

Vaccination génétique pour prévenir la mammite causée par le *Staphylococcus aureus*

Durée : 09/2002 - 12/2005

Résumé

Jusqu'à présent, les antibiotiques ont constitué l'arme de choix contre la mammite. Cependant, on remarque l'apparition de plus en plus fréquente de bactéries résistantes aux antibiotiques. Bien que de nombreux microorganismes soient impliqués dans cette maladie, *Staphylococcus aureus* est devenu la bactérie pathogène mammaire la plus fréquente, présent dans plus de 90 % des troupeaux laitiers. L'idée de développer un vaccin contre *Staphylococcus aureus* suscite de l'intérêt depuis plusieurs années déjà, mais tous les vaccins classiques testés jusqu'ici n'ont pas donné les résultats escomptés, possiblement à cause du type de réponse immunitaire qu'ils induisent. Nous avons produit et testé plusieurs vaccins et plusieurs stratégies d'immunisation chez la souris et la vache. La plupart de ces vaccins ont induit des réponses immunitaires significatives. Parmi nos formulations, nous avons observé qu'un vaccin, contre le facteur d'agglutination A (ClfA), induit une protection partielle chez la souris. Un deuxième vaccin, qui inclut une combinaison de trois facteurs de virulence, a montré une protection impressionnante contre la mort septicémique chez les souris. Chez la vache, nos résultats indiquent que ce type de vaccin induit des réponses immunitaires humorale (anticorps) et cellulaire. Bien que la vaccination n'ait pu prévenir l'infection lors d'une infection expérimentale par *Staphylococcus aureus*, les vaches vaccinées ont montré une meilleure aptitude à éliminer les bactéries. Nous avons noté une grande variabilité de la réponse immunitaire à nos vaccins d'un animal à l'autre. Afin de réduire la variabilité et augmenter de la réponse immunitaire, nous avons évalué différentes approches. Certaines d'entre elles, notamment la coadministration de la cytokine GM-CSF ont effectivement réduit la variabilité de la réponse. Cependant, afin d'augmenter la réponse humorale, l'approche la plus efficace a été d'effectuer un rappel avec l'antigène protéique correspondant. Globalement, ces résultats suggèrent que le développement d'un vaccin contre le *Staphylococcus aureus* est possible, mais nécessitera de développer une technologie permettant d'améliorer la réponse immunitaire chez les vaches.

Objectifs et méthodologie

L'objectif à long terme de ce programme de recherche est de développer un vaccin permettant une protection à long terme contre la mammite à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. Dans le cadre de ce projet, les objectifs spécifiques suivants ont été poursuivis :

1. La création des vecteurs du vaccin à ADN qui expriment les immunogènes d'intérêt en combinaison entre eux, ou avec des motifs immunostimulants, des cytokines ou des adjuvants d'ADN costimulateurs.
2. L'évaluation de l'expression, de la sécrétion et de la glycosylation des protéines encodées par des vecteurs construits dans les cellules eucaryotiques.
3. La vaccination chez les souris et la caractérisation de la réponse immunitaire.
4. L'optimisation de la vaccination à l'ADN et l'évaluation de la réponse immunitaire chez les vaches laitières. Vérification de l'efficacité de la protection du vaccin contre la mammite par une infection de la glande mammaire par *Staphylococcus aureus* chez les vaches laitières.

Résultats et applications

Objectifs 1 et 2. Un grand nombre de plasmides ont été développés. Notamment, nous avons produit de nouveaux vecteurs plurivalents permettant de produire plus d'une protéine (ou peptide) à la fois. Aussi, nous avons produit 8 antigènes protéiques recombinants qui sont impliqués dans la virulence et la régulation de croissance de la bactérie. Afin de réduire la variabilité entre les résultats individuels des animaux, nous avons inclus dans des vaccins un gène qui code pour la molécule GM-CSF qui est bien connue pour ses effets immunostimulateurs. Dans un autre vecteur, nous avons inclus le gène pour un peptide (le CTLA -4) qui devait aider le ciblage cellulaire de notre vaccin. Plus récemment, un plasmide trivalent contenant les séquences de trois antigènes ainsi que des séquences immunostimulateurs de type « CpG » a été produit.

Objectif 3. Nous avons testé trois nouveaux antigènes chez la souris. Les antigènes RAP et TRAP ont induit une réponse immunitaire faible. À l'opposé, l'antigène CNA s'est avéré très immunogène. Néanmoins, les souris vaccinées contre cette protéine n'ont montré aucune protection lors d'infections expérimentales. Ces antigènes n'ont donc pas été retenus lors des essais chez les vaches. D'autre part, nous avons construit un vaccin trivalent contenant les gènes de trois adhésines. Le vaccin a induit une réponse immunitaire contre les trois antigènes. Plus important encore, les souris ont été partiellement protégées lors d'une septicémie expérimentale avec des taux de survie trois fois plus élevés que les souris témoins.

Résultats et applications (suite)

Objectif 4. Dans une première étude, nous avons évalué l'efficacité de plusieurs stratégies à augmenter la réponse immunitaire humorale d'un vaccin à base d'ADN contre ClfA. Les résultats ont montré que la vaccination des vaches avec le gène de ClfA induisait une réponse forte et spécifique. Cependant, la réponse a été très variable d'un animal à l'autre. L'addition du gène de GM-CSF et du gène bCTLA4-IgG au vaccin ou l'utilisation d'un transporteur d'ADN a permis d'induire une réponse anti-ClfA plus uniforme. Chez des veaux, nous avons étudié la sensibilité du système immunitaire aux activateurs des récepteurs TOLL. Les résultats montrent que le système immunitaire des jeunes animaux est beaucoup moins sensible que celui des adultes. Dans une première expérience visant à tester l'efficacité

protectrice de la vaccination, nous avons immunisé des vaches pendant la période péripartum et nous les avons ensuite inoculées avec des bactéries. Les animaux vaccinés et les témoins ont développé une mammite, cependant, les bactéries ont été éliminées de la plupart des quartiers infectés chez les vaches vaccinées alors que la plupart des quartiers des vaches témoins sont demeurés infectés. Nous avons répété cette expérience avec un vaccin trivalent qui était plus efficace à protéger des souris contre la septicémie de *Staphylocoque*. Néanmoins, la réponse immunitaire chez les vaches fut très faible en comparaison avec des expériences antérieures. Chez les vaches l'administration d'une immunisation rappel avec de la protéine purifiée augmente la magnitude de la réponse immunitaire humorale.

Transfert des résultats

Le Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine a élaboré une stratégie de transfert afin d'accélérer et d'optimiser le transfert et la valorisation des résultats. Notamment, les résultats de ces travaux ont été présentés aux scientifiques du réseau. Le transfert des connaissances acquises a été fait via la publication des articles

concernant la vaccination à ADN contre *Staphylococcus aureus* (Vaccine, 2005, 2006), un troisième article sur la pathologie de la mammite (Microbial Pathogenesis, 2003) et quatre présentations à des conférences internationales.

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 : 387 180 \$

Point de contact

Responsable du projet :

Brian G. Talbot

Université Sherbrooke

Département de biologie

2500, boul. Université

Sherbrooke (Québec)

Téléphone : (819) 281-8000 poste 2065

Télécopieur : (819) 821-8049

Courriel : brian.talbot@usherbooke.ca

Collaborateurs :

Moussa S. Diarra, Agriculture et Agroalimentaire Canada

Pierre Lacasse, Agriculture et Agroalimentaire Canada