

Caractérisation des systèmes d'acquisition du fer de *Staphylococcus aureus*

Durée : 09/2002 - 12/2005

Résumé

Chez les organismes vivants, le fer joue un rôle important dans la chaîne respiratoire et le métabolisme intermédiaire. À cause de la faible quantité de fer libre disponible dans le lait, les bactéries pathogènes, telle *Staphylococcus aureus*, ont dû développer des systèmes d'acquisition du fer très efficaces. De tels systèmes nécessitent la présence à la surface des bactéries de récepteurs spécifiques qui représentent des cibles cellulaires de choix pour l'élaboration de nouvelles stratégies de contrôle et de prévention. Dans un premier temps, nous avons estimé l'habileté des souches à croître dans un milieu sévèrement restreint en fer. Toutes les souches testées étaient extrêmement tolérantes à une restriction en fer, ce qui implique qu'elles sont toutes bien équipées pour acquérir le fer disponible. Ensuite, nous avons testé la capacité de *Staphylococcus aureus* à utiliser différentes sources de fer. Ainsi, nous avons identifié plusieurs protéines de l'hôte, ainsi que certains sidérophores exogènes (petites molécules relâchées par le microorganisme et ayant une grande affinité pour le fer) comme sources de fer utilisables par la plupart des souches du pathogène. Toutes les souches testées se sont montrées capables de produire des sidérophores. De plus, nous avons vérifié la présence de certains gènes, que nous croyons liés à l'acquisition du fer, chez toutes les souches. Ces résultats nous indiquent la présence de systèmes d'acquisition du fer très efficaces. Des études de transcriptomique nous ont permis d'identifier plusieurs gènes qui sont surexprimés *in vitro* en absence de fer et *in vivo* chez la souris. Ces gènes ont été clonés dans un vecteur d'expression. Les protéines recombinantes obtenues ont ensuite été injectées à des lapins afin d'en vérifier leur antigénicité. La plus immunogène d'entre elles, la protéine IsdH, a ensuite été testée chez des bovins, où elle s'est également avérée fortement immunogène. Cette protéine semble donc être une bonne candidate pour un vaccin contre *Staphylococcus aureus*.

Objectifs et méthodologie

L'objectif global de cette étude est d'utiliser les systèmes d'acquisition du fer de *Staphylococcus aureus* afin de mettre au point des approches permettant de combattre les mammites causées par cette bactérie. Depuis 2004, les objectifs spécifiques suivants ont été poursuivis :

Objectif 2. Identification des composantes impliquées dans le transport du fer.

L'identité des composantes impliquées dans le transport du fer chez *Staphylococcus aureus* a été principalement démontrée par des analyses de profils transcriptionnels. Nous avons préparé des puces à ADN spécifiques pour l'étude des systèmes de transport du fer chez *Staphylococcus aureus*. À partir du génome séquencé de *Staphylococcus aureus*, nous avons identifié plus d'une centaine de gènes impliqués ou susceptibles d'être impliqués dans le transport du fer. Pour la fabrication des puces, tous ces gènes ont été amplifiés par PCR et ont été imprimés sur les puces comportant un total de 460 gènes de pathogenèse et de métabolisme. Nous avons donc ainsi identifié les gènes induits par une restriction en fer chez la souche parente. Ceci s'est fait à partir de cultures en flacon dans des milieux riche et pauvre en fer de même qu'à partir de bactéries cultivées *in vivo* à l'aide de chambres à diffusion implantées dans des souris. De même, le profil transcriptionnel de souches bactériennes mutantes déficientes au niveau de leurs systèmes d'acquisition du fer a été étudié. Nous avons également vérifié la présence et le polymorphisme de gènes identifiés dans l'ensemble des 26 souches de *Staphylococcus aureus* utilisées dans cette étude. Ceci a été réalisé par PCR avec des amorces spécifiques de chacun des gènes.

Objectif 3 : Évaluation des gènes identifiés comme antigènes.

Des gènes identifiés dans l'objectif précédent ont ensuite été clonés, en tout ou en partie dans le vecteur d'expression pQE-30. Les protéines recombinantes correspondant à ces gènes ont été produites en transformant des bactéries *E. coli*. Chaque protéine recombinante a été administrée à deux lapins avec l'adjuvant TiterMax®Gold à deux reprises. Le sérum d'échantillons sanguins a ensuite été testé par ELISA pour déterminer les titres d'anticorps produits contre chaque protéine recombinante testée. Suite aux résultats obtenus avec les lapins, deux taures ont été immunisées avec la protéine recombinante IsdH associée avec l'adjuvant TiterMax®Gold. Le titre et les isotypes des anticorps ont été évalués par la méthode ELISA et des essais de prolifération des cellules immunitaires ont été réalisés. Les antisérums de lapin dirigés contre les protéines recombinantes IsdH, SirA, SrtB et FhuD2 ont été utilisés pour étudier l'expression et la fonctionnalité des protéines correspondantes chez des bactéries cultivées en présence ou en absence de fer.

Résultats et applications

Objectif 2. Les analyses de transcriptomiques ont montré que 43 gènes étaient induits par une restriction en fer *in vitro*, que 54 gènes ont été induits par une croissance dans la souris et que 36 gènes étaient induits en commun dans ces deux conditions expérimentales. Ces 36 gènes étaient liés au transport et au métabolisme du fer et incluaient entre autres les gènes de biosynthèse des sidérophores, du transport des hydroxamates et de l'hème. Le recoupage de ces informations avec celles obtenues de l'analyse génétique et transcriptionnelle des mutants (chimiques, transposons, streptonigrine, salmicyne) a permis l'identification des composantes du système de transport du fer les plus aptes à servir de candidats pour le développement de vaccins. Les études de prévalence ont montré le caractère ubiquitaire de la plupart des gènes identifiés.

Objectif 3. L'immunisation des lapins a démontré que chacune des protéines était immunogène. Les titres en anticorps, pour deux des antigènes (IsdH et SirA) ont même dépassé 1:1 000 000. Les antisérums dirigés contre les protéines recombinantes IsdH, SirA, SrtB et FhuD2 ont été utilisés pour étudier l'expression des protéines correspondantes lorsque la bactérie était cultivée en absence de fer. Cela a permis de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse des profils transcriptomiques. L'immunisation de taures avec IsdH a permis d'obtenir des titres en anticorps de 1:200 000. Ces anticorps étaient, majoritairement de type IgG2. Cet isotype est habituellement recherché lors d'immunisation de vaches, car il est fortement opsonisant et facilite ainsi la reconnaissance et la destruction des bactéries par les neutrophiles (première ligne de défense de la glande mammaire). Les essais de prolifération des cellules lymphocytaires après stimulation *in vitro* avec IsdH ont montré la multiplication des lymphocytes de type CD4⁺. Cette population lymphocytaire stimule la production d'anticorps.

Transfert des résultats

Une stratégie de transfert a été élaborée au sein du Réseau canadien de recherche sur la mammites bovine afin d'accélérer et d'optimiser le transfert et la valorisation des résultats. Le premier niveau de transfert se fera entre les chercheurs membres du Réseau. Dans un deuxième temps, les résultats seront transférés à la communauté scientifique par la publication d'articles scientifiques et par la participation à des

conférences et à des sessions d'affiches lors de congrès scientifiques. La caractérisation des systèmes d'acquisition du fer ouvre plusieurs nouvelles avenues pour la prévention et le traitement de la mammites. Ces résultats pourront, notamment, servir au développement d'un vaccin contre la mammites à *Staphylococcus aureus*.

Partenaires financiers

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries
et de l'Alimentation du Québec

Agriculture et Agroalimentaire Canada

Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 332 700 \$

Point de contact

Responsable du projet :

Pierre Lacasse

Agriculture et Agroalimentaire Canada

Centre de recherche et développement sur le bovin laitier et le porc

2000, Route 108, C.P. 90

Lennoxville (Québec) J1M 1Z3

Téléphone : (819) 565-9171

Télécopieur : (819) 564-5507

Courriel : Lacassep@agr.gc.ca

Collaborateurs :

Moussa S. Diarra, Agriculture et Agroalimentaire Canada

François Malouin, Université de Sherbrooke

Mario Jacques, Université de Montréal