

ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE ET IMMUNOMODULATRICE D'UN EXTRAIT D'ALGUE VERTE RICHE EN POLYSACCHARIDES SULFATÉS

Mustapha Berri¹, Cindy Slugocki², Michel Olivier¹, Sébastien Holbert³, Isabelle Jaques², Emmanuelle Helloin², Henri Salmon¹, Pi Nyvall Collen⁴, Hervé Demais⁴, Matthieu Le Goff⁴

1: Equipe VIRIM, 2: CIRM-BP, 3: Equipe IMA, UMR 1282 « Infectiologie et Santé Publique » (ISP), Centre de Recherche INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France;
4: Amadéite SAS "Pôle biotechnologique" du Haut du Bois 56580 Bréhan, France



47^{èmes} Journées de la Recherche Porcine



UNIVERSITÉ FRANÇAISE DE RECHERCHE PORCINE

BOURGES

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018

2018



INTRODUCTION

L'utilisation excessive et répandue d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale a conduit au développement de souches bactériennes résistantes, et par conséquent, à une interdiction de leur utilisation à titre préventif dans les pays de l'union européenne. Des stratégies prophylactiques alternatives capables d'inhiber la croissance microbienne et de stimuler la réponse immunitaire des animaux d'élevage sont donc nécessaires. Les algues marines produisent des glucides, des protéines, des vitamines et d'autres composés qui ont des applications en industrie pharmaceutique, en cosmétique et en alimentation animale et humaine. La paroi cellulaire des algues est riche en polysaccharides sulfatés avec des propriétés antioxydantes, antivirales, antibactériennes et immunomodulatrices. Dans le cadre d'une collaboration avec la société Olmix, un extrait de polysaccharides sulfatés marins (MSP) a été préparé à partir d'algues vertes *Ulva sp.* récoltées en Bretagne (France). L'objectif de cette étude visait à évaluer l'activité antibactérienne de cet extrait contre des bactéries pathogènes ayant un impact économique important dans les systèmes d'élevage. Par ailleurs, la stimulation des médiateurs de la réponse immunitaire de l'hôte a été évaluée en utilisant un système *in vitro* de cellules épithéliales intestinales de porc (IPEC-1). Ce MSP pourrait constituer une nouvelle stratégie prophylactique pour améliorer la santé des animaux et réduire l'utilisation des antibiotiques dans les élevages.

MATERIELS ET METHODES

Préparation de l'extrait de Polysaccharides Sulfatés Marins (MSP)



Extraction et purification

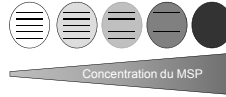


Fraction soluble de MSP

- Mise en solution dans de l'eau ultrapure ou dans du milieu de culture DMEM
- Sterilisation par filtration ou autoclavage
- Préparation de différentes concentrations

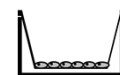
Activité antibactérienne du MSP et détermination de la valeur de la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI)

Les bactéries ont été cultivées dans un milieu approprié jusqu'à leur phase exponentielle puis testées pour leur sensibilité au MSP à l'aide de deux techniques



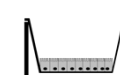
- Mesure de la croissance bactérienne en cinétique continue en milieu liquide (Bioscreen) par mesure de turbidité.
 - Méthode de culture sur milieu nutritif gélosé. Chaque bande correspond à une espèce bactérienne testée.
- Bactéries testées:
E. coli O78 (Fèces de poulet) CIRMBP-096, *E. coli* K88 (Colibacille Porcine) CIRMBP-945, *S. typhimurium* (Septicémie Bovine) CIRMBP-940, *L. monocytogenes* (Tissu de lapin) CIRMBP-711, *S. aureus* (Mammite Bovine) CIRMBP-476

Différenciation des cellules IPEC-1 et stimulation de l'expression des médiateurs de l'immunité



- 0,25x10⁵ cellules IPEC-1/cm²
- 3 jours de culture jusqu'à confluence

10-14 jours de culture
Hormone Dexaméthasone (10⁻⁷M)



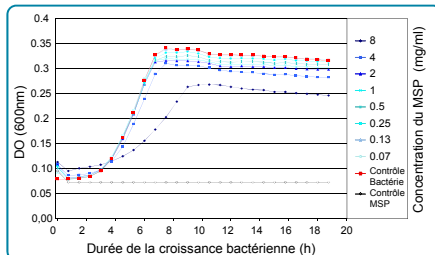
- Co-culture avec MSP à différentes concentrations
- Résistance Trans Epithéliale (RTE)
- immunohistochimie
- Observation au microscope

Analyse en RT-qPCR

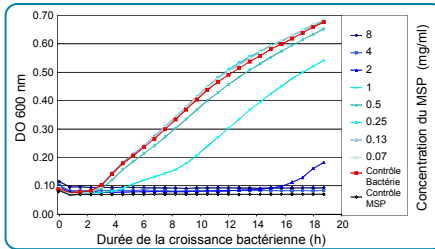
RESULTATS

LA CROISSANCE BACTÉRIENNE EST INHIBÉE PAR LE MSP

La technique du Bioscreen a montré que le MSP inhibait la croissance de *L. monocytogenes* à une concentration comprise entre 1 et 8 mg/ml.



L'addition du MSP inhibe aussi la croissance de *S. aureus*. Une inhibition totale de croissance est obtenue avec des concentrations comprises entre 4 et 8 mg/ml.

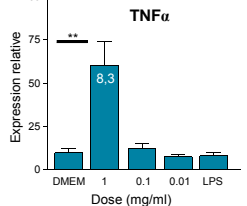
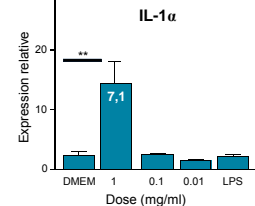
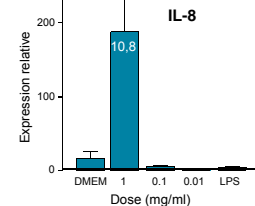
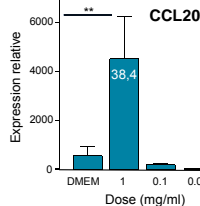


Le MSP est actif contre toutes les bactéries testées. *S. aureus* est la bactérie la plus sensible à cet effet avec une CMI de 2-4 mg/ml.

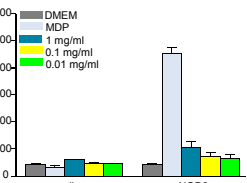
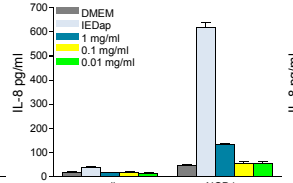
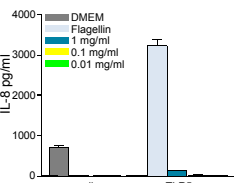
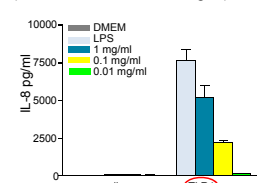
Bactéries testées	Test n°1	Test n°2	Valeur estimée de la CMI (mg/ml)
<i>E. coli</i> O78	62.2 < CMI < 125.3	31.3 < CMI < 62.5	62,4
<i>E. coli</i> K88	31.3 < CMI < 62.6	62.5 < CMI < 125	63
<i>S. typhimurium</i>	31.3 < CMI < 62.6	62.5 < CMI < 125	63
<i>L. monocytogenes</i>	31.3 < CMI < 62.6	31.3 < CMI < 62.6	31,3 < CMI < 62,6
<i>S. aureus</i>	1,9 < CMI < 3,9	1,9 < CMI < 3,9	1,9 < CMI < 3,9

L'EXTRAIT MSP INDUIT L'EXPRESSION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES INTESTINALES IPEC-1 ET PAR LES CELLULES HEK293

L'analyse en RT-qPCR a montré une augmentation de l'expression de plusieurs médiateurs de la réponse immunitaire, y compris CCL20, IL-8, IL-1 α et TNF α par les cellules IPEC-1 différenciées stimulées avec 1mg/ml de MSP (**: P<0,01).



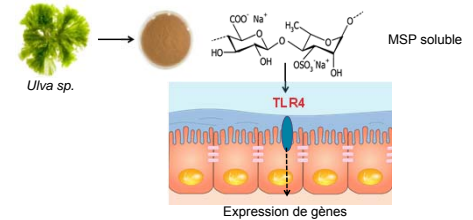
L'activité du MSP est dépendante de la présence du récepteur TLR4. Le MSP stimule la production de IL-8 par les cellules HEK293-TLR4. (Modèle HEK-PRR *In vivo*)



Principales fonctions des gènes cibles de l'immunité et leur degré de stimulation après induction avec 1mg/ml de MSP. (**: P<0,01)

Gènes	Principales fonctions	Degré de stimulation d'expression/Contrôle
IL-8	Recrutement des neutrophiles et phagocytose	10,8 **
CCL20	Recrutement des lymphocytes (L), des cellules dendritiques et activité antimicrobienne	38,4 **
TNF α	Phagocytose et chemo-attraction des neutrophiles	8,3 **
IL-1 α	Prolifération des cellules CD4+ et fibroblastes, prolifération et maturation des LB	7,1 **
IL-6	Différenciation des LT cytotoxiques, prolifération et maturation des LB et excrétion des IgA	4 **
IL-1 β	Prolifération, différenciation et apoptose, expression des molécules d'adhésion et des chimiokines	2,1 **
PPAR γ	Facteur de transcription avec fonction anti-inflammatoire, inhibition de la production de TNF α et d'IL1 β	2,4 **
IL-12p35	Production IFN- γ , différenciation des cellules Th1, activation des NK	1,8
IL-12p40	et développement des LT cytotoxiques	1,3
TGF β	Différenciation des LB, switch IgM/IgA, et induction des LT régulateurs	1,7
IL-10	Différenciation et production des plasmocytes à IgA, contrôle de la réponse inflammatoire et stimulation des LT régulateurs	1,1
CCL25	Migration et domiciliation des LT et des plasmocytes à IgA	2,2
CCL28	Migration et domiciliation des LT et des plasmocytes à IgA	1,5

Le MSP pourrait être reconnu par le récepteur intestinal TLR4 et initier l'activation d'une cascade de signalisation qui induirait l'expression d'un ensemble de gènes contrôlant les réponses humorale et cellulaire.



- Amélioration de la réponse immunitaire mucale à l'homéostasie
- Protection des muqueuses vis-à-vis des agents pathogènes
- Stimulation de la réponse immunitaire comme adjuvant dans des stratégies vaccinales

CONCLUSIONS

Cette étude a montré que l'extrait MSP présentait une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries pathogènes rencontrées dans les élevages de bovins, de volailles et de porcs. Cet extrait stimule les cellules épithéliales intestinales IPEC-1 différenciées et produisent un ensemble de facteurs immunologiques ayant un large éventail d'activités biologiques telles que i) la prolifération, la différenciation et le recrutement des cellules immunitaires, ii) la synthèse de cytokines et de chimiokines, et iii) la maturation des lymphocytes B et la production de IgA. Ainsi, cet extrait MSP peut être considéré comme un immunostimulant et utilisé comme adjuvant dans des programmes de vaccination. Cependant, les mécanismes d'action utilisés par les MSP à stimuler la réponse immunitaire des cellules épithéliales intestinales restent encore à clarifier. Par ailleurs, d'autres études sont nécessaires pour tester et montrer l'effet antibactérien et immunostimulant de cet extrait en utilisant un test *in vivo* directement sur des animaux.