

Ulvane, un polysaccharide sulfaté d'*Ulva armoricana*, stimule la réponse immunitaire intestinale par un mécanisme impliquant la voie de signalisation TLR4/Akt

Mustapha BERRI (1), Michel OLIVIER (1), Sébastien HOLBERT (1), Joëlle DUPONT (2), Hervé DEMAIS (3), Matthieu Le GOFF (4), Pi NYVALL COLLEN (4)

(1) ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380, Nouzilly, France

(2) UMR85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380, Nouzilly, France

(3) Biovet Conseil, 1 Route du Linès, 56700 Merlevenez, France

(4) Amadéite SAS, "Pôle biotechnologique" du Haut du Bois, 56580 Bréhan, France

mberri@tours.inra.fr

Avec la collaboration technique de Christelle Gouin (4) et le soutien financier de l'INRA et du groupe Olmix

Ulvans, sulfated polysaccharides of *Ulva armoricana*, stimulate intestinal immune response through a mechanism involving TLR4/Akt signaling pathway

The biological activities of water-soluble sulfated polysaccharides of green algae (Ulvans) are explored with the aim of their being used as bioactive molecules for human and animal health. A purified fraction of ulvans was prepared from the green algae *Ulva armoricana* harvested in the Brittany region (France) and tested for its capacity to stimulate the immune response of the gut using an *in vitro* system of porcine intestinal epithelial cells (IPEC-1). RT-qPCR and ELISA analysis showed a significant increase in mRNA and protein expression of cytokines such as CCL20, IL-8, and TNF α . By using human embryonic kidney HEK293 reporter cell lines for pattern recognition receptors, ulvan was found to stimulate mostly TLR4. We also examined this fraction's effect on different signaling pathways involved in activating cytokine gene expression. Western blot analysis of ulvan-treated HEK293-TLR4 cells showed an increase in Akt and the p65 subunit of the nuclear factor- κ B (NF κ B) phosphorylation. Inhibition of Akt phosphorylation with specific inhibitor abrogated ulvan enhancement of IL-8 secretion. The overall results showed that ulvan is an immunostimulator compound by itself, and furthermore, it could be used to encapsulate and deliver TLR ligands to relevant immune cells to strongly enhance adjuvant activity and immunity in vaccination strategies.

INTRODUCTION

La paroi cellulaire des algues marines vertes (*Ulva* et *Enteromorpha* sp.) est riche en polysaccharides sulfatés hydrophiles (ulvanes) ayant un large éventail d'activités biologiques (anti-tumorale, antiproliférative, antibactérienne, antivirale et immunomodulatrice) avec des applications potentielles en alimentation humaine et animale (Chojnacka *et al.*, 2012).

Nous avons montré récemment qu'un extrait brut de polysaccharides sulfatés marins (MSP) préparé à partir des macroalgues vertes *Ulva armoricana* récoltées en Bretagne était capable d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes et stimuler l'expression d'un ensemble de médiateurs de la réponse immunitaire intestinale, *in vitro*, en utilisant des cellules épithéliales porcines IPEC-1 différenciées (Berri *et al.* 2016).

Le but de ce travail complémentaire est **i)** de préparer et de purifier une fraction d'ulvane de faible poids moléculaire à partir d'un nouveau lot de MSP **ii)** d'évaluer sa capacité à stimuler l'expression des médiateurs de l'immunité intestinale en utilisant le modèle des cellules IPEC-1 et **iii)** d'étudier le mécanisme d'action en identifiant le récepteur et les voies de signalisation qui sont impliquées.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation et purification de la fraction ulvane

Les algues vertes *Ulva armoricana* ont été récoltées sur la plage de Plestin les Grèves en Bretagne (France) en Juin 2014. Elles ont été ensuite lavées, séchées puis congelées. Après décongélation, la phase liquide a été séparée de la biomasse et fractionnée par filtration tangentielle. Le filtrat obtenu a été lyophilisé puis broyé en poudre. Les différentes étapes de la préparation de l'extrait brut MSP, la purification et la caractérisation de la fraction d'ulvane ont été décrites précédemment (Berri *et al.* 2016). La contamination des différentes fractions avec du LPS a été évaluée en utilisant le Kit E-TOXATE (Sigma) et aucune trace de LPS n'a été détectée.

1.2. Stimulation, *in vitro*, de la réponse immunitaire intestinale et mécanismes d'action

La capacité de la fraction ulvane à stimuler l'expression de médiateurs de l'immunité (CCL20, IL-8 et TNF α) a été évaluée, par RT-qPCR et par ELISA, en utilisant le modèle cellulaire IPEC-1 (Berri *et al.* 2016). Trois doses (500, 50 et 5 μ g/ml) ont été testées en comparaison avec des cellules incubées en milieu de culture seul comme contrôle négatif. Ensuite, cette fraction a été testée 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 ligands spécifiques de chaque récepteur ont été utilisés comme contrôle positif. Par ailleurs, une analyse en western blot de l'activation des différentes MAP-Kinases, la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K/Akt) ainsi que le facteur de transcription NF- κ B a été effectuée pour déterminer la voie de signalisation impliquée. Des analyses statistiques ont été effectuées par le test Kruskal-Wallis et Bonferroni-Dunn pour une comparaison de groupes.

2. RESULTATS

La fraction d'ulvane est composée de 40,2% de sucres neutres, 32,2% d'acides uroniques, 8,3 % de groupes sulfates et 8,9% de protéines. L'analyse détaillée en sucre a montré la présence de glucose, du xylose, du mannose, du rhamnose et d'acide glucuronique. Le poids moléculaire de la fraction a été estimé par chromatographie d'exclusion à 3.2×10^3 Da.

L'analyse par RT-qPCR a montré que le traitement des IPEC-1 avec l'ulvane à une concentration de 500 μ g/ml augmente significativement l'expression de l'IL-8 (x80), TNF α (x36) et CCL20 (x65). L'analyse protéique par ELISA a montré une augmentation de la production de l'IL-8 (9,8 μ g/ml) supérieur à celle de TNF α (126 pg/ml) dans le surnageant de culture des cellules traitées.

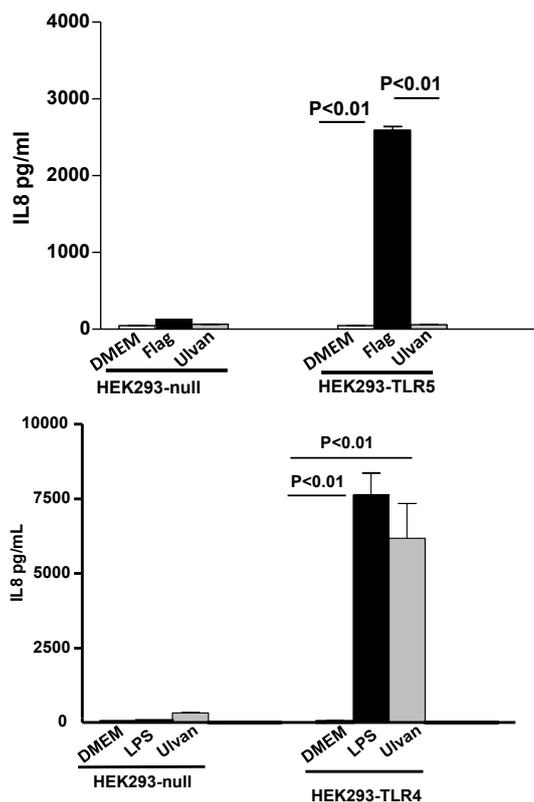


Figure 1 – Analyse de la production de l'IL-8 par les cellules HEK293-TLR4 et HE293-TLR5 après stimulation avec la fraction purifiée d'ulvane à une concentration de 500 μ g/ml. LPS et flagelline sont deux agonistes respectifs du TLR4 et du TLR5.

L'étude du mécanisme d'action en utilisant le système *in vitro* HEK293-NLR a permis de montrer que la stimulation de l'expression des facteurs immunitaires passerait par l'activation spécifique du récepteur cellulaire TLR4 comparativement au récepteur TLR5 (Figure 1).

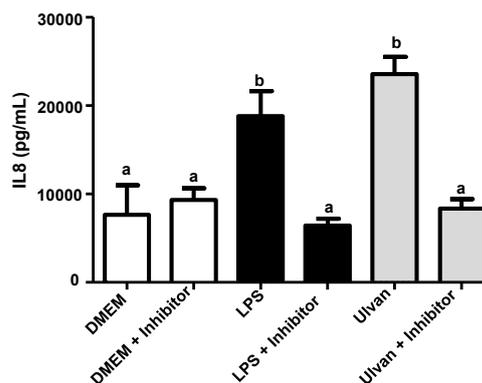


Figure 2 – L'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt sur des cellules HEK293-TLR4 par un inhibiteur pharmacologique (LY294002). a et b : des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$).

Nous avons ensuite examiné l'effet de la fraction ulvane purifiée sur l'activation des différentes protéines kinases qui sont impliquées dans l'expression des gènes de cytokines. Ainsi, les cellules HEK293-TLR4 ont été incubées avec l'ulvane (500 μ g/ml) à des temps différents (5, 10, 30 et 60 minutes), et la phosphorylation des MAPK (ERK1 / 2 et p38), d'Akt et NF- κ B a été évaluée en western Blot. L'interaction de la fraction ulvane avec TLR4 a augmenté significativement la phosphorylation de la voie Akt après 5 minutes d'incubation, comparativement aux cellules non traitées et de manière similaire aux cellules traitées par du LPS. L'implication de la voie de signalisation PI3K/Akt a été confirmée en utilisant l'inhibiteur pharmacologique LY294002 capable d'induire une diminution de 65% de la sécrétion d'IL-8 (Figure 2). Nous avons aussi montré que la fraction ulvane augmente de façon significative les niveaux de phosphorylation de la sous-unité p65, montrant ainsi l'implication du facteur de transcription NF- κ B.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* a montré que la fraction purifiée d'ulvane avait la capacité de stimuler l'expression d'un ensemble de médiateurs pour moduler la réponse immunitaire intestinale. Cette stimulation passerait par la reconnaissance du récepteur TLR4, l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et la production de facteur de transcription NF κ B. Ces données obtenues *in vitro* sont très prometteuses et montrent que cette fraction pourrait être utilisée, à la fois, comme molécule bioactive dans l'alimentation ou comme adjuvant en vaccination pour stimuler la réponse immunitaire, améliorer la résistance des animaux d'élevage aux infections et diminuer l'utilisation des antibiotiques.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Berri M., Slugocki C., Olivier M., Helloin E., Jacques I., Salmon H., Demais H., Le Gogg M., Nyvall-Collen P., 2016. Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cells. *Appl Phycol*. doi:10.1007/s10811-016-0822-7.