes avec une souche vaccinale du virus de la fièvre jaune, caractérisée par une diminution de la virémie corrélée à une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$  par les monocytes. Les travaux de Quintin *et al.* ont montré que des souris dépourvues de lymphocytes T et B fonctionnels préalablement traitées par une faible dose de *Candida albicans* sont protégées d'une réinfection létale par *C. albicans* (2012). Ainsi, l'entraînement par *C. albicans* induit la reprogrammation fonctionnelle des monocytes, indépendamment des lymphocytes T et B.

La mémoire immunitaire innée, contrairement à la mémoire immunitaire adaptative, n'est pas spécifique du pathogène rencontré et confère une protection croisée. Par exemple, les travaux de Di Luzio et Williams ont montré qu'une première stimulation par le  $\beta$ -glucane entraîne une protection des souris lors d'une infection avec *Staphylococcus aureus* (1978). Le  $\beta$ -glucane a été identifié comme un stimulus efficace de l'induction de l'immunité entraînée des monocytes humains (Ifrim *et al.*, 2014 ; Beekering *et al.*, 2016 ). En effet, cette molécule de la famille des PAMPs (Motif moléculaire associé aux pathogènes) se lie notamment à un récepteur de surface, la Dectin-1 (Quintin *et al.*, 2012), entraînant l'activation de la voie PI3K/Akt/mTor (Cheng *et al.*, 2014 ). Cette dernière induit une reprogrammation fonctionnelle de la cellule (Figure 1) caractérisée par un basculement du métabolisme cellulaire vers la glycolyse (Cheng *et al.*, 2014), un remodelage épigénétique mettant en évidence une signature épigénétique de l'immunité entraînée (Saeed *et al.*, 2014) ainsi qu'une néo-synthèse d'ADN par endoréplication (Cime-Castillo *et al.*, 2018).



**Figure 1 : Mécanismes de mise en place de l'immunité entraînée.**

L'entraînement des monocytes par le  $\beta$ -glucane induit une reprogrammation de la cellule, permettant à cette dernière de produire une quantité de cytokines pro-inflammatoires plus importante lors d'un second contact avec un agent pathogène.

Image adaptée de Saz-Leal *et al.*, 2018.

L'ensemble de ces événements permet une réponse cellulaire plus efficace lors d'une seconde stimulation, caractérisée notamment par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (revu par Netea *et al.*, 2016).

De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de la mémoire immunitaire innée chez l'Homme et la souris. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a déjà démontré l'existence de ce processus d'immunité entraînée chez le porc. Dans ce contexte, nos travaux s'organisent autour de l'étude de la capacité d'un conditionnement par le  $\beta$ -glucane des monocytes porcins à induire un processus d'entraînement. Les effets des catécholamines sur ce conditionnement pourront ainsi être évalués. En effet, l'hypothèse que nous avons formulée est qu'une exposition à des facteurs de stress, pendant la période du sevrage, pourrait avoir des effets délétères à long terme sur la capacité de l'animal à répondre à un agent infectieux. Ainsi, les connaissances apportées par cette étude pourraient permettre dans le futur d'affiner la sélection des porcelets au profit d'animaux plus robustes, ce qui pourrait participer à la réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage.

Cette étude est organisée en deux axes. Dans un premier temps, les monocytes porcins ont été conditionnés *in vitro* par le  $\beta$ -glucane afin d'étudier la capacité de ce polysaccharide à induire un processus d'entraînement. Dans ce contexte, les effets de la noradrénaline et de l'adrénaline sur le conditionnement par le  $\beta$ -glucane des monocytes ont été étudiés. Dans un second temps, les taux de catécholamines circulantes avant sevrage ont été dosés chez des porcelets répartis en deux groupes selon la capacité de leurs cellules sanguines après sevrage à sécréter *in vitro* de l'IL-8 en réponse au LPS (« Whole Blood Assay », WBA), dans le but d'analyser la relation entre ces deux paramètres.

## Matériel et Méthodes

### 1. Réactifs

Le  $\beta$ -1,4-1,3-1,6(D)-glucane, ligand de la Dectin-1, provenant du champignon *Trametes versicolor* est fourni par InvivoGen (Toulouse, France). Le LPS d'*Escherichia coli* de sérotype O111:B4, ainsi que l'adrénaline et la noradrénaline sont achetés auprès de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le milieu de culture RPMI 1640 (PAA, Velizy-Villacoublay, France) complet contient 2mM de L-glutamine, 1mM de pyruvate de sodium et des antibiotiques (équivalent à 100U/ml de Pénicilline, 100 $\mu$ g/ml de Streptomycine et 0,25 $\mu$ g/ml Fongizone) (Eurobio ingen, Courtaboeuf, France). Le SVF (sérum de veau fœtal) est fourni par Eurobio ingen. Le rhM-CSF utilisé provient du fournisseur Miltenyi-Biotec (Bergisch Gladbach, Allemagne). La solution de Percoll hyper-osmotique est composée de 48,5% Percoll (Sigma-Aldrich, densité : 1.13 g/ml), 41,5% d'eau et 10% de solution de NaCl à 1,6M. Le Pancoll a une densité de 1,077g/ml et provient de PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Allemagne). Le 7-AAD est fourni par Sigma-Aldrich.

### 2. Isolement des PBMC et monocytes porcins

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont isolées à partir de sang de porcs [(Landrace x Large White) x Piétrain] (1) âgés de 6 mois et prélevés sous anesthésie générale avant euthanasie au Laboratoire des Grands Animaux (LGA) au CHU Hôtel-Dieu de Nantes (amendements aux projets : #12144, #12189, #12364, #14664, #15090 ) ou (2) âgés de 3 semaines provenant de l'Unité Expérimentale de l'INRA de Saint Gilles, euthanasiés dans le cadre d'une expérimentation de l'INRA. Dans ce dernier cas, les prélèvements sont faits au moment de la saignée juste après la mise à mort de l'animal. L'utilisation du sang de ces animaux respecte ainsi la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

Dans un premier temps, le sang obtenu est centrifugé à 500g pendant 20min à 18°C et la couche leuco-plaquettaire ainsi formée est collectée. Cette dernière est diluée dans du RPMI 1640 contenant des antibiotiques jusqu'à obtention du volume de sang initial. Puis deux volumes de sang sont déposés sur un volume de Pancoll puis centrifugés à 950g pendant 20min à 18°C. L'anneau enrichi en PBMC ainsi obtenu à l'interface est collecté, puis lavé 3 fois dans du RPMI 1640 froid avec antibiotiques.

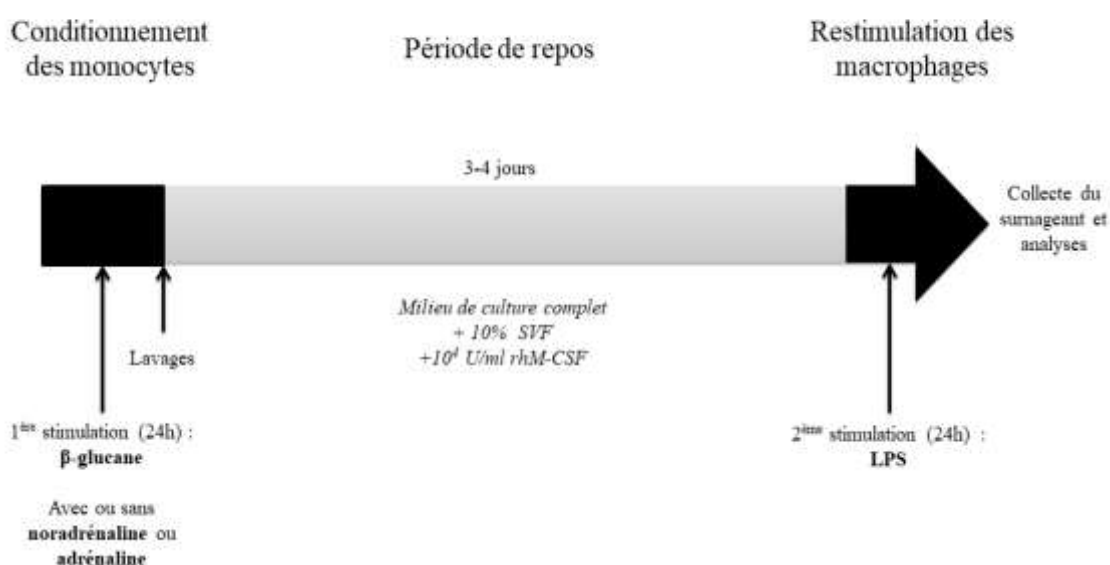
L'isolement des monocytes sur Percoll est réalisé selon la méthode décrite par Repnik *et al.* (2003) : 3ml de suspension cellulaire (PBMC) à 150-200.10<sup>6</sup> cellules sont déposés à la surface de 10 ml d'une solution de Percoll hyper-osmotique. Après centrifugation à 580g pendant 15min à 18°C, la couche de cellules située à l'interface est collectée puis lavée 3 fois

avec du RPMI 1640 froid avec antibiotiques. Les monocytes obtenus sont ensuite re-suspendus dans du milieu de culture complet, puis numérés.

### 3. Conditionnement des monocytes porcins

Les monocytes (300 000 cellules/puits) sont cultivés en plaque 96 puits à fond plat (Thermo Fischer Scientific, St Herblain, France). Après 1 heure d'incubation à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu de culture est retiré afin d'éliminer les cellules non adhérentes qui ne sont potentiellement pas des monocytes.

#### Schéma du conditionnement *in vitro* des monocytes porcins



**Figure 2 : Schéma du conditionnement *in vitro* des monocytes porcins.**

Les monocytes adhérents sont stimulés par le  $\beta$ -glucane (100 $\mu$ g/ml), en absence ou en présence de noradrénaline (10<sup>-6</sup>M) ou d'adrénaline (10<sup>-6</sup>M), pendant 24h à 37°C. Après cette incubation, les cellules sont lavées avec du RPMI puis incubées pendant 3-4 jours dans un milieu de culture complet supplémenté en SVF et en rhM-CSF. A l'issue de cette période de repos, les cellules sont stimulées par le LPS (10ng/ml) pendant 24h à 37°C.

Les cellules témoins ne sont pas exposées au  $\beta$ -glucane et sont maintenues en milieu de culture complet jusqu'au moment de la stimulation LPS.

Les cellules sont incubées avec 100 $\mu$ g/ml de  $\beta$ -glucane (dans 200 $\mu$ l de milieu de culture complet) ou avec uniquement du RPMI 1640 contenant des antibiotiques, pendant 24 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> (Figure 2).

Pour tester les effets des catécholamines sur le conditionnement des monocytes, l'adrénaline (10<sup>-6</sup>M) ou la noradrénaline (10<sup>-6</sup>M) sont ajoutées en même temps que le  $\beta$ -glucane. Chacune des conditions est testée en triplicat au moins.

Après cette phase de conditionnement, les cellules sont lavées 2 fois avec 200 $\mu$ l de RPMI 1640 par puits. Les cellules sont incubées pendant une période de repos de 3-4 jours à

37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> en milieu de culture complet supplémenté avec 10% de SVF et 10<sup>4</sup> U/ml de rhM-CSF.

A l'issue de cette période de repos, les cellules sont restimulées pendant 24h avec 10ng/ml de LPS ou avec uniquement du RPMI 1640 contenant des antibiotiques. Après cette étape, le surnageant est collecté, centrifugé puis stocké à -80°C pour le dosage ultérieur des cytokines.

#### *4. Analyse des cellules par cytométrie en flux*

Des échantillons de cellules sont collectés au moment de l'obtention des PBMC et après l'étape d'enrichissement en monocytes. Les cellules sont caractérisées à l'aide de l'anti-CD14 porcine (clone MIL2) couplé au FITC, ce qui permet d'estimer le degré d'enrichissement en monocytes CD14+ après l'étape d'isolement par Percoll. Les cellules sont marquées pendant 30 min à 4°C avec l'anticorps dilué à 1,5µg/ml avec du PBS (Phosphate Buffered Saline, Eurobio ingen) 0,2% gélatine et 0,05% de sérum de porc. Les cellules sont ensuite noyées dans du PBS 0,2% gélatine, puis lavées 2 fois avec du PBS 0,2% gélatine. La viabilité cellulaire est évaluée par l'ajout de 7-AAD (2 ng/µl). Les cellules sont analysées par cytométrie en flux (MacQuant, Miltenyi Biotech).

#### *5. Analyse de la production de cytokines*

Les productions de TNFα et d'IL-8 sont évaluées sur 3 à 4 réplicats de culture par la méthode ELISA (Duoset ; R&D Systems, Abington, UK) selon le protocole indiqué par le fournisseur. Les intervalles de détection sont compris entre 31,25pg/ml et 2000pg/ml pour le TNFα et 125pg/ml et 8000pg/ml pour l'IL-8.

#### *6. Quantification des taux de catécholamines circulantes*

Les échantillons de plasmas ont été obtenus lors du projet Sevrobust (Buchet *et al.*, 2017). Ces échantillons ont été collectés à 26 et 33 jours d'âge, chez 288 porcelets issus de 16 élevages (soit 18 porcelets par élevage) sélectionnés sur des critères sanitaires et de production. Au cours de ce projet, la capacité immunitaire des porcelets après le sevrage (33 jours) a été évaluée en mesurant la capacité de leurs cellules du sang à sécréter de l'IL-8 *in vitro* en réponse au LPS (WBA).

Pour notre étude, parmi les 288 porcelets, ont été choisis les 40 individus dont la production d'IL-8 en WBA était la plus forte (>270 pg/ml) et 40 autres individus des mêmes élevages, dont la production d'IL-8 était non détectable (excepté un individu à 198 pg/ml), constituant deux groupes: les « forts répondeurs » et « faibles répondeurs ».

Le dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline est effectué sur 2 réplicats de 300µl de plasma EDTA par porcelet âgé de 26 jours (avant sevrage) par la méthode d'ELISA compétitif [2-CAT (A-N) Research ELISA ; LDN, Nordhorm, Allemagne]. Les intervalles de détection sont compris entre 0,2ng/ml et 32ng/ml pour le dosage de la noradrénaline et 0,5ng/ml et 80ng/ml pour le dosage de l'adrénaline.

#### *7. Quantification du taux d'IL-6*

La quantification du taux d'IL-6 des porcelets de 33 jours d'âge (après sevrage) est réalisée sur un échantillon de sérum par la méthode ELISA (Quantikine, R&D Systems, Abington, UK) selon le protocole indiqué par le fournisseur. L'intervalle de détection est compris entre 18,8pg/ml et 1200pg/ml.

#### *8. Analyses statistiques*

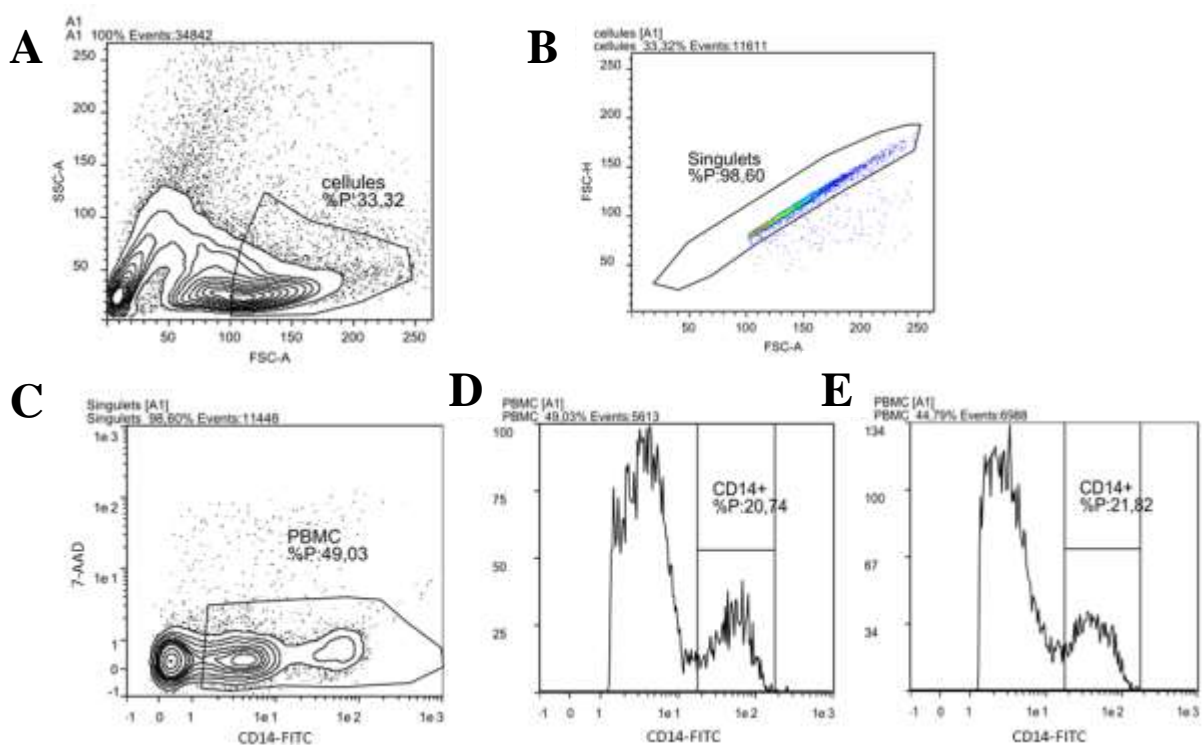
Les analyses statistiques et les représentations graphiques sont réalisées avec le logiciel PrismGraphPad version 4.0.

Dans le cas de comparaison de deux groupes, le test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé, excepté dans le cas de données appariées où le test de Wilcoxon est utilisé. Les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

# Résultats

## 1. Obtention des monocytes porcins à partir de sang de porc

L'enrichissement de la suspension cellulaire en monocytes sur gradient de Percoll est suivi par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage CD14. Afin d'analyser ces résultats une stratégie de fenêtrage est développée ; ainsi les caractéristiques de taille (FSC) et de granularité (SSC) sont exploitées, permettant d'exclure notamment les débris. Le fenêtrage des singulets est réalisé, suivi de la sélection des événements 7-AAD négatifs correspondant aux cellules vivantes. Le pourcentage de monocytes est estimé par le pourcentage d'événements CD14+ (exemple Figure 3). Cette stratégie de sélection est appliquée et adaptée à chaque échantillon.



**Figure 3 : Exemple d'analyse des monocytes (CD14+) par cytométrie en flux lors des étapes de purification.**

- (A) : Sélection des événements correspondant aux cellules.
- (B) : Sélection des événements correspondant à des cellules uniques.
- (C) : Sélection des cellules d'intérêts : PBMC viables.
- (D) : Pourcentage de cellules CD14+ après l'isolement des PBMC sur une solution de Pancoll.
- (E) : Pourcentage de cellules CD14+ après une seconde étape de purification sur une solution de Percoll.

Les différentes étapes d'enrichissement ne semblent pas affecter la viabilité des cellules. En revanche, la purification sur Percoll ne permet qu'un enrichissement modéré en monocytes très dépendant des échantillons de 1% à 15% (n=4). De plus, cette étape élimine 90% des cellules déposées au départ, pour un rendement final très faible.

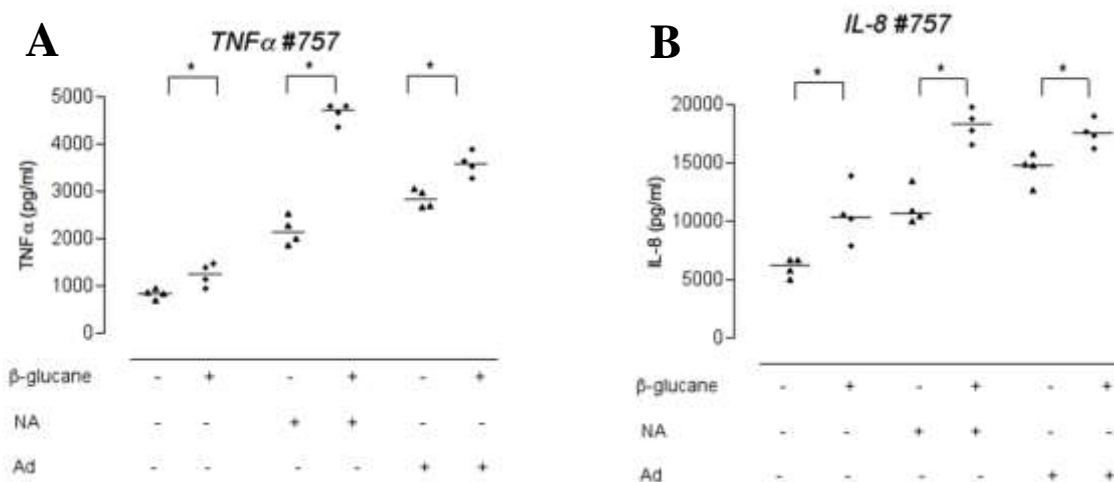
## 2. Conditionnement des monocytes porcins par le $\beta$ -glucane.

Afin d'évaluer les effets du conditionnement par le  $\beta$ -glucane sur les monocytes porcins, plusieurs contrôles sont nécessaires.

Tout d'abord, la production de  $\text{TNF}\alpha$  des cellules non traitées (non exposées et non stimulées LPS) et des cellules conditionnées par le  $\beta$ -glucane et non restimulées par le LPS sont évaluées en fin d'expérience (5-6 jours). Dans ces deux conditions, la quantité de  $\text{TNF}\alpha$  est non détectable pour 3 individus (#752, #753, #758). Pour les 3 autres porcs (#4, #5, #757), les cellules non traitées ont un taux de  $\text{TNF}\alpha$  compris entre 115pg/ml et 252pg/ml équivalent à celui des cellules conditionnées par le  $\beta$ -glucane mais non stimulées par le LPS (données non présentées).

Dans la suite des analyses, les cellules non conditionnées par le  $\beta$ -glucane mais stimulées par le LPS sont considérées comme les cellules témoins. La stimulation par le LPS multiplie par 5 à 7 fois le niveau de production de  $\text{TNF}\alpha$  par les monocytes (1000-1500pg/ml), comparé aux cellules non stimulées par le LPS.

Les graphiques présentés illustrent les productions de  $\text{TNF}\alpha$  et d'IL-8 des monocytes porcins conditionnées ou non par le  $\beta$ -glucane et stimulés par le LPS. Les productions de cytokines pro-inflammatoires sont évaluées pour chaque réplicat des différentes conditions expérimentales. Les résultats obtenus avec le porc #757 sont présentés dans la Figure 4.



**Figure 4 : Effet du conditionnement par le  $\beta$ -glucane sur les productions de  $\text{TNF}\alpha$  et d'IL-8 induites par le LPS sur les monocytes isolés du porc #757.**

Les productions de  $\text{TNF}\alpha$  (A) et d'IL-8 (B) sont évaluées pour les cellules conditionnées pendant 24h avec du  $\beta$ -glucane (100 $\mu$ g/ml) ou avec du RPMI en présence ou non de noradrénaline (NA, 10<sup>-6</sup>M) ou d'adrénaline (Ad, 10<sup>-6</sup>M). Après une période de repos de 3-4 jours, les cellules sont stimulées avec du LPS (10ng/ml).

Chaque symbole représente un réplicat de culture (n=4).

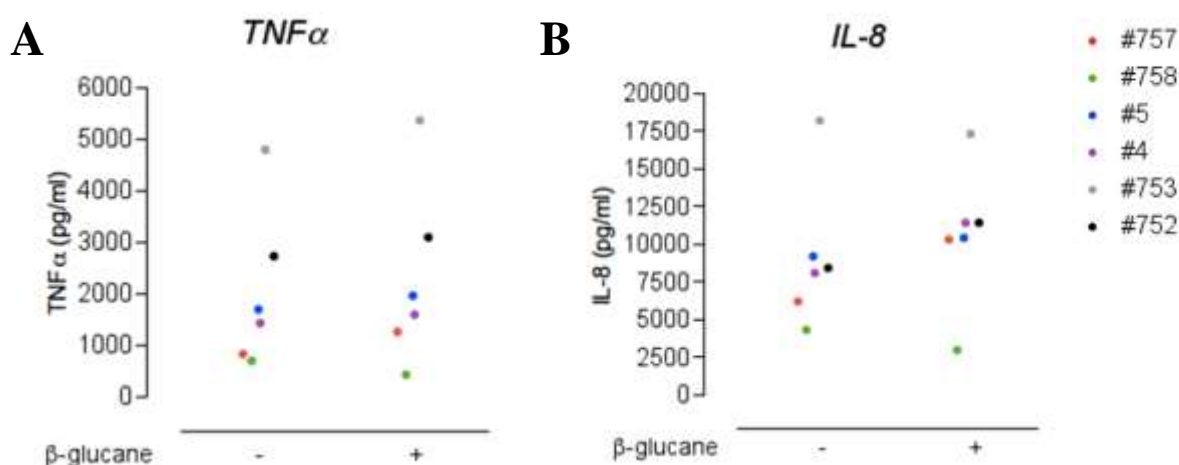
Test Mann-Whitney : \*p-value<0,05.



Une certaine variabilité plus ou moins forte selon les individus est observée au sein de chaque condition expérimentale. Dans l'exemple du porc #757, les niveaux médians de production de TNF $\alpha$  et d'IL-8 sont significativement augmentés lors de la stimulation LPS des cellules conditionnées par le  $\beta$ -glucane en comparaison aux cellules témoins.

L'ensemble des réplicats d'une même condition expérimentale peut être représenté graphiquement en un seul point, correspondant à la médiane de ces réplicats pour un porc. Ainsi il est possible de visualiser les effets du conditionnement par le  $\beta$ -glucane sur les monocytes selon les individus. Les résultats obtenus pour les échantillons dérivés des 6 porcs sont présentés Figure 5. Pour 5 individus sur 6 (excepté pour le porc #758), une légère augmentation du niveau médian de production de TNF $\alpha$  est observée lors de la stimulation par le LPS des monocytes conditionnés par le  $\beta$ -glucane, en comparaison aux cellules témoins.

Pour 4 individus sur 6 (excepté pour les porcs #758 et #753), le conditionnement des cellules par le  $\beta$ -glucane provoque une légère augmentation du niveau médian de production d'IL-8 lors de la stimulation par le LPS en comparaison aux cellules témoins. Par ailleurs, il est important de noter que les profils de production observés pour le TNF $\alpha$  sont similaires à ceux observés de l'IL-8.



**Figure 5 : Effet du conditionnement par le  $\beta$ -glucane sur les productions de TNF $\alpha$  et d'IL-8 induites par le LPS sur les monocytes porcins dans les différentes expériences.**

Les productions de TNF $\alpha$  (A) et d'IL-8 (B) sont évaluées pour les cellules conditionnées pendant 24h avec du  $\beta$ -glucane (100 $\mu$ g/ml) ou avec du RPMI. Après une période de repos de 3-4 jours, les cellules sont stimulées avec du LPS (10ng/ml).

Chaque pastille de couleur représente la médiane de l'ensemble des réplicats (n=3-4) de mesure d'échantillons provenant d'un porc (Test Wilcoxon : ns).

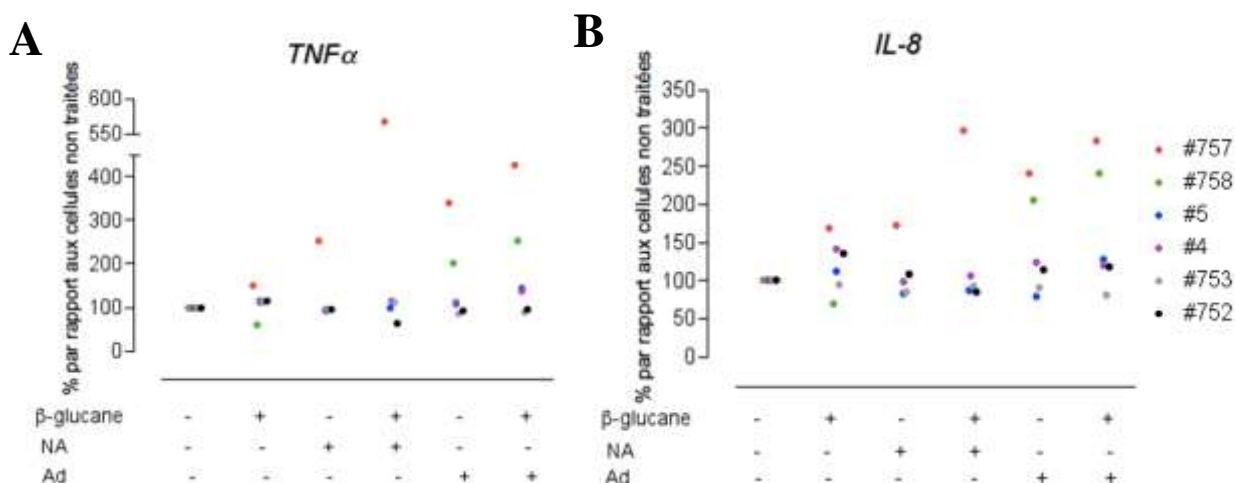
Le conditionnement par le  $\beta$ -glucane des monocytes porcins n'a pas d'effet majeur sur la production de cytokines pro-inflammatoires lors d'une restimulation avec du LPS.

### 3. Effets des catécholamines sur le conditionnement par le $\beta$ -glucane des monocytes porcins

Dans les expériences précédentes, les effets des catécholamines sur le conditionnement par le  $\beta$ -glucane des monocytes porcins ont également été évalués (Figure 6).

Pour la représentation graphique, les pourcentages présentés sont rapportés à la médiane de production de cytokines des cellules non conditionnées, non traitées avec des catécholamines et stimulées par du LPS.

Pour le porc #757, le traitement par les catécholamines induit une hausse générale de la production de cytokines après stimulation LPS. De plus, la présence de noradrénaline pendant le conditionnement par le  $\beta$ -glucane des monocytes induit une augmentation d'environ 300% de la production de  $TNF\alpha$  et de 125% de la production d'IL-8 en comparaison aux cellules non entraînées. En revanche, en présence d'adrénaline l'augmentation de la production de  $TNF\alpha$  et d'IL-8 est moindre.



**Figure 6 : Effet du conditionnement par le  $\beta$ -glucane en présence de catécholamines sur les productions de  $TNF\alpha$  et d'IL-8 induites par le LPS sur les monocytes porcins.**

Les productions de  $TNF\alpha$  (A) et d'IL-8 (B) sont évaluées pour les cellules conditionnées pendant 24h avec du  $\beta$ -glucane (100 $\mu$ g/ml) ou avec du RPMI en présence ou non de noradrénaline (NA, 10<sup>-6</sup>M) ou d'adrénaline (Ad, 10<sup>-6</sup>M). Après une période de repos de 3-4 jours, les cellules sont stimulées avec du LPS (10ng/ml). Pour chaque condition, les quantités de cytokines sont rapportés à la médiane de production de cytokines en condition non conditionnée, non traitée catécholamines et stimulée LPS.

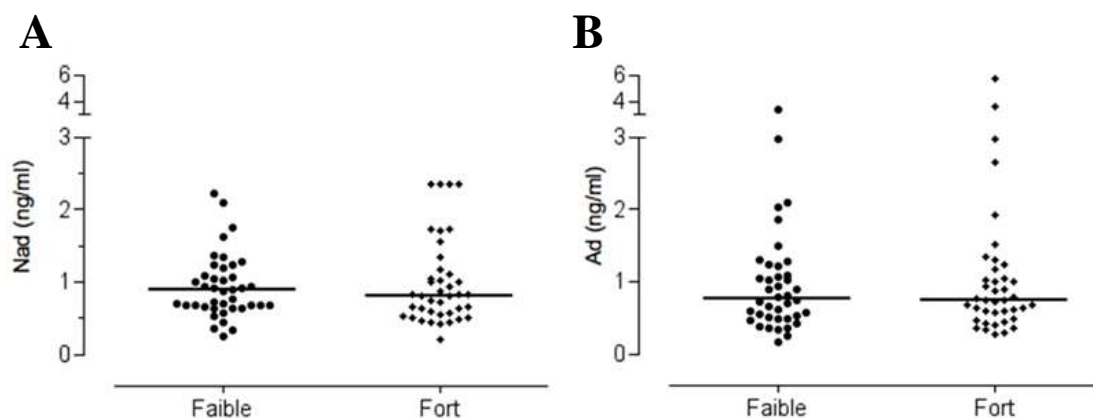
Chaque pastille de couleur représente la médiane des réplicats de mesure d'échantillons provenant d'un porc. (Test Wilcoxon : ns).

En résumé, les résultats pour le porc #757 suggèrent que la noradrénaline pourrait avoir un effet stimulant sur la sécrétion de  $TNF\alpha$  et d'IL-8 induite par le LPS sur les cellules conditionnées par le  $\beta$ -glucane. Cependant, cet effet n'a pas été reproduit dans les autres expériences utilisant des échantillons provenant de porcs différents.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats montre que le conditionnement par le  $\beta$ -glucane n'induit pas l'entraînement des monocytes porcins. Dans ces conditions, il était difficile d'analyser les effets des catécholamines sur le phénomène d'entraînement.

#### 4. Taux de catécholamines dans le plasma des porcelets avant sevrage

Les taux de noradrénaline et d'adrénaline circulantes sont évalués dans le plasma de 80 porcelets avant leur sevrage (Figure 7).



**Figure 7 : Mesure des taux de catécholamines circulantes dans le plasma de 80 porcelets avant sevrage.**

Les 80 porcelets sont répartis selon deux groupes : les « forts répondeurs » correspondant aux porcelets avec une production d'IL-8 en WBA après le sevrage la plus forte et inversement pour les « faibles répondeurs ». Les dosages de la noradrénaline (A) et l'adrénaline (B) circulantes sont réalisés sur le plasma des porcelets avant le sevrage.

Mann-Whitney : ns pour les deux mesures.

Le taux médian de noradrénaline pour le groupe « forts répondeurs » est de 0,83ng/ml, équivalent au taux médian du groupe « faibles répondeurs ». Le taux médian d'adrénaline pour le groupe « forts répondeurs » est de 0,75ng/ml, comparable au taux médian du groupe « faibles répondeurs ». En résumé, les taux de catécholamines circulantes sont similaires dans les deux groupes de porcelets.

#### 5. Dosage de l'IL-6 dans le sérum des porcelets après sevrage

La quantification des taux d'IL-6 dans le sérum des porcelets à 33 jours d'âge, soit après le sevrage est réalisée. La quantité d'IL-6 est non détectable dans la majorité des sérums des porcelets après sevrage, excepté pour 12 animaux dont 11 proviennent d'un même élevage. La quantité médiane d'IL-6 de ces 12 individus est de 138 pg/ml (données non présentées). Cet élevage fait partie des élevages choisis lors du projet Sevrobust pour ses conditions sanitaires dégradées (Buchet *et al.*, 2017). Les conditions sanitaires avaient été évaluées selon le statut sérologique et/ou clinique de l'élevage décrit dans le dernier bilan sanitaire (année n-1 du projet) vis-à-vis de la circovirose, de la grippe, du syndrome dysgénésique et respiratoire du

porc, de la pleuropneumonie et de l'iléite à *Lawsonia intracellularis*. Ainsi, les élevages positifs pour au moins 2 agents pathogènes ont été classés en condition sanitaire dégradée.

Ces animaux présentent une production d'IL-8 très élevée lors de la stimulation *in vitro* par le LPS des cellules du sang, les incluant ainsi dans le groupe des « forts répondeurs ». Les médianes des taux de noradrénaline et d'adrénaline de ces individus sont respectivement de 0,56pg/ml et de 0,54ng/ml. Ces taux médians de catécholamines sont situés en-dessous du taux médian de catécholamines des 80 porcelets. Néanmoins, nous n'observons pas de corrélation entre les taux de catécholamines plasmatiques et le taux d'IL-6 sérique lorsque celle-ci est détectée (12,5% des échantillons).

## Discussion

Dans plus de 90% des élevages intensifs, les porcs sont élevés en bâtiment sur caillebotis. Ces conditions de vie sont très stressantes pour les animaux qui sont confrontés, notamment à un sevrage précoce, des ré-allotements successifs, une surpopulation et plusieurs déplacements. Jones *et al.* ont montré que des porcelets infectés par la bactérie *Escherichia coli* entérotoxigène et soumis à un stress social ou thermique présentent une augmentation de la quantité de bactéries dans leurs fèces (2001). De plus, les performances de production des animaux (Fossum, 1998) sont également influencées par la prévalence des maladies infectieuses (revu par Lyte et Lyte, 2019). Les élevages de porcs font partie des plus gros consommateurs d'antibiotiques de la filière industrielle faisant courir un risque majeur pour la santé publique: l'émergence de bactéries multi-résistantes. Ainsi, en 2019, le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation a publié un nouveau projet national Ecoantibio2 qui poursuit l'engagement du projet Ecoantibio1. Ce projet a pour but la lutte contre l'antibiorésistance en diminuant l'exposition des animaux aux antibiotiques. Dans ce contexte, l'étude des mécanismes d'induction de l'immunité entraînée peut participer à l'amélioration de la santé animale.

Ainsi, lors de cette étude, nous avons mis en évidence une infime augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires lors de la restimulation LPS des monocytes porcins conditionnés par le  $\beta$ -glucane en comparaison aux cellules témoins. Néanmoins, cette différence de production de cytokines n'est statistiquement pas significative. Le conditionnement des monocytes porcins par le  $\beta$ -glucane n'a pas permis d'induire un processus d'entraînement des monocytes. Nous n'avons donc pas pu étudier les éventuels effets des catécholamines sur ce phénomène. Afin de pouvoir à l'avenir tester l'hypothèse de l'existence de l'immunité entraînée chez le porc et étudier l'éventuel effet des catécholamines sur ce phénomène, une amélioration de certaines étapes du protocole peut être envisagée.

Un premier point d'amélioration pourrait être d'augmenter la pureté en monocytes. En effet, dans notre étude l'enrichissement en monocytes CD14+ n'a jamais excédé 15 %. Cependant, Bekkering *et al.* (2016) qui ont utilisé la même technique de purification que nous, ne relatent qu'une contamination de 5% en cellules T, quand Repnik *et al.* (2003) annoncent eux des niveaux de pureté tous supérieurs à 50%. Ces différences de pureté pourraient s'expliquer par la densité du Percoll (1,13g/ml) utilisée, qui est celle préconisée pour les monocytes humains et n'est peut-être pas adaptée aux monocytes porcins. Afin d'optimiser le niveau de pureté en monocytes, il serait possible de tester différentes densités de Percoll. D'autres méthodes sont aussi utilisées pour l'isolement des monocytes : les travaux de Leonhardt *et al.* (2018) et de Saeed *et al.* (2014) utilisent une méthode de sélection

négative des monocytes *via* notamment la déplétion des cellules CD3+, CD19+ et CD56+ par billes magnétiques. Cette sélection permet d'obtenir une pureté proche de 90% en cellules CD14+. D'autres techniques telles que la sélection positive des cellules d'intérêt ont également été utilisées lors de l'étude de Quintin *et al.* (2012). Cependant, ces méthodes de purification n'ont pas été utilisées dans le cadre de notre étude pour des raisons de temps et de disponibilité des outils chez le porc.

Une autre piste pourrait être les agents utilisés pour l'entraînement des monocytes. Le  $\beta$ -glucane que nous avons utilisé pour le conditionnement des monocytes est un polysaccharide  $\beta$ -1,4-1,3-1,6(D)-glucane commercial, de haut poids moléculaire (100kDa), provenant du champignon *Trametes versicolor*. Cette molécule n'est peut-être pas adaptée à l'induction du processus d'entraînement des monocytes porcins. En effet, selon le type de branchement du  $\beta$ -glucane, plusieurs paramètres peuvent varier, tels que sa solubilité, sa masse moléculaire, sa structure tertiaire, sa conformation et par conséquent sa capacité à se fixer à un récepteur (revu par Volman *et al.*, 2008). Toutes ces caractéristiques influencent l'aptitude du  $\beta$ -glucane à moduler la réponse immunitaire. Par exemple, un  $\beta$ -glucane de haut poids moléculaire active directement les leucocytes, stimulant ainsi la phagocytose, la cytotoxicité des cellules ou encore leur activité antimicrobienne (revu par Brown et Gordon, 2003). Au contraire, un  $\beta$ -glucane de poids moléculaire faible ou intermédiaire, présent en particulier chez les levures, n'induit pas une activation directe des leucocytes mais leur permet d'être plus efficaces lors d'un second contact avec un agent pathogène. De façon intéressante, la majorité des études décrivant un phénomène d'entraînement des monocytes utilise le  $\beta$ -1,3-(D)-glucane provenant de la levure *C. albicans* et préparé dans le laboratoire de David. L. Williams (Müller *et al.*, 1996). Il était prévu que ce ligand soit utilisé dans le cadre de notre étude, malheureusement, le professeur David. L. Williams n'a pas pu nous le fournir dans le temps imparti à cause d'un problème de purification. Cependant, il semble que le  $\beta$ -glucane commercial que nous avons dû utiliser pour le conditionnement des monocytes porcins ne soit pas le plus efficace pour l'induction de la mémoire immunitaire innée.

D'autres réactifs pourraient être utilisés dans l'étude de la mémoire immunitaire innée, tels que le BCG (Bekkering *et al.*, 2016, Kaufmann *et al.*, 2018) ou encore *C. albicans* préalablement inactivée (Quintin *et al.*, 2012). Ceci est d'autant plus important que l'utilisation de molécules très purifiées telles que le  $\beta$ -1,3-(D)-glucane n'est pas très représentatif des conditions rencontrées par l'animal dans le milieu naturel. Par conséquent, l'utilisation de *C. albicans* inactivée pourrait permettre d'explorer d'une autre manière, l'induction de l'immunité entraînée.

Dans notre protocole, la phase de repos a été adaptée à la viabilité des monocytes porcins. En effet, les travaux de Bekkering *et al.* (2016), qui ont servi de base au développement de notre modèle d'étude, préconisaient un temps de repos de 6 jours, préalablement à une restimulation de 24h. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la viabilité des monocytes porcins semblait très diminuée au-delà de 6 jours de culture. Par conséquent, nous avons réduit la phase de repos à 3 ou 4 jours afin d'obtenir des cellules parfaitement viables.

D'ailleurs, nous aurions voulu normaliser nos productions de cytokines au nombre de cellules par puits, tel que cela a été réalisé dans certaines études. Ainsi, la production de cytokines peut être normalisée par le nombre des cellules par puits évalué par cytométrie en flux (Garcia-Valtanen *et al.*, 2017) ou par rapport à la quantité de protéines par puits (Leonhardt *et al.*, 2018). Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé plusieurs essais de normalisation sur les cultures cellulaires en fin de protocole en utilisant les dosages de la quantité d'ATP (Cell titer Glo3D, Promega) ou de la quantité d'ADN (CyQUANT Cell Proliferation Assay kit, Invitrogen ou marquage Hoechst 33342). Cependant, aucun de ces tests n'a été satisfaisant et nous n'avons finalement pas normalisé les résultats présentés d'autant plus que les modifications fonctionnelles induites par l'entraînement des monocytes pourraient biaiser une normalisation par la quantité d'ADN ou d'ATP. Ainsi, il a été montré que l'entraînement des monocytes n'induit pas uniquement une hausse de la production de cytokines pro-inflammatoires, mais également une néo-synthèse d'ADN (Cime-Castillo *et al.*, 2018) ainsi qu'un changement du métabolisme avec une modulation de la synthèse d'ATP (Cheng *et al.*, 2014).

Le premier objectif de cette étude était d'étudier l'effet des catécholamines sur la mémoire immunitaire innée des monocytes porcins. N'ayant pas pu mettre en évidence un entraînement des monocytes porcins *in vitro*, il était impossible d'étudier l'effet des catécholamines sur ce phénomène.

Le second objectif de ce travail était de voir si l'exposition des porcs à des facteurs de stress, au moment du sevrage, pouvait avoir des effets délétères sur la capacité des mêmes animaux à répondre à un agent infectieux une semaine après le sevrage. Pour cela, le dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline circulantes a été entrepris chez 80 porcelets âgés de 26 jours, soit juste avant leur sevrage. Ces porcelets ont été répartis en deux groupes, « forts répondeurs » et « faibles répondeurs », en fonction de la capacité de leurs cellules sanguines, récoltées une semaine après le sevrage, à sécréter *in vitro* de l'IL-8 en réponse à une stimulation par le LPS.

L'analyse des taux de catécholamines circulantes dans le plasma des porcelets avant le sevrage n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les individus des deux groupes. Ainsi, la capacité des porcs à répondre à un challenge infectieux après le sevrage ne semble pas dépendre du niveau de stress ressenti par les mêmes porcelets avant sevrage.

Malgré tout, il serait simpliste de résumer la compétence immunitaire d'un porc à la seule capacité de ses cellules sanguines à sécréter de l'IL-8 en réponse au LPS à un instant t. D'autre part, il serait tout autant illusoire de restreindre le niveau de stress subi par les porcelets au dosage des catécholamines circulantes à un temps donné.

C'est pourquoi, nous avons entrepris le dosage d'autres marqueurs de la compétence immunitaire des porcelets. En particulier, nous avons quantifié les niveaux d'IL-6 sérique une semaine après le sevrage des porcelets. Chez 85% des porcelets, les taux d'IL-6 sérique étaient inférieurs au seuil de détection (18,8pg/ml). Celle-ci a été détectée dans le sérum de seulement 12 animaux dont 11 appartenaient au groupe « forts répondeurs » et provenaient du même élevage aux conditions sanitaires dégradées. Ces résultats sont en accord avec la littérature, en effet, chez des porcelets non infectés, le taux d'IL-6 n'est pas quantifiable et la présence d'IL-6 dans le sérum est corrélée à la phase aiguë de l'infection (Fossum, 1998, Fossum *et al.*, 1998). Si, dans notre cas, les porcelets de l'élevage présentant un taux d'IL-6 détectable ne présentaient pas de signes cliniques évoquant un syndrome infectieux, on ne peut pas exclure qu'ils aient été en contact avec des agents pathogènes.

De façon intéressante, ces porcelets présentaient un taux de catécholamines élevé avant le sevrage. Or, il a été montré que les catécholamines n'influencent pas que la réponse immunitaire de l'hôte mais aussi directement la virulence des pathogènes favorisant alors la survenue d'infections. Ainsi, il a été démontré que l'adhérence de la bactérie *E. coli* à des explants de muqueuse intestinale était augmentée en présence de noradrénaline, et ce de manière dose dépendante (Green *et al.*, 2004). Cette observation s'explique par la présence de récepteurs aux catécholamines sur les micro-organismes. La composition du microbiote intestinal de l'hôte pourrait alors être perturbée par les catécholamines libérées lors d'un stress, favorisant la survenue d'infections des tractus gastro-intestinal et respiratoire par des pathogènes opportunistes (revu par Lyte et Lyte, 2019).

Ainsi, pour lutter contre l'émergence des maladies infectieuses dans les élevages porcins, plusieurs solutions pourraient être proposées à la filière porcine. Tout d'abord, l'amélioration des conditions de vie des animaux, en limitant le stress ressenti, pourrait contribuer à diminuer la prévalence et les conséquences des maladies infectieuses. De plus, si le concept d'immunité entraînée était validé chez le porc, la réponse immunitaire des animaux pourrait être améliorée *via* l'alimentation en introduisant des inducteurs de la mémoire



immunitaire innée. D'ailleurs, l'utilisation de  $\beta$ -glucane dans l'alimentation des porcs a montré des effets bénéfiques sur la santé des animaux (Zhou *et al.* 2013).

En conclusion, nous n'avons pas réussi, dans le temps imparti pour ce stage de Master 2, à mettre en évidence un entraînement des monocytes porcins par le  $\beta$ -glucane, ce qui ne nous a pas permis de tester l'effet des catécholamines sur ce phénomène *in vitro*. *In vivo*, nous avons choisi pour ce travail d'estimer la compétence immunitaire des porcelets par la capacité de leurs cellules sanguines à sécréter de l'IL-8 en réponse à une stimulation par le LPS, une semaine après le sevrage. Nous avons alors montré, chez 80 porcelets, qu'il n'existe pas de corrélation entre les taux de catécholamines circulantes mesurés juste avant le sevrage et la compétence immunitaire des porcs. Ainsi, des études ultérieures devront être conduites afin d'étudier l'influence des médiateurs du stress sur la mémoire immunitaire innée et d'en déduire des conséquences pratiques en élevage porcin.

## Références bibliographiques

- Arts** RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, ... Stunnenberg HG, van Crevel R, Netea MG. (2018) BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe*. 23:89-100
- Bacou** E, Haurogne K, Allard M, Mignot G, Bach JM, Herve J, Lieubeau B. (2017)  $\beta$ 2-adrenoreceptor stimulation dampens the LPS-induced M1 polarization in pig macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*. 76:169-176.
- Bekkering** S, Block AB, Joosten LAB, Riksen NP, van Crevel R, Netea MG. (2016). In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes. *Clin Vaccine Immunol*. 23: 926–933.
- Brown** GD et Gordon S. (2003) Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 19 : 311-5.
- Buchet** A, Merlot E, Mormede P, Terenina E, Lieubeau B, Mignot G, Herve J, Leblanc Maridor M, Lacoste A, Sialelli JN, Belloc C. (2018) Recherche de variables biologiques associées a la robustesse du porcelet au sevrage, Proceedings des 50emes Journées de la Recherche Porcine.
- Cheng** SC, Quintin J, Cramer RA, ... Stunnenberg HG, Xavier RJ, Netea MG. (2014) mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 26;345:1250684.
- Cime-Castillo** J, Arts RJW, Vargas-Ponce de León V, Moreno-Torres R, Hernández-Martínez S, Recio-Totoro B, Claudio-Piedras F, Netea MG, Lanz-Mendoza H. (2018) DNA Synthesis Is Activated in Mosquitoes and Human Monocytes During the Induction of Innate Immune Memory. *Front Immunol*. 30;9:2834.
- Dhabhar** F.S. (2014) Effects of stress on immune function : the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res*. 58:193-210.
- Di Luzio** NR, Williams DL. (1978) Protective effect of glucan against systemic Staphylococcus aureus septicemia in normal and leukemic mice. *Infect Immun*. 20:804-10.
- Durrant**, W. E. & Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 42, 185–209.
- Fossum** C. (1998) Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. 15 :439-44.
- Fossum** C, Watrang E, Fuxler L, Jensen KT, Wallgren P. (1998) Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6. *Vet Immunol Immunopathol*. 64:161-72.
- Garcia-Valtanen** P, Guzman-Genuino RM, Williams DL, Hayball JD, Diener KR. (2017) Evaluation of trained immunity by  $\beta$ -1, 3 (d)-glucan on murine monocytes in vitro and duration of response in vivo. *Immunol Cell Biol*. 95 :601-610.
- Green** BT, Lyte M, Chen C, Xie Y, Casey MA, Kulkarni-Narla A, Vulchanova L, Brown DR. (2004) Adrenergic modulation of Escherichia coli O157:H7 adherence to the colonic mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287 :G1238-46.
- Ifrim** DC, Quintin J, Joosten LA, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, Gow NA, Williams DL, van der Meer JW, Netea MG. (2014). *Clin Vaccine Immunol*. 21 :534-45.
- Jones** PH, Roe JM, Miller BG. (2001) Effects of stressors on immune parameters and on the faecal shedding of enterotoxigenic Escherichia coli in piglets following experimental inoculation. *Res Vet Sci*. 70 :9-17.
- Kaufmann** E, Sanz J, Dunn JL, ... Robbins CS, Barreiro LB, Divangahi M. (2018) BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*. 172:176-190.
- Kurtz** J. (2005) Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol* 26:186 –192.02.001.

- Leonhardt J**, Große S, Marx C, Siwczak F, Stengel S, Bruns T, Bauer R, Kiehntopf M, Williams DL, Wang ZQ, Mosig AS, Weis S, Bauer M, Heller R. (2018) *Candida albicans*  $\beta$ -Glucan Differentiates Human Monocytes Into a Specific Subset of Macrophages. *Front Immunol.* 9:2818.
- Levy O** et Wynn JL. (2014) A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology.* 105:136-41.
- Lyte JM** et Lyte M. (2019) Review: Microbial endocrinology: intersection of microbiology and neurobiology matters to swine health from infection to behavior. *Animal.* 26:1-10.
- Mitroulis I**, Ruppova K, Wang B, ... Hajishengallis G, Netea MG, Chavakis T. (2018) Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell.* 172:147-161.
- Müller A**, Rice PJ, Ensley HE, Coogan PS, Kalbfleish JH, Kelley JL, Love EJ, Portera CA, Ha T, Browder IW, Williams DL. (1996) Receptor binding and internalization of a water-soluble (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. *J Immunol.* 156:3418-25.
- Netea MG**, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. (2016) Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 352(6284).
- Netea MG**, Quintin J, van der Meer JW. (2011) Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* 9:355-61
- Quintin J**, Saeed S, Martens JHA, ... van der Meer JWM, Stunnenberg HG, Netea MG. (2012) *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *CellHostMicrobe.* 12:223–32.
- Repnik U**, Knezevic M, Jeras M. (2003). Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J Immunol Methods.* 278:283–292.
- Saeed S**, Quintin J, Kerstens HH, ... Logie C, Netea MG, Stunnenberg HG. (2014) Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 345:1251086.
- Saz-Leal P**, Del Fresno C, Brandi P, Martínez-Cano S, Dungan OM, Chisholm JD, Kerr WG, Sancho D. (2018) Targeting SHIP-1 in Myeloid Cells Enhances Trained Immunity and Boosts Response to Infection. *Cell rep.* 25 :1118-1126.
- Smith G**, Kleinnijenhuis J, Netea MG and Dockrell HM. (2017) Whole Blood Profiling of *Bacillus calmette-guérin*-induced Trained innate immunity in infants identifies epidermal growth Factor, il-6, Platelet-Derived growth Factor- $\alpha$ B/ BB, and natural Killer cell activation. *Frontiers in immunology.* 8: 644.
- Volman JJ**, Ramakers JD, Plat J. (2008) Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. *Physiol Behav.* 94:276-84.



## **Effets des médiateurs du stress sur la mémoire immunitaire innée des monocytes porcins**

**Solenn Gavaud**

En élevage intensif, les porcs sont confrontés à de nombreux facteurs de stress, en particulier au moment du sevrage. Le stress active les axes hypothalamo-hypophyso-surrénalien et sympatho-adréno-médullaire, libérant respectivement des glucocorticoïdes et des catécholamines : la noradrénaline et l'adrénaline. Ces médiateurs sont capables de moduler la réponse immunitaire des macrophages porcins. Ces derniers sont des acteurs majeurs de l'immunité entraînée, caractérisée par l'existence d'une réponse immunitaire plus efficace lors d'un second contact avec un agent pathogène indépendamment des lymphocytes B et T. Dans ce contexte, l'objectif était d'évaluer les mécanismes d'induction de l'immunité entraînée chez les monocytes porcins et d'étudier les effets des catécholamines sur ce processus. Ainsi, les monocytes ont été conditionnés par le  $\beta$ -glucane, cependant, cela n'a pas permis d'induire un processus d'entraînement, ni d'étudier les effets des catécholamines sur ce phénomène. Le second objectif était de voir si l'exposition des porcelets au stress, avant le sevrage, pouvait avoir des effets délétères sur la capacité des animaux à répondre à un agent infectieux après le sevrage. Nos résultats ne montrent pas de relation entre le niveau de stress ressenti et la compétence immunitaire des porcelets. En conclusion, le concept d'immunité entraînée chez le porc doit encore être prouvé.

**Mots-clés : immunité entraînée, porc, stress, monocytes, catécholamines.**