2015. Journées Recherche Porcine, 47, 309-310.

L'activité antibactérienne et immunomodulatrice d'un extrait d'algue verte riche en polysaccharides sulfatés

Mustapha BERRI (1), Cindy SLUGOCKI (2), Michel OLIVIER (1), Sébastien HOLBERT (3) Emmanuelle HELLOIN (2), Isabelle JACQUES (2), Henri SALMON (1), Pi NYVALL COLLEN (4), Matthieu LE GOFF (4), Hervé DEMAIS (4)

(1) Equipe VIRIM, (2) CIRM-BP, (3) Equipe IMA, UMR ISP 1282, Centre de recherche INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France
(4) Amadéite SAS, "Pôle biotechnologique" du Haut du Bois, 56580 Bréhan, France

mberri@tours.inra.fr

Avec la collaboration technique de Marie GALLISSOT (4)

Antibacterial and immunomodulatory activities of sulfated polysaccharide-rich extract of green algae

Antibiotics have been used for a long time in pig production to protect animals against pathogens. However, EU policy has been adopted to implement a sustainable production without adding antibiotics as growth promoters. Marine algae contain in their cell wall water-soluble sulfated polysaccharides with potential biological activities such as anticoagulant, antiviral, antibacterial and immunomodulating activities that are being explored to be used as an effective alternative to antibiotics. A crude extract containing sulfated polysaccharides was prepared from the green algae *Ulva armoricana* harvested in Brittany region (France) and tested for its antibacterial activity against five strains of bacterial pathogens: *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O78 and *E. coli* K88. The obtained results showed that this extract was more effective in inhibiting the growth of *S. aureus* than those of *L. monocytogenes*, *E. coli* K88 and *E. coli* O78. Furthermore, the ability of the extract to stimulate the expression of the immune response mediators was evaluated using an *in vitro* system of porcine differentiated intestinal epithelial cells IPEC-1. Analysis by RT-qPCR showed increased expression of several cytokines including TNFα, IL-1α, IL-6, IL-8 and CCL20. This stimulation of immune response factor expression involved the activation of TLR4 receptor. These results suggest that this extract could be used as a new prophylactic strategy to stimulate the immune response of animals and to protect mucosal tissues against pathogens.

INTRODUCTION

Les antibiotiques ont été longtemps utilisés dans les élevages comme facteurs de croissance pour protéger les animaux contre les agents pathogènes. Cependant, des directives européennes ont été adoptées en vue de mettre en place des productions durables sans adjonction d'antibiotiques (Regulation (EC) No 1831/2003). Il est donc important de mettre au point des stratégies prophylactiques alternatives efficaces pour améliorer la résistance des animaux aux infections. La filière "Algues marines" suscite un intérêt croissant grâce à la qualité nutritionnelle des algues et leur richesse en molécules bioactives. La paroi cellulaire des algues marines est riche en polysaccharides sulfatés ayant des propriétés physicochimiques et des activités biologiques qui pourraient avoir des applications potentielles dans l'industrie pharmaceutique, en agriculture ou comme additifs pour l'alimentation humaine et animale (O'Sullivan *et al.,* 2010 ; Chojnacka *et al.,* 2012). Un extrait brut riche en polysaccharides sulfatés a été préparé à partir de l'algue verte, *Ulva armoricana* récoltée en Bretagne (France). Cet extrait a été testé, *in vitro*, pour évaluer son activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries pathogènes et sa capacité à stimuler l'expression de médiateurs de l'immunité en activant un récepteur membranaire de type TLR (*Toll Like Receptor*).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Composition de l'extrait

L'extrait est constitué de 11,6% de sucres neutres, 7,3% de protéines, 12,2 d'acides uroniques et 26,4% de polysaccharide sulfaté.

1.2. Analyse de l'activité antimicrobienne

L'évaluation expérimentale de l'activité antibactérienne a été effectuée sur cinq bactéries pathogènes présentes dans les élevages des animaux de rente à savoir *Salmonella typhimurium , Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O78 et *E. coli* K88.

L'analyse a été effectuée en évaluant la croissance bactérienne en présence de l'extrait marin, d'une part sur un milieu nutritif gélosé et d'autre part en mesurant cette croissance en cinétique continue en milieu liquide (Bioscreen C., Thermo Fisher Scientific, France).

Ces deux méthodes ont permis de déterminer les Concentrations Minimales d'Inhibition (CMI) de l'extrait vis-à-vis de ces cinq souches.

1.3. Analyse de la réponse immunitaire par RT-qPCR

La capacité de cet extrait à stimuler l'expression de médiateurs de l'immunité a été évaluée, par RT-qPCR, en utilisant un système de culture *in vitro* de cellules épithéliales intestinales porcines différenciées IPEC-1. Trois doses (1, 01 et 0.01 mg/ml) ont été testées en comparaison avec du LPS d'*E coli* 0111:B4 comme contrôle positif et des cellules incubées en milieu de culture seul comme contrôle négatif. Cet extrait a été aussi testé vis-à-vis de la lignée de cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 exprimant TLR4/MD2/CD14, TLR2, TLR5, TLR9, NOD1 et NOD2 afin de déterminer le récepteur TLR ou NLR impliqué en suivant, par ELISA, l'expression d'IL8 comme marqueur de stimulation. Des analyses statistiques ont été effectuées par le test Kruskal-Wallis et Bonferroni-Dunn pour une comparaison de groupes.

2. RESULTATS

L'analyse de l'activité antibactérienne par les deux techniques a montré des sensibilités différentes des bactéries vis-à-vis de l'extrait de polysaccharide. *S. aureus* (1,9 < CMI < 3,9 mg/mL) et *L. monocytogenes* (31,3 < CMI < 62,2 mg/mL) appartenant au groupe des bactéries Gram+ étaient plus sensibles à l'effet des polysaccharides sulfatés que les bactéries Gram- testées, à savoir *S.* typhimurium (CMI = 63 mg/mL), *E. coli* K88 (CMI = 63 mg/mL) et *E. coli* O78 (CMI = 62,4 mg/mL).

Tableau 1 – Activité antibactérienne de l'extrait de polysaccharides sulfatés vis-à-vis de cinq bactéries pathogènes

Bactéries testées	Valeurs de CMI en mg/ml
E. coli O78 (Fèces de poulet, CIRMBP-096)	62,4
E. coli K88 (Colibacillose Porcine, CIRMBP-945)	63
S. Typhimurium (Septicémie Bovine CIRMBP-940)	63
L. monocytogenes (Tissue de lapin, CIRMBP-711)	31,3<MIC<62,6
S. aureus (Mammite bovine, CIRMBP-476)	1,9<MIC<3,9

L'analyse par RT-qPCR a montré que l'extrait de polysaccharides sulfatés induit, à une concentration de 1 mg/ml, une augmentation de l'expression de plusieurs cytokines par les cellules intestinales IPEC-1 en comparaison avec les cellules non traitées (Tableau 2). La chimiokine CCL20 est la cytokine la plus stimulée, son expression étant augmentée de 38 fois comparativement au contrôle. Cet extrait induit aussi une augmentation de l'expression de TNFα (8,3 fois), IL-8 (10,8 fois) ainsi que de IL-1α (7,1 fois) et IL-6 (4 fois). Par ailleurs, il induit d'une façon significative mais faible (1,7 à 2,4 fois) l'expression des cytokines IL-1β, IL-12p40, TGF-β et le facteur de transcription PPAR γ.

En revanche, cet extrait ne semble pas induire l'expression d'IL-10, CCL25, CCL28 TLR2 et TLR4 (Tableau 2). Le LPS n'induit pas de stimulation de l'expression de ces médiateurs en comparaison avec l'extrait d'algue. Cet extrait a été testé vis-à-vis des cellules HEK293 exprimant différents récepteurs membranaires (TLR4/MD2/CD14, TLR2, TLR5, TLR9, NOD1 et NOD2). Les résultats obtenus montrent que la stimulation de l'expression des facteurs immunitaires passerait par l'activation du récepteur cellulaire TLR4.

Tableau 2 – Influence de l'extrait de polysaccharides sulfatés (1 mg/ml) sur l'expression des cytokines dans des cellules intestinales IPEC-1 (** : P<0,01)

Gènes des médiateurs de l'immunité testés	Degré de stimulation d'expression/Contrôle
TNFα	8,3**
IL-1α	7,1**
IL-8	10,8**
CCL20	38,4**
IL-6	4**
IL-1β	2,1**
IL-12 p40	2,0**
TGFβ	1,7**
PPAR γ	2,4**
TLR2	2,4
IL-12 p35	1,8
IL-10	1,1
CCL25	2,2
CCL28	1,5
TLR4	1,6

CONCLUSION

L'ensemble des résultats a montré que l'extrait d'algue verte riche en polysaccharides sulfatés avait une activité antibactérienne contre des agents pathogènes rencontrés dans les élevages. Il a aussi la capacité de stimuler, *in vitro*, l'expression des cytokines impliquées dans l'activation, le recrutement et la migration des lymphocytes ainsi que les cellules dendritiques pour moduler la réponse immunitaire. Cette stimulation passerait par l'activation du récepteur TLR4. Cet extrait pourrait donc être utilisé dans l'alimentation des animaux d'élevage pour inhiber la croissance de certaines bactéries et stimuler la réponse immunitaire pour augmenter la résistance des animaux aux infections et réduire l'utilisation des antibiotiques. Il pourrait aussi être utilisé comme adjuvant potentiel dans des approches de vaccination mucosale pour améliorer la réponse immunitaire de l'organisme hôte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Regulation (EC) No 1831/2003: European Union: Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition.
- O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P., Duggan P., Lawlor P.G., Hughes H., Gardiner G.E., 2010. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. Marine Drugs, 8, 2038-2064.
- Chojnacka K., Saeid A., Witkowska Z., Tuhy L., 2012. Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts - the Prospects for the Application. The Open Conference Proceedings Journal, 3, (Suppl 1-M4), 20-28.