

REDUCTION IN VITRO DE LA REPLICATION ET DE LA DISSEMINATION DU VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK PAR DES EXTRAITS DE MACROALGUES

Frédéric Bussy ^{1,2}, Sylvie Rémy ³, Anne Morvan², Matthieu Le Goff ^{1,2}, Pi Nyvall Collén ^{1,2}, Laëtitia Trapp-Fragnet ³

¹ AMADEITE - Le Lintan - 56580 BREHAN

² OLMIX, SA - Le Lintan - 56580 BREHAN

³ INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, NOUZILLY
amorvan@olmix.com

RÉSUMÉ

La maladie de Marek (MD) est une maladie lymphoproliférative hautement contagieuse pour les poulets causée par un alphaherpesvirus, le virus de la maladie de Marek (MDV). La MD est actuellement contrôlée par la vaccination systématique des animaux, ce qui protège efficacement contre le développement de symptômes cliniques. Cependant, les vaccins contre le MDV n'empêchent pas la multiplication et la propagation des souches sauvages du MDV ce qui peut favoriser l'émergence de souches plus virulentes. Par conséquent, le MDV continue d'être un problème majeur pour l'industrie avicole et le développement de nouvelles stratégies alternatives pour contrôler le MDV est nécessaire. Il a déjà été démontré que les extraits d'algues exercent des activités immunomodulatrices et antivirales, notamment contre les herpes virus. L'objectif de la présente étude était d'explorer l'effet des extraits d'*Ulva armoricana* sur l'infection par MDV *in vitro*.

Les résultats montrent que l'extrait d'*Ulva armoricana* ainsi que sa formulation enrichie en vitamines A et D3 réduisent la charge virale d'environ 80 % 24h post-infection dans les fibroblastes de poulet infectés à des concentrations inoffensives pour les cellules. Une baisse d'environ 50% de la taille des plaques du MDV a également été observée, laissant à penser que les extraits d'*Ulva armoricana* empêchent la propagation du MDV de cellule à cellule *in vitro*. Nos données fournissent la première preuve que l'utilisation de l'extrait d'*Ulva armoricana* pourrait être une alternative pertinente pour limiter l'infection par le MDV chez la volaille.

ABSTRACT

The sulphated polysaccharides extract ulvans from *Ulva armoricana* limits Marek's disease virus dissemination *in vitro* and promotes viral reactivation in lymphoid cells

Marek's disease (MD) is a highly contagious lymphoproliferative disease of chickens caused by an alphaherpesvirus, Marek's disease virus (MDV). MD is presently controlled by systematic vaccination of animals, which protects efficiently against the development of clinical disease. However, MDV vaccines do not prevent the multiplication and spread of MDV field strains and may favor the emergence of strains with increased virulence. Therefore, MDV persists to be a major problem for the poultry industry and the development of new alternative strategies to control MDV is needed. Seaweed extracts have previously been shown to exert immunomodulatory and antiviral activities, especially against herpesviruses. The objective of the present study was to explore the effect of *Ulva armoricana* extracts on MDV infection *in vitro*.

The results show that the *Ulva armoricana* extract as well as its vitamin-enriched formulation (A and D3 vitamins) reduce the viral load by about 80% at 24h post-infection in infected chicken fibroblasts at concentrations that are innocuous for the cells. A decrease of around 50% in MDV plaque size has already been shown suggesting that *Ulva armoricana* impedes MDV cell-to-cell spread *in vitro*. Our data provide the first evidence that the use of the ulvan extract could be a good alternative to limit MDV infection in poultry.

INTRODUCTION

La maladie de Marek (MD) est une maladie hautement contagieuse chez les poulets. Elle est causée par un alpha-herpès virus (MDV) induisant un lymphome mortel. Le MDV est endémique au niveau mondial et, malgré les vaccins disponibles, continue de menacer l'industrie avicole avec des pertes économiques estimées entre 1 et 2 milliards de dollars par an (Morrow et al., 2004). La vaccination protège les animaux infectés contre le développement de tumeurs induites par le MDV, mais n'empêche pas la réplication et l'excrétion du virus dans les élevages aviaires. De plus, les vastes campagnes de vaccination mises en place depuis la fin des années 1960 ont fait évoluer progressivement le virus vers une pathogénicité supérieure lui permettant de s'affranchir de la protection offerte par les vaccins actuels. A ce jour, aucun traitement (autre que la prophylaxie vaccinale) n'est disponible pour contrôler la réplication du virus et sa dissémination dans l'environnement. Par conséquent, le développement de stratégies alternatives et durables pour contrôler le MDV est nécessaire.

Olmix a récemment démontré que la fraction de polysaccharides sulfatés purifiée à partir d'*Ulva armoricana* (UE), est capable d'activer les hétérophiles et les monocytes de poulet *in vitro* et *in vivo* (Guriec et al., 2018). Ici, nous avons testé l'action de cet extrait algal et sa version formulée (UE additionnée de Vitamines A et D3) sur la réduction cytotytique du MDV et la réactivation du MDV à partir de cellules infectées de manière latente *in vitro*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Cellules et Virus

Des fibroblastes embryonnaires de poulet (FEP) ont été préparés et maintenus en culture à partir d'embryons de Leghorn (LD1) blancs âgés de 12 jours et exempts d'agents pathogènes. L'infection des FEP a été réalisée dans des plaques à puits P6 par le virus de MD recombinant recEGFPVP22.

1.2. Traitements et analyses

Deux extraits ont été testés séparément : la version formulée Searup® (SR) et son composant algal MSP® IMMUNITY (UE). Pour chaque groupe test, une dose croissante d'extrait (0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 ml/l) a été ajoutée dans le milieu d'incubation cellulaire, le premier jour de l'essai, 1h après l'infection (pi). Le groupe contrôle n'a pas reçu de traitement dans le milieu cellulaire.

Les expériences ont duré 4 jours au total et les milieux ont été renouvelés après 48 h de culture. Des échantillons ont été prélevés pour analyse à 24, 48, 72 et 96 heures post traitement (hpt).

La réplication virale a été déterminée, sur les FEP, à partir du nombre de copies du génome du MDV et quantifiée par qPCR.

La propagation de cellule à cellule a été analysée sur les FEP par évaluation du nombre de plaques, ainsi que de la taille de celles-ci. Au moins 50 plaques de chaque traitement ont été mesurées pour l'essai (observation par l'expression de protéine fluorescente verte).

1.3 Analyses statistiques

Tous les graphiques et statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.02 (San Diego, États-Unis). Les données sont présentées sous forme de moyennes et d'erreur standard de la moyenne ($\pm$ SEM) provenant d'au moins 3 expériences indépendantes. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes doses et le test de Mann-Whitney (bilatéral) a été utilisé pour comparer les variables non paramétriques entre deux groupes. Les données sont considérées significativement différentes au seuil $\alpha=5\%$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Détection de la réplication virale

Chaque résultat provient de trois expériences indépendantes représentées sous forme de moyennes ($\pm$ ET). Les résultats ont montré que tous les traitements diminuaient significativement la réplication lytique du MDV dans les FEP de manière dose-dépendante à partir de 1 ml/l (Figure 1). L'impact est observé dès 24 hpi et se maintient dans le temps, atteignant une diminution de 89% et 94% à 96 hpi.

2.2. Détection de la propagation de cellules à cellules

Les résultats (représentés sous la forme de moyennes ($\pm$ ET) de trois expériences indépendantes) ont montré que le nombre de plaques de MDV ne différait pas selon le traitement (Figure 2.A). Cependant, une réduction respective de 2 et 3 fois la taille de la plaque de MDV lors du traitement avec les extraits algaux et leur version formulée (Figure 2 B) a été observée. Ces résultats prouvent que ces deux traitements pourraient limiter la dissémination du MDV *in vitro* dans la gamme de concentration recommandée dans les élevages avicoles (1 ml/l/24h).

2.3 Discussion

Plusieurs études ont rapporté que les extraits algaux sont capables d'inhiber directement la transcription/réplication des herpès virus alpha et gamma après internalisation virale dans la cellule hôte (Harden et al, 2009). Nos données démontrent que les

polysaccharides sulfatés d'*Ulva armoricana* limitent également la réplication du MDV dans les fibroblastes de poulet puisque la charge virale était fortement réduite alors que le nombre de plaques de MDV était similaire à celui des cellules non traitées. De plus, la réduction significative de la taille de la plaque du MDV suggère que l'extrait d'*Ulva armoricana* empêche également la propagation du MDV. Il a également été démontré que les polysaccharides sulfatés d'algues sont capables d'entraver les premiers stades de l'infection virale (adsorption/fixation et pénétration du virus) en se liant directement aux virus ou aux récepteurs viraux présents à la surface des cellules (Sun et al, 2020). Le MDV est strictement associé aux cellules et aucune particule virale extracellulaire n'est produite *in vitro*. Par conséquent, les polysaccharides sulfatés d'*Ulva armoricana* ne peuvent pas exercer une activité neutralisante directe sur les virions du MDV, mais pourraient plutôt avoir un effet sur la perméabilité cellulaire à l'infection par le MDV, ce qui réduit la propagation du MDV de cellule à cellule. Des rapports antérieurs ont en effet montré que les polysaccharides sulfatés provenant de différentes sources pourraient être de puissants inhibiteurs de la propagation cellule à cellule virale

(Aguilar-Briseno, 2015). De plus, dans notre précédente étude, il a été montré que l'extrait d'*Ulva armoricana* pouvait moduler la réponse immunitaire notamment en déclenchant l'expression d'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires (par exemple IL-1 β , IFN- α and IFN- γ) (Guriec et al, 2018). Nous ne pouvons donc pas exclure que l'extrait d'*Ulva armoricana* puisse également contrôler la dissémination du MDV grâce à la sécrétion de facteurs tels que l'IFN- α , qui s'est avéré fortement entraver le pouvoir infectieux du MDV (Levy et al, 1999).

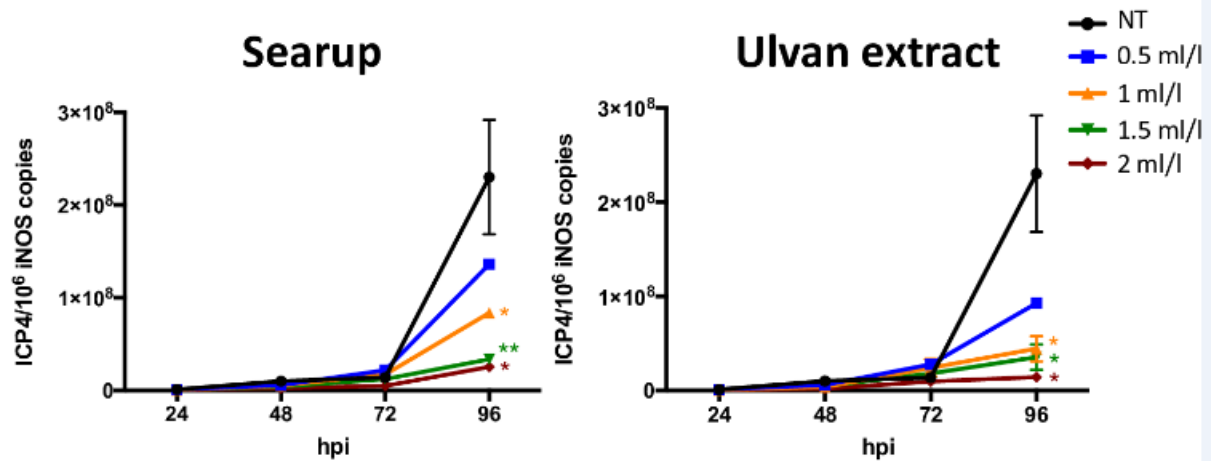
CONCLUSION

Nous avons démontré que les extraits d'*Ulva armoricana* et sa version formulée réduisent considérablement la dissémination du MDV *in vitro*, pour les cellules aviaires. Les activités anti-MDV des *Ulva armoricana* justifient cependant des recherches plus approfondies *in vivo* afin de confirmer la supposition que l'extrait d'*Ulva armoricana* puisse limiter l'infection par le MDV.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

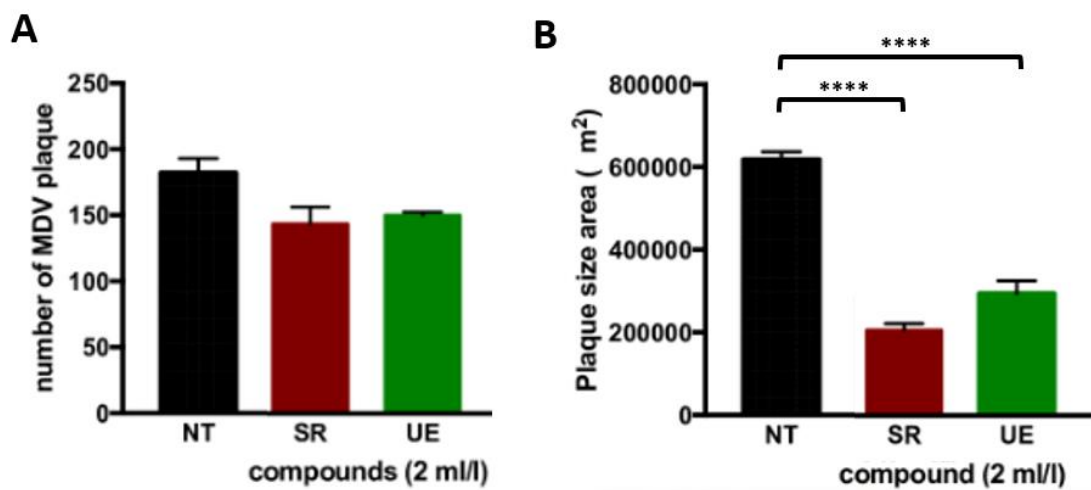
- Aguilar-Briseno JA, Cruz-Suarez LE, Sassi JF, Ricque-Marie D, Zapata-Benavides P, Mendoza-Gamboa E, et al. Sulphated polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* seaweeds both inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion, in NDV infection. *Mar Drugs*. 2015;13(2):697-712.
- Guriec N, Bussy F, Gouin C, Mathiaud O, Quero B, Le Goff M, et al. Ulvan Activates Chicken Heterophils and Monocytes Through Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4. *Front Immunol*. 2018;9:2725.
- Harden EA, Falshaw R, Carnachan SM, Kern ER, Prichard MN. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Res*. 2009;83(3):282-9.
- Levy AM, Heller ED, Leitner G, Davidson I. Effect of native chicken interferon on MDV replication. *Acta Virol*. 1999;43(2-3):121-7.
- Morrow C, Fehler F: Marek's disease: a worldwide problem. Marek's disease: an Evolving Problem. Elsevier Academic Press 2004.
- Sun QL, Li Y, Ni LQ, Li YX, Cui YS, Jiang SL, et al. Structural characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae *Sargassum henslowianum*. *Carbohydr Polym*. 2020;229:115487

Figure 1. Détection de la réplication virale *in vitro*



** p<0.05; ** p<0.005; **** p<0.0001

Figure 2. Détection de la propagation de cellules à cellules par évaluation du nombre de plaques et de leurs tailles *in vitro*



** p<0.05; ** p<0.005; **** p<0.0001