

Forum technologique Novalait 2003

Développement de nouveaux produits antimicrobiens à base de bactériocines pour la prévention et le traitement de la mammites bovine

Durée : 06/2001 – 09/2003

Résumé

La mammites bovine est l'une des pathologies les plus problématiques dans l'élevage de bovins laitiers avec des pertes annuelles de près de 350 millions de dollars. Le traitement actuel de la mammites est surtout basé sur l'utilisation d'antibiotiques et la régulation de troupeau. Bien que très utilisée, l'antibiothérapie présente certains désavantages liés à l'apparition de souches résistantes, notamment lors d'utilisation abusive. Le but de ce travail est d'évaluer le potentiel des bactériocines de bactéries lactiques, seules ou en combinaison, pour l'inhibition des souches de streptocoques et staphylocoques, deux microorganismes largement incriminés dans la mammites bovine. Dans un premier temps, de fortes concentrations de nisine Z et de pédiocine PA-1 ont été produites par fermentation en batch à cycles répétés avec cellules immobilisées. Les deux bactériocines produites ont été purifiées par différentes approches chromatographiques et utilisées, seules ou en combinaison, avec une sélection d'antibiotiques (la pénicilline, la pirlimycine, l'érythromycine, la novobiocine, l'ampicilline et la cloxacilline), pour étudier leur activité inhibitrice contre des agents de la mammites bovine tels *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Staphylococcus aureus*. Nous avons pu mettre en évidence l'inefficacité de certains des antibiotiques testés ainsi que de la pédiocine PA-1 envers certaines des souches testées. D'autre part, une titration en échiquier a révélé une interaction positive entre la nisine Z et l'érythromycine, la cloxacilline ou la pénicilline contre des souches de *Streptococcus uberis*. Le même type d'interaction a été observé avec la combinaison nisine Z/novobiocine contre des souches de *Streptococcus dysgalactiae*.

Objectifs et méthodologie

L'objectif général de ce projet est de développer de nouveaux produits efficaces pour la prévention et le traitement des mammites contenant, comme ingrédients actifs, un mélange de nisine Z et de pédiocine et des combinaisons bactériocines-antibiotiques. Les objectifs spécifiques du projet sont les suivants :

1. optimiser la production de pédiocine par *Pediococcus acidilactici* UL5 en utilisant la technologie des cultures à cycles répétés avec cellules immobilisées mises au point précédemment pour la nisine Z;
2. produire et purifier la pédiocine en grande quantité;
3. développer des formules antimicrobiennes à base d'un mélange de nisine/pédiocine et de bactériocines/antibiotiques pour les traitements préventifs et curatifs de la mammites chez la vache.

Résultats et applications

Objectif spécifique 1 : Optimiser la production de pédiocine par *Pediococcus acidilactici* UL5

Les souches *Pediococcus acidilactici* UL5 (Banque RBL, STELA) et *Listeria ivanovii* 28 ont été utilisés dans cette étude comme souche productrice de pédiocine et souche indicatrice respectivement. Les fermentations avec cellules immobilisées ont été réalisées dans un milieu MRS supplémenté de 1 % de glucose et dans un milieu PLS à base de perméat de lactosérum (6 %) supplémenté en extrait de levure (1 %), glucose (2 %) et Tween 80 (0,1 %). L'immobilisation de *Pediococcus acidilactici* UL5 a été réalisée dans un gel mixte de -carraghénane 2,75 % et de gomme de caroube 0,25 %. Des fermentations en batch à cycles répétés avec cellules immobilisées ont été réalisées dans un bioréacteur C30 de 0,5 L (New Brunswick, Edison, NJ, USA) inoculé avec 30 % de billes colonisées, à 37 °C et pH 5,0 dans un milieu MRS et dans un milieu PLS. Des cultures en batch avec cellules libres ont été réalisées dans les mêmes conditions. L'activité de la pédiocine a été mesurée par la méthode de dilution critique sur microplaque avec *L. ivanovii* HPB28 comme souche indicatrice. L'effet du temps d'incubation sur la production de pédiocine, mesuré par un test de titration sur microplaque avec la souche indicatrice *Listeria ivanovii* 28, a été étudié. Une production maximale de pédiocine de 4096 AU/ml a été obtenue après un temps très court d'incubation

(45 min) dans le MRS et de 2 h dans le perméat de lactosérum, correspondant à une productivité volumique très élevée de 3822 et 1434 AU/ml.h, respectivement. Par comparaison, la production maximale de pédiocine déterminée lors de cultures en batch classiques à pH 5 dans le MRS et le perméat de lactosérum est de 2048 AU/ml après 9 et 12 h de culture, respectivement, ce qui correspond à des productivités volumiques maximales de 228 et 171 AU/ml.h et de productivités volumiques calculées de 85 AU/ml.h, en considérant la réalisation d'une culture en batch par 24 heures. Les très hautes productivités du procédé à cycles répétés avec cellules immobilisées sont expliquées par la très haute concentration des cellules immobilisées maintenues dans le réacteur ($7,1 \times 10^{10}$ UFC/g de billes). La grande stabilité de la production lors des cultures à cycles répétés a été observée lors de 12 cycles réalisés sur 3 jours de fermentation.

Objectif spécifique 2 : purification en grande quantité de la pédiocine

Un protocole en plusieurs étapes a été mis au point pour la purification de la pédiocine à partir du milieu de fermentation. Ce protocole comprend une centrifugation, un passage sur une colonne échangeuse cationique (gel SP-Sepharose) afin d'éliminer les

Résultats et applications (suite)

protéines cationiques et certains phospholipides et un passage sur une colonne C18 pour séparer les protéines non hydrophobes des hydrophobes (pédiocine). Les fractions obtenues après ces trois étapes sont purifiées davantage par passage sur HPLC avec une colonne-préparatif (Beckman Ultrasphere ODS (C18) 10x250 mm). Le degré de pureté de la bactériocine obtenue est déterminé par analyse sur un gel d'acrylamide et la masse moléculaire déterminée par spectre de masse. Le rendement de purification obtenu est d'environ 2,6% et la pédiocine produite est pure à plus de 90% tel que déterminé par HPLC. La masse moléculaire du peptide purifié a été vérifiée par spectre de masse (4625 Da). Ce procédé de purification a été utilisé pour produire 8 mg de pédiocine purifiée pour la production d'anticorps et est actuellement utilisé en routine pour la purification de la pédiocine en grande quantité pour les études du spectre d'action des bactériocines sur les isolats cliniques de mammites.

Objectif 3 : développement de formules anti-microbiennes base de bactériocines.

De la pédiocine et de la nisine Z on été purifiées, fractionnées et conservées à -80 °C jusqu'à utilisation. Des fractions de chacune des deux bactériocines ont été prélevées à environ deux semaines d'intervalles et analysées pour leur stabilité en déterminant l'activité spécifique résiduelle. De manière générale, les préparations des deux bactériocines produites demeurent assez stables dans les conditions de stockage utilisées (fractions à 1 mg/ml, dans 30 % acétonitrile

à -80 °C). Ces fractions de bactériocines ont été utilisées, seules ou en combinaison, pour évaluer leur potentiel à inhiber des souches de streptocoques et de staphylocoques, deux microorganismes largement incriminés dans la mammité bovine. Pour la réalisation de cette partie du projet, une collection de souches de *Staphylococcus aureus* (00-F905, 02-2182), *Streptococcus dysgalactiae* (39, 29, 2; S. uberis (22, 21, 36) et *S. agalactiae* (A5, A7, A8) a été montée grâce à la collaboration du département de pathologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, à Saint-Hyacinthe. Différentes concentrations (100- 50- 25- 12,5- 6,25- 3,125 µg/ml) de nisine Z et de pédiocine PA-1 purifiées ont été utilisées pour la détermination des CMI en utilisant des tests d'inhibition sur microplaques, tel que décrits par Morita et al. (2000). Ces valeurs de CMI seront comparées à celles de différents antibiotiques couramment utilisés pour le traitement de la mammité à savoir la pénicilline, l'érythromycine, la cloxacilline, la pirlimycine, l'oxytetracycline, la novobiocine et l'ampicilline. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence l'inefficacité de certains des antibiotiques testés ainsi que de la pédiocine PA-1 envers certaines des souches testées. D'autre part, une titration en échiquier a révélé une interaction positive entre la nisine Z et l'érythromycine, la cloxacilline ou la pénicilline contre des souches de *Streptococcus uberis*. Le même type d'interaction a été observé avec la combinaison nisine Z /novobiocine contre des souches de *Streptococcus dysgalactiae*.

Transfert des résultats

Au terme de ce projet, plusieurs connaissances, procédés et produits pourront être transférés :

- nouveau procédé de production de pédiocine purifiée, par fermentation en batch à cycles répétés avec des cellules immobilisées et purification simultanée par immunoaffinité. Ce procédé pourra intéresser l'industrie alimentaire et pharmaceutique, pour développer les applications de la pédiocine comme agent antimicrobien à large spectre d'action sur les bactéries Gram⁺;
- différents produits pour la prévention (du type teat seal et teat dip) et le traitement des mammites contenant un mélange de nisine et de pédiocine seront développés et testés in vitro pour leur activité et leur stabilité;

- l'efficacité de certains traitements à base de bactériocines sélectionnées contre les infections bactériennes de la mamelle sera démontrée par des essais sur l'animal. Après validation des effets in vivo et une protection des résultats de la recherche par prise de brevet, des licences pour la production et l'exploitation pourront être développées avec des partenaires industriels ou dans le cadre d'un démarrage d'entreprise (spin-off).

La réalisation de ce projet a permis la formation de trois étudiants à la maîtrise, d'un étudiant de premier cycle et d'un stagiaire post-doctoral.

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

Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 100 000 \$

Point de contact

Responsable du projet :

Ismail Fliss

Université Laval

Centre de recherche en sciences et technologie du lait

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Département des sciences des aliments et de nutrition

Sainte-Foy (Québec) G1K 7P4

Téléphone : (418) 656-2131, poste 6825

Télécopieur : (418) 656-3353

Courriel : Ismail.fliss@al.n.ulaval.ca

Collaborateurs :

Christophe Lacroix, chercheur, Institute of Food Science and Nutrition, Swiss Federal Institute of Technology, Suisse

Serge Messier, chercheur, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire



2750, rue Einstein, bureau 220-A
Sainte-Foy (Québec) G1P 4R1

Téléphone : (418) 527-7947

Télécopieur : (419) 527-5957

Courriel : novalait@novalait.ca