

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 F-56700 Merlevenez, France

(4) Amadéite SAS "Pôle biotechnologique" du Haut du Bois F-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, IL8, 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 adjuvanticity 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