

NOUVELLES APPROCHES POUR COMBATTRE LA MAMMITE

Pierre LACASSE, Ph.D
Chercheur scientifique
Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc (CRDBLP)
Agriculture et Agroalimentaire Canada
Lennoxville (Québec)

Conférence préparé en collaboration avec :

Moussa SORRY DIARRA, Ph.D
Chercheur associé, CRDBLP

Brian TALBOT, Ph.D.
Professeur, Département de biologie, Université de Sherbrooke

Éric BROUILLETTE, M.Sc.
Assistant de recherche, Département de biologie, Université de Sherbrooke

Denis PETITCLERC, Ph.D., MBA
Chercheur scientifique, CRDBLP



INTRODUCTION

Le procès de la mammite n'est plus à faire ! Malgré tous les progrès en gestion laitière et en thérapie antimicrobienne, l'incidence annuelle de la mammite clinique est toujours de 20 à 40 % et elle représente la principale cause d'utilisation des antibiotiques chez la vache. La mammite est un problème croissant qui coûte, selon les estimations, entre 200 et 365 millions \$ par an à l'industrie laitière canadienne. Ce coût est attribué à la réduction de la production laitière, aux traitements, aux frais vétérinaires et à la réforme prématurée. Une portion importante de ce coût est due à la diminution de la production laitière associée à la forme sous-clinique de cette maladie. Le taux de réforme lié à la mammite est en constante augmentation depuis les 15 dernières années, passant de 6,5 % en 1984 à 14,5 % en 1999 (Monardes *et al.*, 2000). En 1999, la mammite était la deuxième cause de réforme au Québec.

L'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter les mammites a fait qu'on se retrouve de plus en plus en présence de pathogènes qui sont moins sensibles à leurs effets. Bien que de nombreux pathogènes soient impliqués dans cette maladie, *Staphylococcus aureus* est devenu, depuis le début des années 1980, le pathogène mammaire le plus fréquent, présent dans plus de 90 % des troupeaux laitiers (Bouchard *et al.*, 1996). Les infections causées par cette bactérie sont difficiles à guérir et l'efficacité des traitements antibiotiques traditionnels est très faible. En fait, des données récentes montrent que le taux de guérison de vaches infectées avec cette bactérie est de 49 % quand on utilise des antibiotiques et de 43 % sans eux (Wilson *et al.*, 1998).

La pénicilline et les autres antibiotiques de la famille des β -lactames demeurent nos meilleures armes contre les staphylocoques. Malheureusement, de plus en plus de pathogènes sont capables de produire une enzyme,

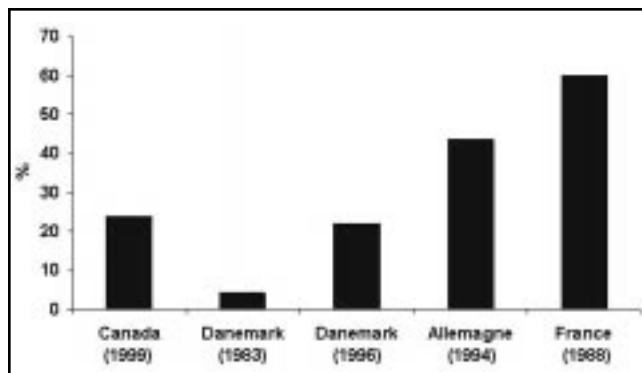
appelée β -lactamase, qui rend inactifs les antibiotiques de la famille des β -lactames et confère une résistance aux bactéries. Dans certains pays européens, plus de 60 % des *S. aureus* isolés lors de cas de mammite bovine peuvent produire cette enzyme (Guérin-Faubleé et Brun, 1999 ; Figure 1). Il devient donc impératif de développer de nouvelles stratégies afin de réduire notre dépendance envers les antibiotiques et éviter de nous retrouver face à des pathogènes résistants à tous les traitements disponibles.

UNE NOUVELLE APPROCHE UTILISANT LA LACTOFERRINE ET LA LACTOFERRICINE BOVINE

Nos travaux de recherche explorent de nouvelles approches pour combattre *S. aureus*. Pour causer la mammite, un pathogène doit d'abord survivre à une première ligne de défenses non spécifiques. La lactoferrine est un joueur important de cette première ligne. Cette protéine est produite de façon naturelle par les cellules d'une glande mammaire en lactation. C'est la principale protéine du petit lait chez l'humain (1-6 g/l) et elle est aussi présente dans le lait de vache, bien qu'à des concentrations très inférieures (0,01-0,2 g/l). Cette protéine semble avoir plusieurs fonctions biologiques. C'est, entre autres, un antibactérien et un anti-inflammatoire. L'effet le plus connu de la lactoferrine est d'immobiliser le fer, un élément essentiel à la croissance microbienne (Nuijens *et al.*, 1996). Le fer est donc peu disponible et la croissance bactérienne dans le lait est ralentie. Au départ, le caractère antimicrobien de la lactoferrine était attribué exclusivement à sa capacité d'immobiliser le fer. Toutefois, un fragment de la lactoferrine, qui ne peut à lui seul s'attacher au fer, s'est récemment avéré être un antimicrobien plus puissant (de 10 à 100 fois) que la lactoferrine elle-même (Bellamy *et al.*, 1992). Ce peptide, appelé lactoferricine, est produit naturellement dans le système digestif des mammifères lors de la digestion de la lactoferrine du lait.

Nous avons étudié *in vitro* le potentiel antibactérien de la lactoferrine et de la lactoferricine, seules ou en combinaison avec des antibiotiques, pour lutter contre les pathogènes mammaires comme *S. aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. L'effet de la lactoferrine utilisée seule est assez faible, mais la lactoferricine est plus de 100 fois plus efficace pour inhiber la croissance bactérienne. Ces résultats semblent être indépendants de leur capacité d'immobiliser le fer, car l'addition de fer au milieu de culture n'a pas affecté l'effet inhibiteur de la lactoferrine et de la lactoferricine. Il est intéressant de noter qu'autant la lactoferrine que la lactoferricine semblent beaucoup plus efficaces lorsque combinée avec des antibiotiques. Ces deux molécules augmentent de plusieurs fois l'activité inhibitrice des antibiotiques

Figure 1. Proportion des isolats de *Staphylococcus aureus* isolés de cas de mammite qui sont résistants à la pénicilline

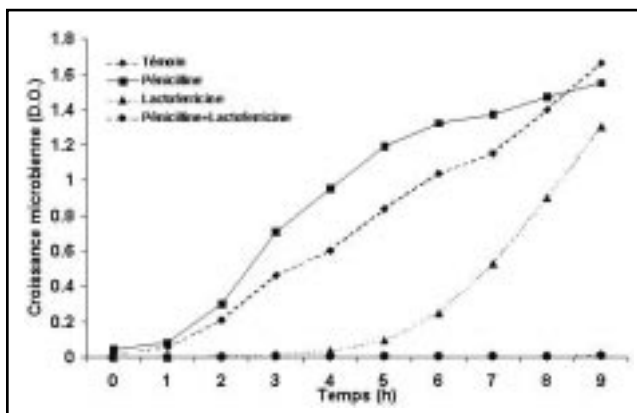


comme la pénicilline, l'ampicilline, la novobiocine, l'érythromycine et la néomycine. L'observation la plus surprenante est que la lactoferrine augmente l'activité inhibitrice de la pénicilline de quatre fois ou moins chez la plupart des souches de *S. aureus* sensibles à cet antibiotique, alors qu'avec les souches résistantes, l'augmentation est de quatre à seize fois. Ainsi, la figure 2 montre, chez une souche résistante à la pénicilline, que la croissance de la bactérie n'est pas ralentie par la présence de pénicilline, mais elle est complètement stoppée par la combinaison pénicilline-lactoferrine. Ces résultats suggèrent que la lactoferrine et la lactoferricine peuvent rétablir la sensibilité à la pénicilline.

L'observation au microscope électronique révèle que la pénicilline induit de profondes modifications à la morphologie des bactéries sensibles, mais pas chez les souches résistantes. Cependant, l'ajout de lactoferrine ou de lactoferricine à la pénicilline a induit des changements morphologiques semblables à ceux observés chez les bactéries sensibles. Encore une fois, ces résultats suggèrent que la lactoferrine et la lactoferricine peuvent rétablir la sensibilité à la pénicilline.

Ces résultats nous ont incités à étudier l'effet de la lactoferrine et de lactoferricine sur la β -lactamase, l'enzyme qui confère la résistance à la pénicilline. Nous avons observé que la lactoferrine et la lactoferricine réduisent l'activité de la β -lactamase, qu'il s'agisse de l'activité de base ou de celle induite par la présence de pénicilline. En fait, une faible concentration de lactoferrine peut réduire de plusieurs fois l'activité de la β -lactamase (Figure 3) chez *S. aureus* cultivé en présence de pénicilline. De plus, nous avons observé que la lactoferrine facilite la destruction de la bactérie par les cellules immunitaires de la vache (Figure 4). Une demande de brevet a été déposée (Diarra, Lacasse et Petitclerc) et nous étudierons bientôt l'efficacité de la lactoferrine et de la lactoferricine pour traiter la mammite *in vivo*. La poursuite de cette recherche pourrait nous permettre de développer des antibiothérapies combinées effi-

Figure 2. Effet de la lactoferricine sur la croissance de *Staphylococcus aureus*



caces pour le traitement de maladies infectieuses causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Dans un deuxième temps, nous envisageons d'améliorer la résistance de la vache à la mammite. En effet, les développements récents des technologies de l'ADN ouvrent d'excitantes avenues qui pourraient mener à l'utilisation de la thérapie génique pour guérir ou prévenir la mammite en relâchant dans le lait des protéines ou des peptides possédant une activité bactéricide. La lactoferrine et la lactoferricine, dont les concentrations sont normalement faibles dans le lait de vache, pourraient être sécrétées à plus hautes concentrations grâce à la thérapie génique et ainsi prévenir ou guérir la mammite. Néanmoins, il reste beaucoup de recherche à faire pour démontrer la faisabilité, l'efficacité et les impacts sociaux de la thérapie génique comme moyen de lutte contre la mammite chez les animaux de ferme.

Cette recherche est rendue possible grâce à un partenariat entre Agriculture et Agroalimentaire Canada, les Producteurs laitiers du Canada et la Fédération des producteurs de lait du Québec.

Figure 3. Effet de la lactoferrine sur l'activité β -lactamase de *Staphylococcus aureus*

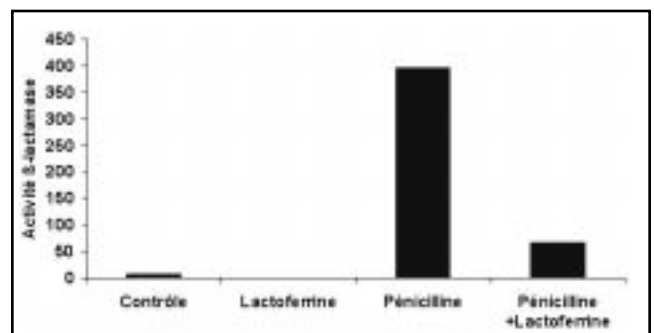
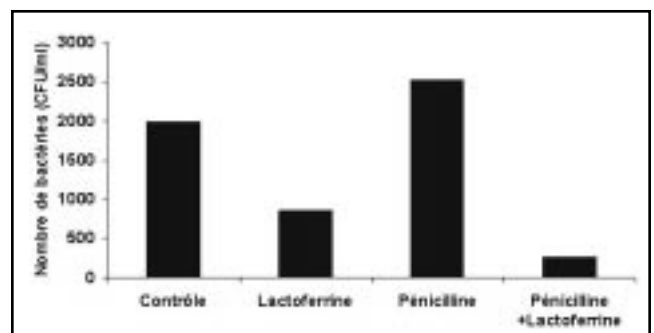


Figure 4. Effet de la lactoferrine sur la susceptibilité de *Staphylococcus aureus* à la phagocytose (nombre de bactéries vivantes 6 heures après avoir été phagocytées par des neutrophiles bovins)



DÉVELOPPER UN VACCIN CONTRE *S. AUREUS*

L'idée d'un vaccin contre *S. aureus* est très attirante et plusieurs tentatives ont eu lieu dans le passé. Malheureusement, les techniques classiques de vaccination ont donné des résultats décevants, probablement parce qu'elles étaient incapables d'induire des réactions immunitaires efficaces chez la vache. De nouvelles technologies de vaccination et une meilleure compréhension du système immunitaire bovin pourraient rendre possible le développement d'un tel vaccin.

Les techniques d'immunisation à l'ADN sont nées de notre connaissance de base des technologies de l'ADN, du génie génétique et des biotechnologies. L'ingrédient de base d'un vaccin à l'ADN est un fragment circulaire de matériel génétique appelé un plasmide, qui contient le code génétique (ADN) d'une protéine ou d'un peptide spécifique (un antigène) provenant d'une bactérie ou d'un virus. Quand ce plasmide est injecté à l'animal, il pénètre ses cellules et l'antigène est produit. Cet antigène induit chez l'animal toute une cascade d'événements immunitaires qui lui confère une protection contre le pathogène (voir encadré à la page suivante). Cette technologie a servi à développer avec succès un vaccin contre la diarrhée virale bovine (Harpin *et al.*, 1999). Un avantage important de ce type de vaccin est qu'il est très flexible et manipule la réponse immunitaire pour arriver à une protection efficace. Mentionnons aussi que les séquences d'ADN coûtent peu à produire et sont très stables.

Lors d'une infection mammaire avec *S. aureus*, la bactérie adhère aux cellules de la glande et sécrète ensuite une substance visqueuse alors qu'elle se répand dans le tissu mammaire. Une fois que cette bactérie a colonisé la glande, il est très difficile pour le système immunitaire de l'en chasser. Nous avons donc choisi de viser la première étape de l'infection, celle de l'adhésion. Nous avons sélectionné des gènes qui produisent des protéines essentielles à l'adhésion de la bactérie aux cellules. L'une d'entre elles, le facteur d'agglutination A (FAA), est une protéine exprimée à la surface de la bactérie qui permet de s'attacher à la cellule en se liant à deux de ses protéines, le fibrinogène et la fibrine. Une partie du gène FAA a été introduit dans un plasmide. Ce nouveau plasmide (pFAA) permet la synthèse de la protéine par un animal. Des souris ont été vaccinées par injections intramusculaires à trois semaines d'intervalle et du sérum sanguin de ces souris a été récolté 3 semaines après la dernière injection. Des souris vaccinées avec le plasmide vide ont servi de témoins.

La vaccination avec le plasmide vide n'a provoqué aucune production détectable d'anticorps (Figure 5). Par contre, la vaccination avec le plasmide pFAA a permis la production d'anticorps spécifiques en grande quantité. En effet, ceux-ci sont détectables même

lorsque le sérum a été dilué 80 000 fois ! L'incubation de *S. aureus* avec du sérum sanguin provenant de souris vaccinées avec le pFAA bloque presque totalement la fixation de la bactérie au fibrinogène purifié (Figure 6). De plus, l'incubation de *S. aureus* avec du sérum de souris vaccinées augmente le rythme de capture des bactéries (phagocytose) par des cellules immunitaires de souris. À une dilution de 1/1000, le sérum des souris vaccinées permet une augmentation de 32 % de la phagocytose alors qu'une dilution 1/250 amène 60 % plus de phagocytose. L'immunisation à l'ADN codant pour le FAA permet donc la production d'anticorps fonctionnels pouvant participer à la lutte contre *S. aureus*.

En plus de la réponse humorale (c.-à-d. la production d'anticorps), nous avons aussi étudié la réponse cellulaire pour vérifier l'étendue de la stimulation du système immunitaire par la vaccination. La réponse cellulaire a été mesurée par un test de prolifération de cellules de la rate en présence du facteur d'agglutination A. Les cellules provenant de souris vaccinées avec le pFAA ont eu un indice de prolifération de plus du triple de celles

Figure 5. Détection d'anticorps spécifiques au FAA dans le sérum de souris

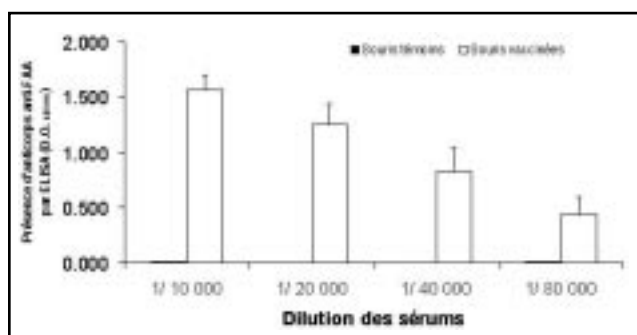
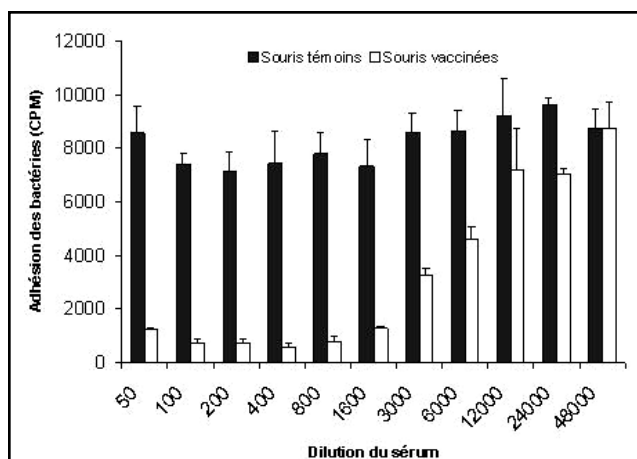
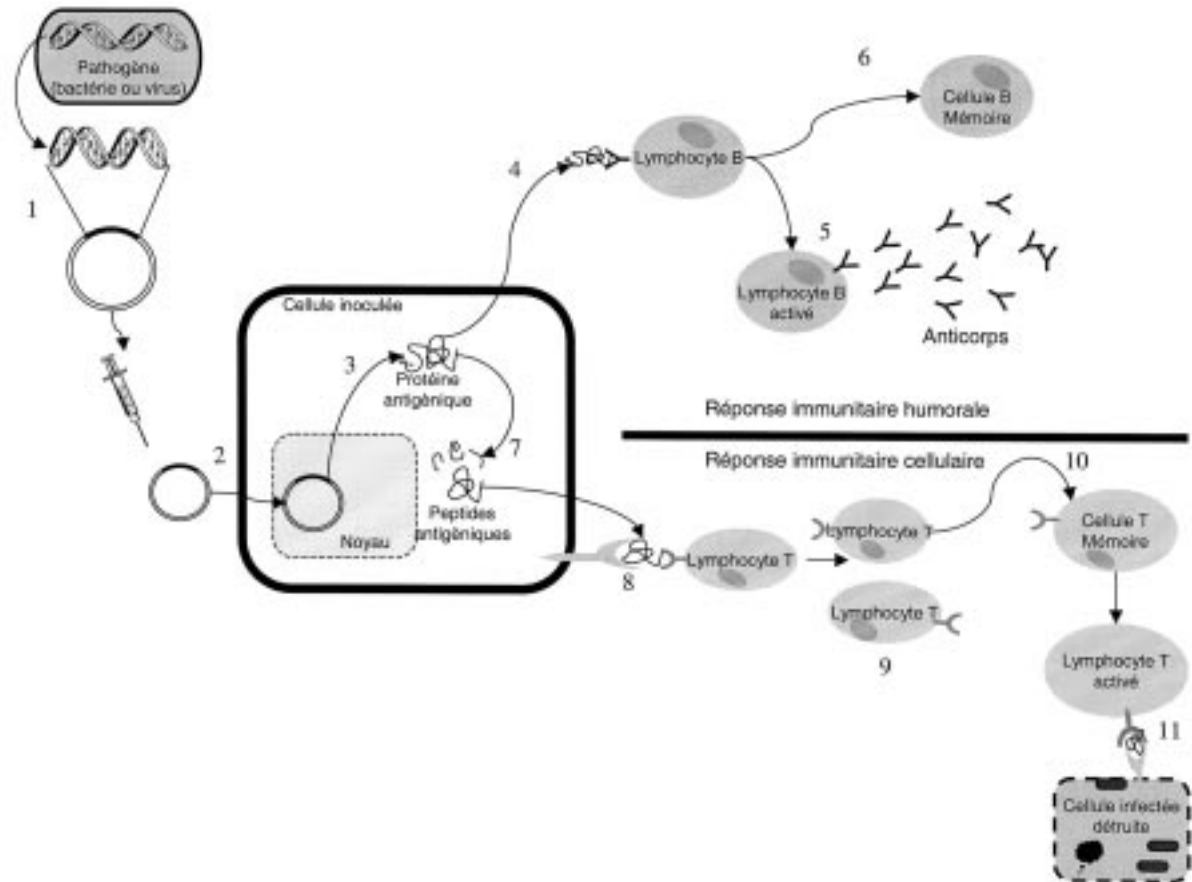


Figure 6. Effet du sérum de souris immunisées ou non contre le FAA, sur la liaison de *Staphylococcus aureus* au fibrinogène



Comment fonctionne un vaccin à l'ADN ?

Un vaccin à l'ADN induit une protection contre un microorganisme infectieux, ou pathogène, en stimulant deux voies du système immunitaire : la voie humorale, qui attaque les pathogènes hors des cellules, et la voie cellulaire, qui élimine les cellules colonisées par des pathogènes. Un animal est immunisé lorsque la réponse immunitaire résulte en la formation de cellules « mémoires » qui monteront la garde afin de prévenir une infection par ce pathogène.



Une description simplifiée de la façon dont le vaccin induit l'immunité est présentée dans le schéma ci-dessus. Un vaccin à l'ADN nécessite l'isolement d'un gène provenant du pathogène. Ce gène est ensuite inséré dans un fragment circulaire de matériel génétique appelé un plasmide (1). Ce plasmide est injecté à l'animal pour y être capté par certaines cellules (2). La cellule inoculée traduit le gène inséré dans le plasmide, produisant ainsi une protéine (antigène) que l'on retrouve normalement dans le pathogène (3).

Dans la voie humorale, certaines cellules du sang, appelées lymphocytes B, se lient à l'antigène relâché par la cellule inoculée (4) et se multiplient. Une portion importante de ces cellules vont sécréter des anticorps (5) qui, lors d'une infection, vont se lier au pathogène (opsonisation) le désignant ainsi comme un ennemi devant être éliminé. D'autres lymphocytes B deviennent des cellules mémoires (6).

Dans la voie cellulaire, certains antigènes sont dégradés par la cellule inoculée (7). Certains de ces fragments, ou peptides, se lient au complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH) et migrent à la surface de la cellule pour y être « présentés » (8). D'autres cellules sanguines, appelées lymphocytes T cytotoxiques, se lient au CMH et se multiplient (9). Certains lymphocytes ainsi activés se transformeront en cellules T mémoires (10). Lors d'une infection, ces cellules T mémoires seront réactivées et se lieront aux cellules présentant le peptide sur leur CMH. La liaison au lymphocyte provoquera la destruction de la cellule infectée et des pathogènes contenus dans celle-ci (11).

Pour en savoir plus :

Weiner, D.B. et R.C. Kennedy. 1999. Genetic vaccines. Scientific American <http://www.sciam.com/1999/0799issue/0799weiner.html>

provenant de souris témoins. Ce test prouve donc que, contrairement à la plupart des vaccins traditionnels, ce vaccin induit une réponse cellulaire significative. Une telle réponse pourrait aider à éliminer les bactéries cachées à l'intérieur des cellules de la glande mammaire.

Ce travail a permis de montrer que la vaccination à l'ADN contre le FAA permet de produire des anticorps qui peuvent lier la surface de la bactérie, inhiber l'adhésion au fibrinogène, faciliter la capture de *S. aureus* et induire une réponse cellulaire. Les prochaines étapes consistent à explorer la protection que peut amener la vaccination à l'ADN chez la souris, puis chez la vache.

Cette recherche est rendue possible grâce à un partenariat entre Novalait, le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, le Fonds FCAR, l'Université de Sherbrooke et Agriculture et Agroalimentaire Canada.

RÉFÉRENCES

- Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase et M. Tomita. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73:472-479.
- Bouchard, E., J.-M. Guillemette, M. Bigras-Poulin, et D. DuTremblay. 1996. La principale cause: les bactéries contagieuses. *Le Producteur de Lait Québécois*. Janvier 1996 23-27.
- Guérin-Faublée, V. et Y. Brun. 1999. La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale. *Revue Med. Vet.* 150:299-312.
- Harpin S, D.J. Hurley, M. Mbikay, B. Talbot et Y. Elazhary. 1999. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein E2. *J. Gen. Virol.* 80:3137-3144.
- Monardes, H. G., R. I. Cue, M. del Pilar Schneider et J. W. Dürr. 2000. À propos de la longévité. 24^e Symposium sur les bovins laitiers, CRAAQ, p. 1-11.
- Nuijens, J.H., P.H.C. Van Berkel et F. L. Schanbacher. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *J. Mam. Gland Bio. Neoplasia* 1:285-295.
- Wilson, D.J., K.L. Case, R.N. Gonzalez et H.R. Han. 1998. Bacteriologic cure rates with no treatment or with eight different antibiotics. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings*, 273-274.