

UN EXTRAIT D'ULVA SP. STIMULE *IN VITRO* DES CELLULES DE L'IMMUNITE INNEE DE POULETS DE CHAIR

Bussy Frédérick¹, Gouin Christelle¹, Guriec Nathalie², Quero Benoit³, Le Goff
Matthieu¹, Nyvall-Collen Pi¹

¹OLMIX GROUP - ZA du Haut du Bois - 56580 BREHAN,

²UNIVERSITE de BRETAGNE OCCIDENTALE - 3 rue des archives - 29238 BREST,

³R&D Breizh – 56930 PLUMELIAU

fbussy@olmix.com

RÉSUMÉ

Avec l'augmentation de l'antibio-résistance dans le monde de plus en plus de mesures sont mises en place afin de raisonner l'utilisation d'antibiotiques. Un exemple est le plan Français Ecoantibio 2017 qui vise à réduire leur utilisation en médecine vétérinaire de 25% en 5 ans. Pour répondre à ces objectifs, différentes solutions stimulant l'immunité des animaux d'élevages sont étudiées.

Cette étude évalue l'action d'un extrait obtenu à partir d'*Ulva armoricana*, récoltée en Bretagne (France), et contenant des polysaccharides sulfatés, sur les hétérophiles et monocytes aviaires *in vitro*.

Les cellules aviaires sont purifiées à partir de sang périphérique de poulets de souche Ross 308 de 28 jours d'âge élevés en conditions standard. Le risque sanitaire a été évalué par un vétérinaire avant les prélèvements. Un suivi vétérinaire jusqu'à l'abattage a aussi été réalisé. L'extrait induit une activation statistiquement significative des hétérophiles, dose et temps dépendant ($p < 0,05$). La concentration nécessaire pour obtenir un effet maximal est de 50µg/ml, soit 5 fois supérieure à celle du LPS, activateur connu des hétérophiles. Des résultats similaires sont obtenus pour la production de NO par les monocytes.

L'extrait utilisé permet d'activer *in vitro* les hétérophiles et les monocytes, cellules clefs de l'immunité innée des poulets. Des travaux sont en cours pour identifier les mécanismes d'action de l'extrait. D'autres seront nécessaires pour évaluer son efficacité *in vivo*.

ABSTRACT

Since antibiotic resistance is still increasing worldwide, more and more measures are taken to reduce antibiotic use. One example is the French plan Ecoantibio 2017, which aims to reduce the use of antibiotics in veterinary medicine by 25% within next 5 years. This requires new strategies to be developed to stimulate broilers' immunity. In this *in vitro* study, we evaluated an extract of *Ulva armoricana* harvested in Brittany containing sulfated polysaccharides on avian heterophils and monocytes cells. Heterophils and monocytes were purified from the blood of 28 days old broilers with a Ross 308 background outbred in standard conditions. The sanitary status was evaluated by a veterinarian before blood sampling and a follow up conducted until slaughtering. Determination of the oxidative burst and the glucuronidase activity allowed to demonstrate a statistically significant ($p < 0.05$) time and dose-dependent activation of heterophils by the extract. In parallel monocytes were induced to produce NO, also in a time and concentration dependent manner. The maximal effects were obtained for a 50µg/ml concentration of the extract, that is five times more than the one required for LPS, a well-known activator of both neutrophils and monocytes. Studies are currently performed to analyze the mechanisms of action of the extract.

INTRODUCTION

L'antibio-résistance est désormais reconnue comme un problème majeur de santé publique. Dans son document de travail de 2009, la Commission Européenne a estimé que pour l'ensemble des États membres de l'Union, elle était responsable du décès de 25 000 patients chaque année. En outre, les coûts directs et indirects et les pertes annuelles de productivité induite par ce phénomène ont été évalués à 1,5 milliards d'euros. En conséquence, la France a choisi de mettre en place le plan Ecoantibio 2017 qui vise à réduire l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire de 25% en 5 ans. Parmi les pistes envisagées pour atteindre cet objectif, la stimulation de l'immunité des animaux d'élevage par des macro-algues ou des fractions apparait comme un axe majeur de recherche. En effet, un certain nombre d'études ont démontré l'intérêt de ces algues *in vitro* et *in vivo* pour les porcs et les poissons d'élevage (Castro et al., 2006 ; Isnansetyo et al., 2016 ; Leonard et al., 2011). Cependant, peu d'entre elles se sont intéressées à l'immunité des poulets de chair. Dans le cas présent, l'action d'un extrait d'*Ulva armoricana*, récoltée en Bretagne (France), et riche en polysaccharides sulfatés, a été évaluée *in vitro* sur les hétérophiles et monocytes aviaires.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Obtention des cellules

Les cellules ont été purifiées à partir de sang périphérique de poulets de souche Ross 308 de 28 jours d'âge élevés en conditions commerciales avec les mêmes programmes alimentaires et de prophylaxie. Le risque sanitaire a été évalué par un vétérinaire avant les prélèvements. Un suivi vétérinaire jusqu'à l'abattage a aussi été réalisé. Il comprenait en outre le suivi des performances zootechniques (mortalité, Gain Moyen Quotidien, Indice de Consommation) ainsi que des visites régulières dans les élevages.

Après élimination des globules rouges par centrifugation en présence de méthylcellulose, les cellules mononuclées sont obtenues par centrifugation sur un gradient discontinu d'Histopaque 1.077-1.113, comme précédemment décrit (Farnell et al., 2003). Les hétérophiles ont été lavés en DPBS, repris en RPMI-1640 puis utilisés immédiatement pour les expériences de stimulation. Comme précédemment décrit et après purification, les hétérophiles sont repris en milieu RPMI-1640 medium glucose supplémenté avec 10mM HEPES et leur viabilité contrôlée par coloration au bleu trypan. Outre un contrôle visuel, la méthode de purification a été validée par recherche par RT-qPCR des ARNm de la myéloperoxydase, de la phosphatase alcaline, de la catalase, dont l'absence est caractéristique des neutrophiles aviaires (Stewart

et al., 2013, Kaiser P. 2012). La viabilité des cellules était >95%.

Les monocytes ont été purifiés à partir de l'anneau de cellules mononuclées par adhésion au plastic et « flushing » après 2h à température ambiante des cellules non adhérentes (thrombocytes) puis cultivés en RPMI-1640 supplémenté avec 10mM HEPES (He et al., 2003 ; He et al., 2011 ; Arsenault et al. 2013).

1.2 Obtention de l'extrait

Ulva armoricana, a été récoltée en Bretagne (France). L'extrait a été obtenu notamment après rinçage, broyage et ultra-filtrations sur des membranes adaptées puis déminéralisation (brevet n°FR 12 61909). L'absence d'endotoxines a été contrôlée à l'aide d'un kit dédié (E-toxateTM, Sigma) dont le seuil de détection est de 0.01U d'endotoxines/ml). L'extrait a été dissous en PBS et les dilutions effectuées en RPMI-1640 medium glucose.

1.3. Activation des cellules

Les hétérophiles sontensemencés à une concentration de 8.10^6 cellules/ml et 100µl par puits dans une étuve à 41°C avec 5% de CO₂, (Kogut et al., 2005). Leur activation a été mise en évidence par la quantification dans les milieux conditionnés de l'activité enzymatique de la glucuronidase. Celle-ci est sécrétée lors de la dégranulation concomitante à l'activation (Genovese et al., 2013). Après incubation (4h à 41°C), l'activité enzymatique de la glucuronidase dans les milieux conditionnés est mesurée par dosage spectrophotométrique de la concentration en belliférone produite à partir d'un précurseur non fluorescent (4-méthylumbelliferyl-β-D- glucuronide, Sigma) à une concentration de 2,5mM, comme précédemment décrit (Kogut et al., 2005).

En parallèle, la mesure du burst oxydatif a été réalisée en utilisant un substrat fluorescent (diacétate dichlorofluorescéine) à une concentration finale de 10µg/ml. Les cellules sont pré-incubées 30 min avec le substrat avant l'ajout de l'extrait, comme précédemment décrit (Swaggerty et al., 2006). Ce mécanisme reflète une variation de la concentration intracellulaire en radicaux libres (ROS) induite par l'activation de l'hétérophile. Il entraîne le clivage du substrat et conduit à l'émission d'une fluorescence (Swaggerty et al., 2006). La concentration en oxyde nitrique, NO, dans les milieux conditionnés a été déterminée pour les monocytes à l'aide du réactif de Griess (He H., 2003). Toutes les expériences ont été réalisées en parallèle avec du glycogène à une concentration finale de 10 µg/ml comme témoin négatif. Le glycogène étant absent de l'extrait, il a été choisi comme témoin afin de s'assurer que la seule présence d'un polysaccharide n'entraînait pas l'activation des cellules étudiées. Le témoin positif était le LPS (Sigma) à une concentration finale de 10 µg/ml (He H., 2003 ; Farnell et al., 2003 ; St Paul et

al., 2013). Comme pour les hétérophiles, les monocytes ont été cultivés en milieu RPMI-1640 medium glucose dans une étuve à 5% de CO₂ à 41°C, comme précédemment décrit (He et al., 2003 ; He et al., 2011 ; Arsenault et al. 2013).

1.3. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées à l'aide du test ANOVA1 avec correction de Bonferroni et du logiciel PRISM (p-value fixée à 5%). Les résultats sont donnés sous la forme moyenne +/- SEM.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractéristiques de l'extrait

Le dosage des protéines par la méthode de BCA using the Micro BC Assay Kit (Interchim, France) (Smith et al. 1985) a mis en évidence une teneur moyenne de 8.9% de la matière sèche. Les acides gras sont indécélabes lors d'un dosage selon la réglementation CE152/2009, dont le seuil de sensibilité est de 0,5g/100g. Le dosage de sucres neutres selon la méthode Dubois a révélé une teneur moyenne de 40.2% (+/-0.7), celui des acides uroniques selon Blumenkrantz et al. 1973 un taux moyen de 32.2% (+/-0.8). Les groupements sulfates liés aux sucres représentent quant à eux en moyenne 8.3% (+/-0.3), par quantification par la méthode de l'azure A (Jaques et al. 1968). L'analyse de la composition mono-saccharidique a été réalisée par chromatographie gazeuse de dérivés triméthylsilyl après méthanolyse acide pendant 4h dans 3 ML⁻¹ de MeOH/HCl à 100 °C par la méthode de Montreuil et al. (1986). L'analyse indique que l'extrait de polysaccharides sulfatés obtenu comprenait essentiellement du rhamnose, du xylose, les acides iduronique et glucuronique, composants classiquement présents dans l'ulvan. L'analyse par RMN proton de l'extrait montre un profil très proche de celui obtenu avec un ulvan traité par l'acide et valide la présence dans l'échantillon d'oligosaccharides avec une structure de type ulvan majoritaire.

2.2. Activation des hétérophiles

Les hétérophiles sont les équivalents des neutrophiles des mammifères. Ils constituent la première ligne de défense contre les infections microbiennes.

L'extrait induit une libération de glucuronidase par les hétérophiles, tout comme le LPS (témoin positif) et contrairement au glycogène (témoin négatif). Cette sécrétion est dose et temps dépendant, avec un maximum à t=3h après la mise en contact avec

l'extrait, pour des concentrations de l'extrait 50µg/ml, soit 5 fois supérieure à celle du LPS (figure 1A). La glucuronidase dégrade l'acide glucuronique présent dans la paroi et la membrane plasmique des bactéries, ce qui réduit leurs capacités de survie (Genovese et al. 2013 ; Stewart et al. 2013). De plus, cette réponse à l'extrait s'accompagne d'un burst oxydatif des hétérophiles, comme en témoigne la libération de fluorescéine (figure 1B).

2.3. Monocytes

Le monocyte est la seconde famille d'acteurs intervenant dans l'immunité innée, de par sa capacité à produire du NO à activité bactéricide. L'extrait provoque une sécrétion statistiquement significative de NO par les monocytes. Comme pour les hétérophiles, le phénomène est dose et temps dépendant et l'effet maximal est obtenu pour une concentration de 50µg/ml (figure 2).

CONCLUSION

L'extrait contenant des polysaccharides sulfatés marin (MSP) permet d'activer en quelques heures *in vitro* les hétérophiles et les monocytes, cellules clefs de l'immunité innée des poulets. Des travaux sont en cours pour identifier les mécanismes d'action impliqués à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'extrait ayant été inclus dans un produit commercialisé (Searup®) qui s'avère améliorer les performances zootechniques en élevage (Bussy et al. 2015a ; Bussy et al. 2015b).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arsenault R.J., Kogut M.H., He H. 2013. Cellular Signalling (25) 2246–2254.
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973. Anal. Biochem. (54) 484-489.
- Bussy F., Migné C., Quéro B., Le Goff M. 2015. JRA Proceedings (11) 262-266.
- Bussy F., Migné C., Quéro B., Le Goff M. 2015. WPAC Proceedings (19) 1010.
- Castro R., Piazzon, M.C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., Lamas J., 2006. Aquacult. (254) 9-20.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F., 1956. Anal. Chem. (28) 350-356.
- Farnell M.B., Crippen T.L., He H., Swaggerty C. L., Kogut M.H., 2003. Dev. Comp. Immunol. (27) 423-429.
- Genovese K.J., He H., Swaggerty C.L., Kogut M.H. 2013. Dev. Comp. Immunol. (41) 334–340
- He H., Crippen T.L., Farnell M.B., Kogut M.H. 2003. Dev. Comp. Immunol. (27) 621-627.
- He H., MacKinnon K.M., Genovese K.J, Kogut M.H. 2011. Innate immunity (17) 137-144.
- Isnansetyo, A., Fikriyah, A., Kasanah, N., Murwantoko, 2016. Aquacult. Int. (24) 465-477.
- Kaiser P., 2012. Avian pathology (41) 511-518.
- Kogut M, He H. 2005. Animal Biotechnology, (16) 165–181.
- Leonard, S.G., Sweeney, T., Bahar, B., O'Doherty, J.V., 2011. J Anim Sci. (90) 505-514.
- Stewart C., Keyburn A.L., Deffrasnes C, Tompkins S.M. 2013. Comp. Dev. Immunol. (40) 463-498.
- Swaggerty C., He H., Genovese K.J., Kaiser P., Pevzner I. Y., Kogut M.M. 2006. Avian Pathol. (35) 465-470.
- St Paul M., Brisbin J.T., Addul-Careem M.F., Sharif S. 2013. Vet. Immunol. Immunopath. (152) 191-199.

Figure 1. Activation des hétérophiles par l'extrait (MSP). Chaque point représente la moyenne $\pm$ SEM de 5 répétitions. * signifie $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. A : Mesure de l'activité enzymatique de la glucuronidase par dosage spectrophotométrique de la concentration en belliferone après incubation des milieux conditionnés 4h à 41°C. B : Mesure du burst oxydatif. Les cellules sont incubées avec un précurseur non fluorescent et la variation de fluorescence de la fluorescéine libérée mesurée par spectrophotométrie.

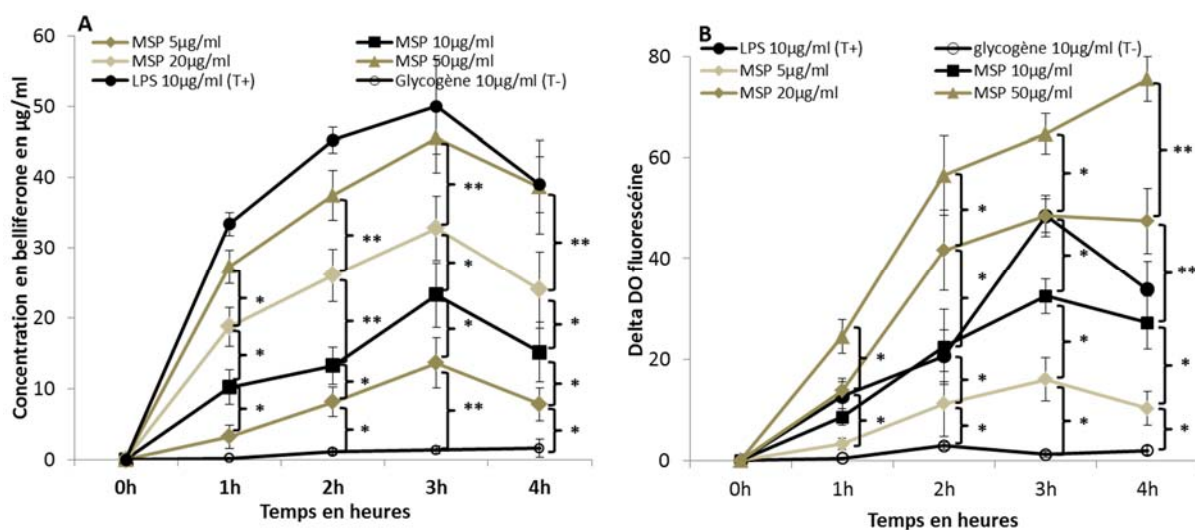


Figure 2. Sécrétion de NO par les monocytes incubés en présence du MSP. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SEM de 5 expériences indépendantes. * signifie $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Le dosage des NO est réalisé avec du réactif de Griess.

