

**EVALUATION DE SOUCHES ATTENUÉES DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*
POUR LA PREVENTION DU CHOLERA AVIAIRE**

Guillermier Sophie¹, Ramel Chantal¹, Baudu Philippe¹, Cachet Nathalie¹, Galleau Stéphanie², Le Gros François-Xavier¹, Goutebroze, Sylvain², Montange Camille², Andreoni Christine¹, Poulet Hervé¹, Jolivet Edmond¹

¹Meriel S.A.S - Laboratoire de Lyon Gerland – 254 rue Marcel Mérieux - 69007 LYON,
²Meriel S.A.S. - Centre de Recherche de St Vulbas - ZI Plaine de l'Ain - 01150 - Saint-Vulbas

francois-xav.le-gros@merial.com

RÉSUMÉ

Le Cholera aviaire dû à *Pasteurella multocida* est une affection grave des oiseaux (dindes, poules et canards) pour laquelle des vaccins inactivés sont commercialement disponibles. Cependant ce type de vaccin ne protège pas suffisamment contre les nombreux sérotypes de *P. multocida* existant. Des bactéries atténuées plutôt qu'inactivées, en reproduisant les stades précoces d'une infection naturelle, pourraient induire de meilleures protections croisées. La réponse immunitaire sollicitée est de fait souvent plus large et plus durable que celle induite par des immunogènes non réplicatifs.

Un grand nombre de mutants de *P. multocida* obtenus par la technique de mutagenèse par étiquette (STM, Signature-Tagged Mutagenesis) a été évalué sur des critères d'innocuité et d'efficacité chez la dinde. Cinq des cibles génétiques d'atténuation ainsi identifiées ont été sélectionnées pour délétion complète dans *P. multocida* de sérotype A:3. Cinq mutants délétés sur un gène et deux mutants doublement délétés sans marqueur chromosomique de résistance antibiotique ont été obtenus et testés à 10⁸ ufc/dinde par voie oculaire pour leur innocuité et leur efficacité contre une épreuve virulente homologue. Les scores d'innocuité et d'efficacité étaient respectivement à 56-100% et 20-90%. Malgré une certaine hétérogénéité dans ces résultats, des candidats vaccins prometteurs ont ainsi été identifiés pour des développements futurs.

ABSTRACT

Evaluation of attenuated strains of *Pasteurella multocida* for the prevention of fowl cholera

Pasteurella multocida is a Gram-negative bacterial pathogen responsible for diseases of economic importance in a wide range of animal species, including fowl cholera, a severe disease of avian species (turkeys, chickens and ducks) which can present acute and chronic forms. The lack of cross-protection between different serotypes of *P. multocida* is a challenge for vaccine development. Commercial inactivated vaccines prepared from organisms grown *in vitro* fail to protect birds against heterologous field isolates. However, it is well established that live attenuated bacterial strains can be effective vaccines with better cross-protection. Live attenuated strains establish limited infection in the host and mimic the early stages of natural infection. Immune responses elicited by such vaccines are often of greater magnitude and longer duration than those induced by non-replicating immunogens.

A large number of mutants obtained by the STM technique (Signature-Tagged Mutagenesis) has been evaluated for safety and efficacy in turkeys by ocular route of vaccination. Five of them showing the best safety/efficacy profiles were selected for full gene deletion in *P. multocida* of serotype A:3. Five single and two double deleted mutants without antibiotic resistance gene marker in their chromosome were obtained and tested at 10⁸ cfu/turkey by ocular route for safety and efficacy studies by homologous challenge. Despite some heterogeneity in safety and efficacy scores ranging from 56-100% and 20-90%, respectively, promising live attenuated candidates for clinical vaccine development were identified.

INTRODUCTION

Pasteurella multocida est une bactérie à Gram négatif responsable de maladies à conséquences économiques importantes dans de nombreuses espèces animales dont le cholera aviaire, une affection grave des oiseaux (dindes, poules et canards). Le manque de protection croisée entre les différents sérotypes de *P. multocida* est une difficulté pour le développement de vaccins. Ainsi des vaccins inactivés ont échoué à protéger des animaux contre des isolats terrains hétérologues. Cependant, il est bien établi que des bactéries atténuées plutôt qu'inactivées peuvent être des composants de vaccins plus efficaces avec de meilleures protections croisées. Ces souches vivantes provoquent des infections limitées dans leurs hôtes et reproduisent ainsi les stades précoces d'une infection naturelle. La réponse immunitaire sollicitée est de ce fait souvent plus large et plus durable que celle induite par des immunogènes non réplicatifs. Le but de ces essais était donc dans un premier temps d'établir des cibles génétiques d'atténuation de la virulence de *P. multocida*, non critiques pour son immunogénicité ; dans un second temps de confirmer *in vivo* ces résultats par délétion d'une sélection de ces gènes cibles. La méthode utilisée (mutagenèse par insertion aléatoire d'étiquette STM décrite par Hensel *et al.*(1995) privilégiait l'atteinte de facteur de virulence de préférence à celles de voies métaboliques, ces derniers mutants étant très probablement perdus dans les phases initiales de clonage *in vitro*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Evaluations *in vivo*

Au cours de travaux antérieurs (Merial 2002) 23 mutants d'insertion de *P. multocida* obtenus par méthode STM au sein d'une population de 1750, ont été criblés sommairement pour leur atténuation sur la dinde. Ces mutants montraient l'atteinte d'une cible génétique non encore décrite dans la littérature et dont la fonction pouvait être liée théoriquement à cette atténuation. Dans les essais rapportés comme suit, ils ont ensuite été cliniquement évalués plus précisément, au cours de 5 protocoles distincts mais similaires. Des groupes de 10 à 22 dindonneaux conventionnels âgés de 3 semaines ont été instillés par voie oculaire au moyen de 10^8 ufc/animal d'une culture en phase exponentielle de croissance. Ces animaux étaient observés pendant 3 semaines pour leur réaction clinique, avant de subir une épreuve virulente au moyen de la souche parentale A:3 16084 non mutée à dose et par voie identique. Les animaux étaient observés ensuite pour une seconde période de 2 semaines. A l'issue de la première période d'observation post « vaccination » le % d'animaux morts était le critère d'innocuité ; à l'issue de la

seconde période post épreuve, le % d'animaux survivants était le critère d'efficacité.

Sept mutants construits par délétion d'une ou de deux des 5 cibles jugées d'intérêt après cette première évaluation, ont été testés dans un second temps en 5 essais similaires; la dose d'épreuve dans l'essai 3 était cependant réduite d'un facteur 10 comme indiqué en tableau 2. Le critère d'innocuité était ici le pourcentage d'animaux en bonne santé après vaccination, défini au vu de leur comportement, et le critère d'efficacité inchangé.

1.2. Evaluations *in silico*

L'ADN génomique de ces mutants a été amplifié à l'aide d'une première amorce spécifique de l'étiquette de 40 paires de bases située en amont du transposon Tn10 inséré dans le chromosome et d'une seconde amorce inversée dégénérée. Les fragments individuels furent à nouveau amplifiés par un autre jeu d'amorces reposant sur le même principe avant d'être clonés puis séquencés. Les séquences d'intérêts furent ensuite comparées au génome de référence de la souche de Pm70 publié dans GenBank (numéro d'accès AE004439), identifiant ainsi le gène affecté par l'insertion et sa fonction décrite ou supposée.

1.3. Génération des mutants et conformité des délétions génétiques

Cinq gènes ont été retenus pour la délétion chez *P. multocida*. Compte tenu de la forte barrière génétique présente dans cette espèce, qui tend à détruire les ADN étrangers introduits, cette étape a nécessité la mise au point d'une méthodologie spécifique et inédite basée sur l'utilisation d'un plasmide suicide ciblant chacun de ces gènes. Les mutants obtenus selon notre méthodologie sont dépourvus du gène marqueur de sélection à l'antibiotique responsable de la résistance à la kanamycine. La conformité génétique de ces 7 mutants (5 simple et 2 double mutants) a été vérifiée par PCR sur leurs ADN génomiques en utilisant des couples d'amorces spécifiques situées en amont et en aval du gène d'intérêt. Les produits PCR ont été analysés sur gel d'électrophorèse. La délétion des gènes et l'absence du gène marqueur de la résistance à la kanamycine furent ensuite confirmées par séquençage.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'évaluation des mutants d'insertion sont détaillés en tableau 1. L'inoculum témoin non muté a provoqué de façon reproductible des mortalités au moins égale à 70% sous 4 jours; par soucis de simplification et du fait des essais multiples, les résultats des lots témoins ne sont pas mentionnés dans ce tableau. Six mutants présentaient des scores de mortalité post « vaccination » au-delà de 64%, 3 d'entre eux à 91% ; ils étaient donc fort peu atténués

alors qu'issus, lors de la STM, d'un premier criblage sur l'innocuité. Deux facteurs peuvent expliquer cet écart : le criblage initial compte tenu du nombre de souches à tester était limité à un test sur 2 animaux par souche; la souche était inoculée par voie intramusculaire et à une dose très différente (4 log₁₀ ufc/animal); l'observation clinique était également limitée à une semaine.

L'atténuation était par contre confirmée sur 17 autres mutants. Dans cette population et en cas d'atténuation partielle, la sélection de cibles à évaluer par délétion (rapportées en gras dans le tableau 1) a également pris en compte le score clinique de protection. Nous estimions en effet qu'une délétion complète pourrait atténuer plus fortement qu'une inactivation de gène par insertion, du fait dans ce cas de l'absence de production de protéine tronquée et des impacts possibles de traduction en aval du gène délété. Les gènes finalement retenus étaient *fimA*, *htpG*, *plpE* et *hyaE*, les scores d'innocuité des mutants d'insertion correspondants variant de 0 à 20% de mortalité, et d'efficacité, de 63 à 100% de protection. Une autre cible de scores similaires n'a pas pu être poursuivie (Pm0989). Cette délétion s'est avérée difficile, ce gène jouant probablement un rôle important pour la bactérie. Une 5ème cible de type contrôle a été ajoutée arbitrairement: le gène *aroA* dont la délétion et ses effets étaient déjà décrits dans plusieurs genres bactériens (Tatum and Briggs, 2005 ; Homchaupa *et al.*, 1997). Pour la suite des essais, des délétions dirigées ont été induites dans la souche virulente d'origine par des techniques qui ne font pas l'objet de cette communication. La réalité de ces délétions est toutefois illustrée en figure 1 par comparaison des longueurs de séquences génétiques entourant la zone concernée. Les fragments amplifiés des souches délétées furent tous comme attendu de taille inférieure à ceux de la souche sauvage. L'évaluation clinique de ces mutants délétés est rapportée en tableau et figure 2. L'innocuité de ces souches était largement confirmée, à l'exception de la délétion du gène *plpE* ; Une virulence résiduelle proche de 50% était constatée alors que les résultats sur le mutant d'insertion étaient de 0%. Le rôle délétère d'une protéine PlpE tronquée ou de l'expression non régulée d'une séquence codante apportée par Tn10 pourrait être à l'origine de cet écart d'observation. Le gène *plpE* code pour une protéine membranaire très immunogène sur modèles souris et poulets, mais qui n'est pas un facteur de virulence essentiel (Hatfaludi *et al.*, 2012), ceci est en faveur d'une atténuation incomplète liée à cette délétion.

Comme attendu pour la délétion du gène *aroA*, ce

mutant métabolique auxotrophe pour Tyr, Phe et Trp et incapable de survivre très longtemps *in vivo* après vaccination, possédait une excellente innocuité (100%) et un niveau de protection très satisfaisant après épreuve (80%).

L'innocuité déjà excellente sur les autres mutants n'était pas modifiée sur les mutants doubles; En revanche l'efficacité était alors réduite. Ceci fut particulièrement sensible pour la construction $\Delta fimA-\Delta plpE$ dont le score de protection tombait d'environ 80 à 10%. L'absence cumulée des protéines PlpE et FimA (adhésine), toutes deux connues pour leur fort pouvoir immunogène (Hatfaludi *et al.*, 2012 ; Hur *et al.*, 2014) est probablement la cause de cette observation. Le mutant $\Delta aroA-\Delta plpE$ montrait quant à lui une efficacité proche des mutants simples correspondants.

Au total les délétions *hyaE*, gène impliqué dans la synthèse de la capsule (Boyce *et al.*, 2000) et *fimA* (rôle dans l'interaction hôte-pathogène) assuraient une atténuation importante similaire à celle constatée avec *aroA*; L'efficacité correspondante était également comparable (70 à 80%). Il est connu que les altérations de la synthèse de capsule conduisent à l'atténuation des bactéries et en particulier de *P. multocida* (Boyce *et al.*, 2000). L'absence de capsule chez ces mutants *hyaE* et ou *hyaC* pourraient également permettre une meilleure exposition d'autres immunogènes de surface tel que PlpE par exemple (Boyce *et al.* 2000) expliquant ainsi la bonne immunogénicité observée. Dans le cas de *fimA* un défaut d'interaction hôte-pathogène pourrait avoir comme conséquence de mieux exposer ce type de mutant aux cellules du système immunitaire, mais ceci reste hypothétique.

La délétion du gène *htpG* entraînait également une atténuation forte de la virulence de la souche (100%) accompagnée d'une faible efficacité (30%). Bien que la fonction de ce gène soit mal connue chez *P. multocida*, son produit est décrit comme une protéine induite en réponse à un stress à la chaleur (*hsp90*) connue pour son rôle essentiel dans la virulence de certaines bactéries (Weiss *et al.*, 2007 ; King *et al.*, 2013 ; Sweier *et al.*, 2003).

CONCLUSION

La recherche de cible d'atténuation de *P. multocida* par délétion de facteur de virulence a permis d'obtenir un résultat comparable à l'atteinte de voies métaboliques telles celles de la synthèse des acides aminés aromatiques. Ces deux approches complémentaires pourraient permettre la construction de souches vaccinales délétées sûres et immunogènes comme qu'illustré ici de façon préliminaire par les résultats du mutant double $\Delta aroA-\Delta plpE$.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Boyce et al., 2000 Infect Immun. Jun;68(6):3463-8
2. Hatfaludi et al., 2012 PLoS One. 7(7):e39973
3. Hensel et al., 1995 Science, 269, pp. 400–403
4. Homchaupa et al., 1997 Vaccine. Feb;15(2):203-8
5. Hur et al., 2014 Can J Vet Res. Oct;78(4):297-303
6. King et al., 2013, Infect Immun. Mar;82(3):1123-31
7. Merial 2002, Brevet Européen 02290861.0
8. Sweier et al., 2003, FEMS Microbiol Lett. Aug 8;225(1):101-6
9. Tatum and Briggs, 2005 Appl Environ Microbiol. Nov;71(11):7196-202
10. Weiss et al., 2007, Ann N Y Acad Sci. Jun;1105:219-37

Tableau 1. Evaluation clinique de 23 mutants d'insertion; identité du gène touché et fonction détectée par recherche *in silico*.

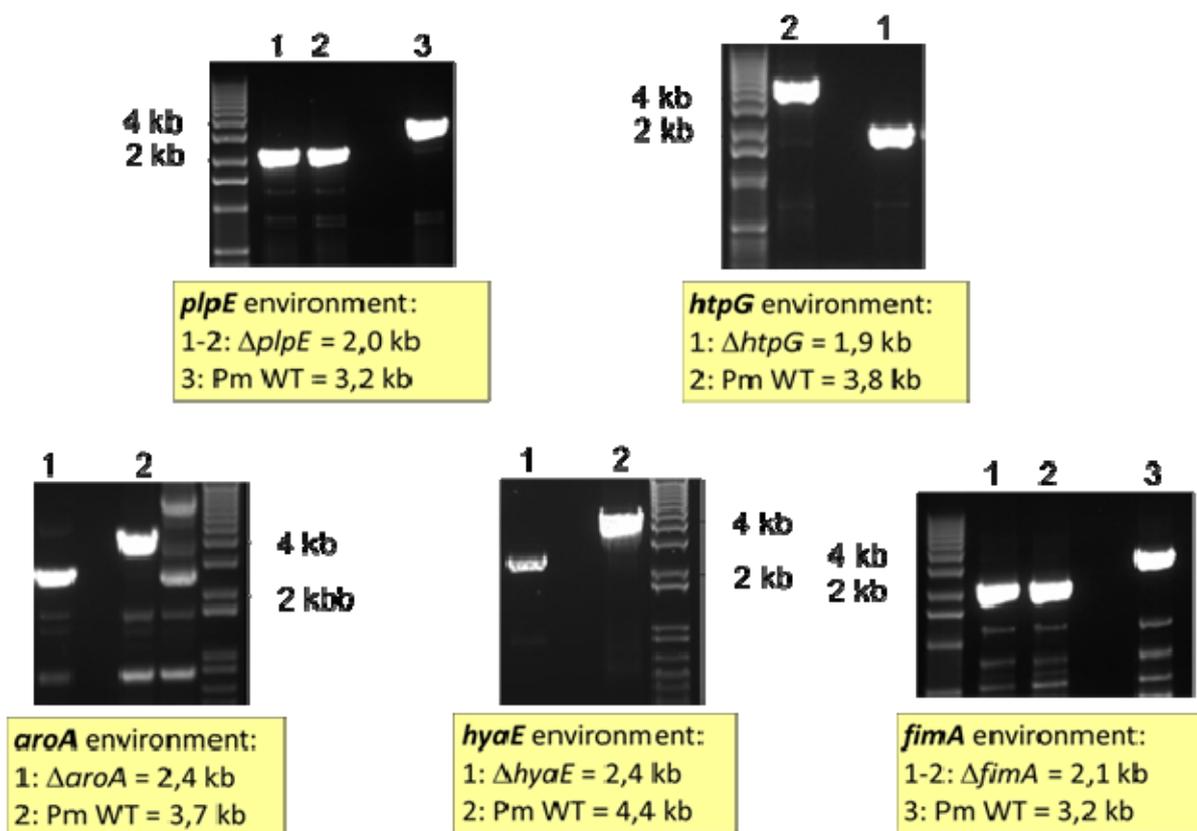
Gène	Fonction/commentaire	Innocuité: % mortalité PV Efficacité: % protection PE
pm0605	Méthionine sulfoxyde réductase A	91%/...NA
pm1138	inconnue	91%/...NA
<i>fimA</i>	Adhérence	0%/81%
<i>hktE</i>	Catalase	73%/...NA
<i>htpG</i>	Réponse au Stress – Hsp90	18%/100%
<i>deaD</i>	hélicase ARN ATP dépendante	45%/100%
<i>nrdD</i>	ribonucléoside triphosphate réductase anaérobique	91%/...NA
<i>pgtB</i>	Phosphoglycerate transport system sensor protein	73%/...NA
<i>speF</i>	Ornithine décarboxylase	64%/...NA
pm0989	protéine membranaire putative	3%/83%
<i>plpE</i>	protéine membranaire externe	0%/81%
Rpl31-rpmE2	protéine L31- unité ribosomale 50S	0%/20%
<i>hyaE</i>	Capsule	20%/63%
<i>lepA</i>	GTP-binding protein	20%/50%
pm1727	Histidinol phosphatase	0%/20%
<i>nifR3</i>	inconnue	0%/30%
<i>uvrA</i>	Réparation de l'ADN– Excinuclease ABC	0%/40%
<i>phyA</i>	Capsule	20%/25%
<i>hyaC</i>	Capsule	0%/40%
<i>plp4</i>	protéine membranaire externe	40%/83%
pm0871	protéine membranaire putative	0%/50%
<i>rumA</i>	23S rRNA 5-méthyluridine méthyltransférase	0%/40%
pm0503	inconnue	0%/20%

PV : post vaccination ; PE : post épreuve ; NA : non applicable

Tableau 2. Evaluation clinique de 7 mutants construits par délétion (mutation simple ou double) ; scores de fin de période d'observation

Mutant et identité du gène délété (Δ xxx)	Numéro d'étude	Vaccination Dose (log10 ufc/dinde)	Epreuve Dose (log10 ufc/dinde)	Innocuité % d'animaux en bonne santé post vaccination	Efficacité % d'animaux survivants à l'épreuve
Δ <i>fimA</i>	1	8	8	100%	90%
	2	8	8	100%	70%
Δ <i>plpE</i>	1	8	8	60%	100%
	2	8	8	56%	60%
Δ <i>htpG</i>	1	8	8	100%	30%
Δ <i>hyaE</i>	3	8	7	100%	70%
Δ <i>aroA</i>	4	8	8	100%	80%
Δ <i>fimA</i> - Δ <i>plpE</i>	5	8	8	100%	10%
Δ <i>aroA</i> - Δ <i>plpE</i>	3	8	7	100%	70%

Figure 1. Vérification de la conformité des délétions génétiques obtenues



Δxxx : souche délétee pour le gène mentionné ; Pm WT : *Pasteurella multocida* souche d'origine 16084

Figure 2. Evaluation clinique de 7 mutants construits par délétion (mutation simple ou double) ; cinétique des mortalités post-épreuve

