



## Biotechnologie marine

# Les algues vertes, l'alternative aux antibiotiques qui stimule la réponse immunitaire

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 (1). Il est donc important de disposer de stratégies prophylactiques alternatives efficaces pour améliorer la résistance des animaux aux infections.

### FILIÈRE DU FUTUR

La filière des algues marines suscite un intérêt croissant de par la qualité nutritionnelle et la richesse en molécules bioactives de ces organismes, eucaryotes pour la plupart et procaryotes dans le cas des cyanobactéries. Les algues peuvent être soit unicellulaires (microalgues), soit multicellulaires (macroalgues). Ces dernières sont divisées en trois lignées évolutives : les algues vertes, les algues rouges et les algues brunes. Leur différence d'évolution leur confère une très grande diversité, à la fois phénotypique – leur taille varie de quelques millimètres à 70 mètres – et métabolique.

Les macroalgues renferment une richesse de molécules diverses et spécifiques. Du point de vue de leur composition, la plupart d'entre elles sont constituées de glucides dits « pariétaux<sup>\*1</sup> » – essentiellement des polysaccharides –, de protéines, de minéraux de nature infiniment variée, de lipides,

Dans le cadre d'un partenariat avec le groupe Olmix, des chercheurs de l'Inra ont montré qu'un extrait d'algues vertes inhibe *in vitro* la croissance de bactéries pathogènes et stimule la production de médiateurs de l'immunité par des cellules épithéliales intestinales. Prometteurs, ces résultats préliminaires montrent qu'une telle préparation pourrait être utilisée dans l'alimentation des animaux d'élevage pour améliorer leur robustesse face aux infections et ainsi réduire l'utilisation des antibiotiques.

de vitamines et de pigments. La nature des polysaccharides sulfatés marins (PSM) qui constituent les parois cellulaires varie selon la famille d'algues considérée. Ce sont majoritairement des alginate dans les algues brunes, des carraghénanes et des agars dans les algues rouges, et des ulvanes dans les algues vertes. Leur contribution s'étend entre 4 % et 76 % du poids sec (2).

La particularité des PSM réside dans leur complexité : ils peuvent être ramifiés, par opposition aux polysaccharides linéaires comme la cellulose. Ils sont constitués d'unités saccharidiques variées (acides uroniques, xylose, fucose), contrairement aux homo-polysaccharides comme l'amidon, qui est constitué uniquement de glucose. De plus, ils peuvent contenir des glucides rares, du rhamnose par exemple. Enfin, certains de leurs glucides peuvent être sulfatés, une caractéristique essentielle pour leur activité biologique. L'ensemble de ces paramètres indique une similitude phylogénique avec les polysaccharides du règne animal, l'héparine notamment. Ce qui explique leurs activités biologiques uniques pour des organismes photosynthétiques. Par ailleurs, les PSM présentent une très grande variabilité de fonctions et de structures selon la nature des glucides qui les composent, de la répétition des motifs oligosaccharidiques dans le polysaccharide, de la nature de leurs liaisons oligosaccharidiques, de leur niveau de ramification, de leur poids moléculaire ou encore de leur degré de sulfatation. De nombreux PSM ayant des activités biologiques distinctes peuvent ainsi

Mustapha Berri<sup>1</sup>  
et Pi Nyvall Collen<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>UMR 1282 Infectiologie  
et santé publique,  
Inra, Université de Tours,  
Nouzilly  
<sup>2</sup>Olmix,  
Bréhan

\*1 Qui forment leur enveloppe externe



Préparation de MSP, un extrait d'algues aux propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrice.

© OLMIX

être trouvés dans les macroalgues. Des publications de plus en plus nombreuses mettent en avant les propriétés biologiques uniques de ces polysaccharides (anti-infectieuses, antioxydantes, antitumorales, modulatrices de la réponse immunitaire...), qui trouvent des applications dans les domaines de la santé animale, végétale et humaine (3).

améliorer la santé des animaux d'élevage et permettre ainsi de réduire l'utilisation d'antibiotiques, face auxquels les agents pathogènes opposent de plus en plus de résistance.

Des algues vertes du genre *Ulva* sp. ont été collectées sur la plage bretonne de Plestin-les-Grèves,

en juin 2012. L'extrait initial de MSP contenait 30,6 % de cendres correspondant à la matière minérale et 69,4 % de matière organique, composée principalement de carbohydrates et de protéines. Une étape d'ultrafiltration, visant à éliminer les sels, a permis d'améliorer la teneur en sucres, dont

## UN PSM À L'ESSAI

Dans le cadre d'un partenariat de recherche entre le groupe Olmix et l'Inra Centre Val de Loire, un PSM de faible poids moléculaire a été préparé à partir de l'algue verte *Ulva americana*, récoltée en Bretagne. Cet extrait, sobrement nommé « MSP » – pour Marine Sulfated Polysaccharides, la version anglophone de PSM –, a été testé *in vitro* pour évaluer son activité antimicrobienne vis-à-vis d'un large panel de souches d'agents pathogènes isolés chez des animaux d'élevage. Par ailleurs, la stimulation des médiateurs de la réponse immunitaire au niveau intestinal de l'hôte a été évaluée en utilisant des cellules IPEC1<sup>92</sup>, une lignée cellulaire épithéliale intestinale porcine (4). Utilisé comme additif alimentaire, le MSP pourrait constituer une nouvelle stratégie prophylactique pour

<sup>92</sup> Intestinal Porcine Epithelial Cells

Composition	Extrait brut MSP
<b>Globale (%)</b>	
Cendres	30,6 ± 0,1
Sucres neutres	11,6 ± 1,6
Protéines	7,3 ± 1,1
Acides uroniques	12,2 ± 3,5
Groupes sulfates	3,6 ± 1,5
<b>Sucres (%)</b>	
Arabinose	n.d.
Galactose	n.d.
Glucose	n.d.
Xylose	n.d.
Manose	n.d.
Rhamnose	n.d.
Acide glucuronique	n.d.
<b>Composition élémentaire (%)</b>	
C	20,58 ± 0,03
H	4,44 ± 0,02
N	1,62 ± 0,11
O	39,06 ± 0,10
S	3,69 ± 0,03
<b>Poids moléculaire</b>	
Pm (Da)	n.d.
Mn (Da)	n.d.
Ip (Mw/Mn)	n.d.

## Composition de l'extrait MSP

Les valeurs sont exprimées en % du poids sec.  
Pm : poids moléculaire en masse ;  
Da : Dalton ;  
Pn : poids moléculaire en fonction du nombre de chaînes ;  
Ip (=Pm/Pn) : indice de polydispersité, donne un aperçu de l'hétérogénéité d'un échantillon dont toutes les molécules ont la même taille.



Sensibilité des bactéries  
au MSP évaluée par  
les valeurs de la CMI

Numéro	Souches	CMI (mg/mL)
2	<i>Pasteurella multocida subsp septica</i>	0,156
3	<i>P. multocida subsp gallicida</i>	0,391
5	<i>Manheimia haemolytica</i>	0,391
1	<i>P. multocida</i>	1,56
4	<i>P. multocida subsp multocida</i>	3,125
6	<i>M. haemolytica</i>	3,125
7	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	3,125
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,125
9	<i>S. aureus</i>	3,125
10	<i>S. aureus</i>	3,125
11	<i>S. aureus</i>	3,125
13	<i>Streptococcus suis</i>	6,25
20	<i>Enterococcus cecorum</i>	25
12	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	50
16	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	50
17	<i>S. dysgalactiae</i>	50
18	<i>S. dysgalactiae</i>	50
19	<i>S. dysgalactiae</i>	50
21	<i>Corynebacterium bovis</i>	50
25	<i>Trueperella pyogenes</i>	50
26	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	> 50
22	<i>Listeria monocytogenes</i>	> 50
23	<i>L. monocytogenes</i>	> 50
24	<i>L. monocytogenes</i>	> 50
14	<i>Streptococcus uberis</i>	> 50
15	<i>S. uberis</i>	> 50
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 50
28	<i>Serratia marcescens</i>	> 50
29	<i>Salmonella ser. Enteritidis</i>	> 50
30	<i>S. ser. Typhimurium</i>	> 50
31	<i>S. ser.Hadar</i>	> 50
32	<i>S. ser.Infantis</i>	> 50
33	<i>S. ser.Virchow</i>	> 50
34	<i>Escherichia coli O2</i>	> 50
35	<i>E. coli O1</i>	> 50
36	<i>E. coli CS31A</i>	> 50
37	<i>E. coli K99</i>	> 50
38	<i>E. coli K85</i>	> 50
39	<i>E. coli F17</i>	> 50
40	<i>E. coli K88 (F4)</i>	> 50
41	<i>E. coli O78K80</i>	> 50
42	<i>E. coli O78K80</i>	> 50

l'analyse a montré la présence de résidus de rhamnose, de xylose, d'acide glucuronique, ainsi que de groupes sulfatés, une caractéristique des polysaccharides isolés des algues vertes ulvanes (tableau p. 51).

## MSP INHIBE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES PATHOGENES...

L'activité antimicrobienne de l'extrait MSP a été étudiée contre 42 souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives (tableau ci-contre), isolées à partir de prélèvements biologiques d'animaux d'élevage infectés entre 2007 et 2014 dans les régions Centre, Bretagne et pays de Loire (4). Cette activité a été déterminée par un système d'inoculation multipoint – dans de la gélose et à différentes concentrations – qui permettait de tester 20 souches en même temps. La sensibilité des bactéries à l'extrait a, elle, été évaluée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la concentration la plus faible nécessaire pour inhiber totalement la croissance des micro-organismes testés après 24 heures d'incubation.

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que le MSP est capable d'inhiber sélectivement la croissance des micro-organismes testés avec des valeurs de CMI variant de 0,156 à 50 mg/ml (tableau p. 51). Les bactéries Gram-positives, tout comme les bactéries Gram-négatives ont été sensibles à l'action du polysaccharide. *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Mannheimia haemolytica*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus suis* et les souches d'*Enterococcus cecorum* se sont révélées être les bactéries les plus sensibles à l'exposition au MSP. L'action de ce dernier est, cependant, différente entre des espèces appartenant au même genre bactérien. *Streptococcus chromogenes*, *S. uberis* et *S. dysgalactiae* y sont, en effet, moins sensibles que *S. suis*. Par ailleurs, le MSP semble présenter une activité antibactérienne limitée vis-à-vis des bactéries des genres *Salmonella* et *Listeria*, ainsi que d'*Escherichia coli*.

À l'inverse, les résultats obtenus *in vitro* dans cette étude montrent que le MSP inhibe la croissance



Gènes	Degré d'expression	Significativité
TNF $\alpha$	82,63 $\pm$ 15,79	P < 0,01
IL1 $\alpha$	22,96 $\pm$ 3,16	P < 0,01
IL8	313,53 $\pm$ 47,54	P < 0,01
CCL20	159,44 $\pm$ 42,52	P < 0,01
IL6	30,58 $\pm$ 7,03	P < 0,01
IL1 $\alpha$	4,92 $\pm$ 1,63	P < 0,01
IL12p40	3,88 $\pm$ 0,66	P < 0,01
TGF $\beta$	4,83 $\pm$ 0,66	P < 0,01
PPAR $\gamma$	3,71 $\pm$ 0,78	P < 0,01
IL12p35	4,19 $\pm$ 0,63	NS
IL10	2,54 $\pm$ 0,61	NS
CCL25	6,20 $\pm$ 2,47	NS
CCL28	3,24 $\pm$ 1,11	NS
TLR2	11,29 $\pm$ 1,66	P < 0,01
TLR4	3,24 $\pm$ 0,54	NS

◀ Stimulation *in vitro* de l'expression des médiateurs de l'immunité intestinale

d'agents pathogènes responsables de troubles respiratoires, digestifs et de la reproduction des animaux de rente conduisant très fréquemment à des pertes économiques dans les élevages (5). Le mécanisme exact de cette activité antibactérienne reste cependant encore inconnu. D'autres études sont, par conséquent, nécessaires pour clarifier l'action du MSP.

## ... ET STIMULE L'EXPRESSION DES MÉDIATEURS DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE PAR DES CELLULES INTESTINALES

L'activité biologique de ce PSM macroalgale a également été étudiée en testant sa capacité à stimuler la réponse immunitaire de l'hôte, à l'aide d'un système *in vitro* de cellules épithéliales polarisées d'intestin de porc (IPEC1). Après 4 heures de mise en contact de ces cellules avec 1, 0,1 et 0,01 mg/ml de MSP, la quantification relative de l'expression de l'ARN messager (ARNm) d'un panel de médiateurs de la réponse immunitaire a été analysée par RT-qPCR. Le traitement des cellules polarisées IPEC1 avec MSP induit la régulation des ARNm d'une large gamme de cytokines telles que l'interleukine 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ), IL1 $\beta$ , IL6, IL8 et le TNF $\alpha$  (tableau ci-dessus). Ces résultats suggèrent que MSP pourrait activer les cellules épithéliales intestinales pour que celles-ci

produisent des cytokines de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, lesquelles vont initier et amplifier les réponses immunitaires protectrices de l'hôte et réguler ainsi l'immunité mucoale contre les agents pathogènes intestinaux (6). Par ailleurs, l'expression de la chimiokine CCL20 (MIP3 $\alpha$ ) – dont l'interaction avec son récepteur, CCR6, est impliquée dans le recrutement de cellules dendritiques, des cellules B et T, et dans la régulation de l'immunité intestinale à l'homéostasie ou dans des conditions inflammatoires (7) – est également fortement régulée par le MSP. Celui-ci induit également une accumulation de l'ARNm de TGF $\beta$  suggérant que cet extrait pourrait participer efficacement à la réponse immunitaire humorale à immunoglobulines A et au processus anti-inflammatoire dans l'intestin (8). Le MSP stimule aussi l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$ , un facteur de transcription impliqué à la fois dans l'inhibition de l'expression des cytokines inflammatoires et la différenciation des cellules du système immunitaire vers des phénotypes anti-inflammatoires (9). Ces résultats *in vitro* sont comparables à ceux d'études précédentes qui ont montré que les polysaccharides sulfatés dérivés d'algues ont une activité immunomodulatrice capable de stimuler la réponse immunitaire et de contrôler le processus inflammatoire (10). Cependant, le récepteur reconnu par cet extrait sur la

cellule épithéliale intestinale ainsi que le mécanisme d'action restent encore à découvrir.

## LA FIN DES ANTIBIOTIQUES ?

L'ensemble des résultats de l'étude de l'Inra montre que l'extrait d'algue verte riche en polysaccharides sulfatés a une activité contre des agents pathogènes bactériens 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 et des cellules dendritiques pour moduler la réponse immunitaire. Cet extrait pourrait donc être utilisé dans l'alimentation des animaux d'élevage pour inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes et stimuler la réponse immunitaire des animaux hôtes. Très prometteurs, ces résultats *in vitro* préliminaires doivent cependant être confirmés par des essais *in vivo*, directement sur l'animal cible. Ceci permettra de s'assurer que l'administration de ces extraits algaux par voie orale produira des effets bénéfiques, sans perturbation du fonctionnement normal du tube digestif, en garantissant une croissance normale des animaux et leur bien-être. De telles méthodes d'appoint pourraient réduire l'incidence de situations nécessitant des approches thérapeutiques, donc, potentiellement, l'usage d'antibiotiques. ■

- (1) Règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux  
[tinyurl.com/CE-add-alim-anim2003](http://tinyurl.com/CE-add-alim-anim2003)
- (2) Lahaye M, Robic A (2007) *Biomacromolécules* 8, 1765-74
- (3) Rioux LE et al. (2007) *Carbohydrate Polymers* 69, 530-7
- (4) Berri M et al. (2016) *J Appl Physiol*, doi:10.1007/s10811-016-0822-7
- (5) Economou V, Gousia P (2015) *Infection and Drug Resistance* 8, 49-61
- (6) Oswald IP (2006) *Vet Res* 37, 359-68
- (7) Williams IR (2006) *Ann N Y Acad Sci* 1072, 52-61
- (8) Stavnezer J, Kang J (2009) *J Immunol* 182, 5-7
- (9) Tyagi S et al. (2011) *J Adv Pharm Technol Res* 2, 236-40
- (10) Chen D et al. (2008) *Panminerva Med* 50, 177-183