

# THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

## Résumé

---

- Orientation:** Santé et Productions animales
- Titre de la thèse en français :** Etude de l'activité et des effets des inhibiteurs du facteur nucléaire  $\kappa$ B dans la mammite à *Staphylococcus aureus*
- Titre de la thèse en anglais :** NF- $\kappa$ B activity and effects of NF- $\kappa$ B inhibitors in *Staphylococcus aureus* mastitis.
- Candidat :** Delphine BOULANGER
- Promoteur :** Professeur Pierre LEKEUX
- Co-promoteur :** Dr Fabrice BUREAU
- Département et Service :** Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique
- Date de la défense publique :** 20 décembre 2006
- Composition du Jury :**
- Membres du comité de thèse :*  
Docteur F. Bureau, Professeur P. Lekeux, Professeur A. Vanderplasschen, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique  
Professeur M.-P. Merville, Département de Pharmacie, Université de Liège, Belgique
- Membres extérieurs à la faculté :*  
Professeur Chr. Burvenich, Département de Physiologie et de Biométrie, Faculté de Médecine vétérinaire, Gand, Belgique  
Professeur D. Portetelle, Service de Biologie animale et microbienne, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique
- Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :*  
Professeur N. Antoine, L. Grobet, Chr. Hanzen, J. Mainil, F. Rolin

### DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

La mammite, inflammation de la glande mammaire, est la maladie la plus commune et la plus coûteuse dans l'industrie laitière (Bradley, 2002). En fonction des symptômes développés par la vache infectée, la gravité de la mammite peut se définir comme clinique (aiguë, suraiguë, chronique) ou subclinique. La mammite subclinique est une inflammation modérée mais persistante, ce qui engendre

de nombreuses pertes économiques pour l'éleveur. Ces pertes incluent les coûts associés à la diminution de la production de lait, au lait rejeté dû à l'utilisation de traitements antibiotiques, aux frais vétérinaires, aux coûts de réforme prématurée et aux coûts de remplacement des vaches (DeGraves et Fetrow, 1993). Les bactéries pathogènes responsables de la mammite subclinique résistent aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antibiotiques (Sandholm

*et al.*, 1990). L'une des principales bactéries responsables de la mammite subclinique est *Staphylococcus aureus* (Sutra et Poutrel, 1994).

Les 2 raisons principales de la persistance de la maladie semblent être, d'une part, le maintien d'une inflammation (boucles auto-activatrices) qui engendre des effets destructeurs plutôt que protecteurs et, d'autre part, la capacité qu'ont certaines bactéries à pénétrer à l'intérieur des cellules hôtes où elles se protègent des défenses

ses immunitaires et de l'action des antibiotiques.

Chez l'homme ainsi que dans plusieurs modèles animaux, il a été démontré qu'une molécule importante dans le maintien de l'inflammation (boucles auto-activatrices) est le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), un facteur de transcription capable d'induire l'expression de nombreuses protéines inflammatoires (Hart *et al.*, 1998 ; Bureau *et al.*, 2000). Parmi celles-ci, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , deux cytokines capables d'induire l'activation de NF- $\kappa$ B (Pahl, 1999) et, l'IL-8 et le GM-CSF, deux cytokines importantes pour le recrutement et l'activité des neutrophiles bovins (Baggiolini *et al.*, 1989 ; Brach *et al.*, 1992).

Les mécanismes moléculaires responsables de la pénétration et de la prolifération intracellulaire d'une bactérie à l'intérieur des cellules hôtes sont encore inconnus. Cependant, il a été démontré que la croissance extra- et intracellulaire de certaines bactéries, telles que *S. aureus* est augmentée en présence de cytokines pro-inflammatoires (Kanangat *et al.*, 1999 ; Meduri *et al.*, 1999 ; Kanangat *et al.*, 2001). Ces cytokines sont entre autres le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  dont l'expression dépend de l'activation de NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B semble donc être une cible thérapeutique intéressante pour améliorer ou soigner la mammite subclinique. Cependant, aucune étude réalisée à ce jour n'a permis de mettre en évidence le rôle de NF- $\kappa$ B dans la mammite et, il est indispensable de définir quel est ce rôle avant de mettre au point des nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ce facteur. Au cours de ce présent travail, nous avons dès lors tenté de répondre aux questions suivantes : (i) NF- $\kappa$ B joue-t-il un rôle au cours d'une inflammation de la glande

mammaire chez la vache (1<sup>re</sup> étude) ; (ii) l'inhibition de NF- $\kappa$ B présente-t-elle un potentiel thérapeutique dans le traitement des mammites à *S. aureus* (2<sup>e</sup> étude) ?

## RÉSULTATS

Afin de répondre à la première question, nous avons étudié l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, GM-CSF) dans les cellules de lait sain, dans les cellules de lait issu de glandes atteintes de mammite aiguë et dans les cellules de lait issu de glandes atteintes de mammite subclinique.

Des expériences de retard sur gel ont montré que l'activité de NF- $\kappa$ B était nulle dans les cellules du lait sain et, fortement augmentée dans les cellules de lait, issu de glandes atteintes de mammite aiguë. Dans les cellules du lait issu de glandes atteintes de mammite chronique, l'activité de NF- $\kappa$ B variait de moyen à fort.

L'étude de l'expression des cytokines a montré que l'IL-8 et le GM-CSF n'étaient pas exprimés dans le lait sain mais bien dans le lait issu des glandes infectées. Le niveau d'expression était élevé dans le cas de lait prélevé sur des vaches atteintes de mammite aiguë et de moyen à fort dans le cas de lait, prélevé sur des vaches atteintes de mammite subclinique.

Afin de déterminer si NF- $\kappa$ B était en relation avec l'intensité de l'inflammation, le niveau d'activité de NF- $\kappa$ B évalué dans les cellules du lait issu des glandes atteintes de mammite subclinique a été corrélé au niveau d'expression de l'IL-8 et du GM-CSF. Les résultats ont montré que le niveau d'activité de NF- $\kappa$ B était en relation avec le niveau d'expression de l'IL-8 et du GM-CSF. L'ensemble de ces résultats montre que NF- $\kappa$ B joue un rôle dans la pathogénèse de la mammite.

Afin de déterminer si l'inhibition de NF- $\kappa$ B présente un potentiel thérapeutique dans le traitement des mammites à *S. aureus*, des inhibiteurs pharmacologiques de NF- $\kappa$ B (15-dPGJ<sub>2</sub> et héliénaline) ont été testés dans des expériences *in vitro* et *in vivo*.

*In vitro*, nous avons tenté de déterminer si l'inhibition de NF- $\kappa$ B pouvait réduire ou empêcher la pénétration et/ou la prolifération de *S. aureus* à l'intérieur des cellules hôtes. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser, comme modèle d'investigation, d'une part, les cellules épithéliales mammaires bovines, les cellules MAC-T, et, d'autre part, une souche de *S. aureus* commercialisée en tant que souche bovine. Les cellules MAC-T étaient d'abord traitées par la 15-dPGJ<sub>2</sub> pendant 60 min ou par l'héliénaline pendant 90 min. Puis, du TNF- $\alpha$  était ajouté à la culture cellulaire. Trente minutes après l'ajout de TNF- $\alpha$ , les cellules MAC-T étaient alors mises en présence d'une suspension de *S. aureus* pendant 1 h. Après un traitement à la gentamicine (1 h), les cellules étaient enfin récoltées puis lysées (par ajout d'eau stérile). Le lysat cellulaire obtenu était déposé sur un milieu de culture bactérien et les colonies ayant poussé étaient comptées 24 h plus tard. Contrairement à nos attentes, l'inhibition des cellules MAC-T, via la 15-dPGJ<sub>2</sub> ne diminuait ni la pénétration, ni la prolifération de *S. aureus* à l'intérieur des cellules hôtes. Par contre, l'ajout d'héliénaline réduisait fortement la prolifération intracellulaire de *S. aureus*, et ce, que ce soit en conditions inflammatoires (MAC-T + TNF- $\alpha$ ) ou non (MAC-T – TNF- $\alpha$ ). Cette observation relative à l'héliénaline n'était pas liée à l'apoptose des cellules MAC-T, ni à un effet (inhibiteur) direct de la substance sur la croissance de *S. aureus*. Par conséquent, l'héliénaline agirait

par l'intermédiaire des mécanismes moléculaires de l'hôte. Cette étude *in vitro* suggère que l'hélenaline possède un intérêt potentiel dans la résolution d'une infection à *S. aureus*.

*In vivo*, nous avons tenté de déterminer si l'inhibition de NF-κB pouvait réduire ou empêcher le développement d'une infection intramammaire à *S. aureus*. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser, comme modèle d'investigation, le modèle murin de mammite, mis au point par Brouillette et collaborateurs (2004). Les substances inhibitrices de NF-κB (15-dPGJ<sub>2</sub> et hélenaline) ont été administrées à 2 reprises, par voie intra-péritonéale, 9 h et 3 h avant l'infection intramammaire. Puis, 12 h après l'infection, les glandes mammaires ont été récoltées et homogénéisées. Les suspensions homogènes ainsi obtenues étaient alors diluées puis, déposées (gouttes) sur un milieu de culture bactérien afin de déterminer le nombre de colonies. Contrairement à la 15-dPGJ<sub>2</sub> qui n'empêchait pas le développement de l'infection, l'hélenaline réduisait de manière significative la prolifération intra-mammaire de *S. aureus*. Ces résultats *in vivo* ont donc fourni des données supplémentaires pour émettre l'hypothèse que l'hélenaline a un potentiel thérapeutique dans la résolution des mammites associées à *S. aureus*.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de recherche, nous avons mis en évidence que NF-κB joue un rôle dans la pathogénèse de la mammite bovine et que l'hélenaline, substance pharmacologique connue pour inhiber NF-κB, réduit la prolifération de *S. aureus*.

Avant d'entamer ce présent travail de recherche, aucune étude ne s'était

encore penchée sur l'activation de NF-κB dans les cellules de lait. Notre première étude était donc une approche originale afin d'étudier les mécanismes moléculaires de l'inflammation développés au cours de la mammite bovine. Une élévation de l'activité de NF-κB étant connue pour être en relation avec une augmentation de l'expression de nombreux gènes inflammatoires, tels que l'IL-8 et le GM-CSF, nos résultats relatifs à la première étude suggèrent que NF-κB joue un rôle dans la pathogénèse de la mammite.

Le rôle de NF-κB dans le développement d'une infection intramammaire à *S. aureus* ne peut cependant être précisé sur base des résultats obtenus au cours de la 2<sup>e</sup> étude. En effet, selon l'inhibiteur de NF-κB utilisé, les résultats étaient différents. La 15-dPGJ<sub>2</sub>, utilisée *in vitro* ou *in vivo*, ne diminuait pas la prolifération *S. aureus*. L'hélenaline utilisée *in vitro* ou *in vivo*, diminuait la prolifération *S. aureus*. Sur base de ces données, il est donc impossible d'affirmer que NF-κB influence la pénétration et la prolifération intracellulaire de *S. aureus* dans les cellules hôtes. Cependant, il peut être suggéré que l'hélenaline possède un potentiel thérapeutique dans la résolution de la mammite à *S. aureus*.

L'hélenaline appartient à la famille des lactones sesquiterpènes (LS), molécules naturellement présentes dans les plantes et connues pour avoir des effets anti-inflammatoires (Lyss *et al.*, 1997). En accord avec nos résultats, deux études antérieures ont démontré qu'un traitement anti-inflammatoire pouvait réduire les infections à *S. aureus*. Meduri et collaborateurs (2001) ont montré que le traitement de cellules (stimulées au LPS) par de

la méthylprednisolone diminuait la survie et la réplication des bactéries intracellulaires, telle que *S. aureus*. Donnarumma et collaborateurs (2004) ont démontré que l'hormone stimulante α-melanocyte, exerçait des effets anti-inflammatoires qui protégeait la peau contre les infections à *S. aureus*.

Afin de préciser le rôle de l'hélenaline dans la résolution d'une mammite à *S. aureus*, des expériences supplémentaires doivent être réalisées. Il serait intéressant, par exemple, (i) de déterminer si l'hélenaline est une substance qui persiste dans le lait après traitement et, si cette substance est toxique à court et long terme ; (ii) de répéter les expériences *in vivo* sur un modèle de mammite subclinique ; (iii) d'approfondir les mécanismes moléculaires qui permettent à l'hélenaline de réduire la prolifération intracellulaire de *S. aureus*. Plusieurs hypothèses peuvent, en effet, être suggérées pour tenter d'expliquer l'effet de l'hélenaline sur la prolifération de *S. aureus*. Premièrement, il a été démontré que les LS inhibent l'expression du TNF-α, de l'IL-1β (Hwang *et al.*, 1996), de l'IL-6 (Bork *et al.*, 1997), de l'IL-12 (Kang *et al.*, 2001), de l'IL-2, du GM-CSF, et de l'IFN-γ (Gertsch *et al.*, 2003). Par conséquent, sachant que les cytokines pro-inflammatoires augmentent la croissance intracellulaire de *S. aureus* (Kanangat *et al.*, 1999 ; Meduri *et al.*, 1999 ; Kanangat *et al.*, 2001), il peut être suggéré que l'hélenaline réduit la prolifération de *S. aureus* via une diminution de l'expression en cytokines. Deuxièmement, les LS inhibent la phosphorylation des protéines ERK 1 et ERK 2 (Hwang *et al.*, 1996), deux membres de la famille des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinase*), dont

la phosphorylation est requise à l'internalisation de *S. aureus* (Ellington *et al.*, 2001). Troisièmement, il est possible que l'inhibition de NF- $\kappa$ B altère l'expression de certaines protéines de l'hôte, indispensables à la réplication intracellulaire de *S. aureus*. D'autres études ont déjà démontré que l'inhibition de NF- $\kappa$ B pouvait améliorer une maladie infectieuse. Sheehan et collaborateurs (2002) ont démontré que l'amélioration de la survie de souris traitées aux LS et

stimulées à l'endotoxine était corrélée à l'inhibition de NF- $\kappa$ B. De même, Liu et collaborateurs (1997 ; 1999) ont montré un effet thérapeutique de l'inhibition de NF- $\kappa$ B dans un modèle expérimental de septicité.

Afin de déterminer si NF- $\kappa$ B influence la pénétration et/ou la multiplication intracellulaire de *S. aureus*, il serait intéressant de tester d'autres inhibiteurs de NF- $\kappa$ B que l'hélenaline ou la 15-dPGJ2, qui donnent des résultats totalement opposés.

*S. aureus* est un des principaux germes responsables de la mammite subclinique et, par conséquent, engendre d'importantes pertes économiques. Les traitements antibiotiques actuels sont inefficaces et de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires pour éradiquer ces infections. Nos résultats suggèrent que l'hélenaline peut être une substance d'intérêt dans le traitement des mammites induites par *S. aureus*.

## REFERENCES

- BAGGIOLINI M., WALZ A., KUNKEL S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84**, 1045-1049.
- BORK P.M., SCHMITZ M.L., KUHN M., ESCHER C., HEINRICH M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- $\kappa$ B. *FEBS Lett.*, 1997, **402**, 85-90.
- BRACH M.A., DEVOS S., GRUSS H.-J., HERRMANN F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*, 1992, **11**, 2920-2924.
- BRADLEY A.J. Bovine mastitis : an evolving disease. *Vet. J.*, 2002, **164**, 116-128.
- BROUILLETTE E., GRONDIN G., LEFEBVRE C., TALBOT B.G., MALOUIN F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.*, 2004, **101**, 253-262.
- BUREAU F., DELHALLE S., BONIZZI G., FIEVEZ L., DOGNE S., KIRSCHVINK N., VANDERPLASSCHEN A., MERVILLE M.-P., BOURS V., LEKEUX P. Mechanisms of persistent NF- $\kappa$ B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.*, 2000, **165**, 5822-5830.
- DONNARUMMA G., PAOLETTI I., BUOMMINO E., TUFANO M.A., BARONI A. Alpha-MSH reduces the internalization of *Staphylococcus aureus* and down-regulates HSP 70, integrins and cytokine expression in human keratinocyte cell lines. *Exp. Dermatol.*, 2004, **13**, 748-754.
- DEGRAVES F.J., FETROW J. Economics and mastitis control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 1993, **9**, 421-434.
- ELLINGTON J.K., ELHOFY A., BOST K.L., HUDSON M.C. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *Staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts. *Infect. Immun.*, 2001, **9**, 5235-5242.
- GERTSCH J., STICHER O., SCHMIDT T., HEILMANN J. Influence of helenanolide-type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**, 2141-2153.
- HART L.A., KRISHNAN V.L., ADCOCK I.M., BARNES P.J., CHUNG K.F. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor- $\kappa$ B, in asthma. *Am. J. Crit. Care Med.*, 1998, **158**, 1585-1592.
- HWANG D., FISCHER N.H., JANG B.C., TAK H., KIM J.K., LEE W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, **226**, 810-818.
- LIU S.F., YE X., MALIK A.B. In vivo inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J. Immunol.*, 1997, **159**, 3976-3983.
- LIU S.F., YE X., MALIK A.B. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents I- $\kappa$ B degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs. *Mol. Pharmacol.*, 1999, **55**, 658-667.

- KANANGAT S., MEDURI G.U., TOLLEY E.A., PATTERSON D.R., MEDURI C.U., PAK C., GRIFFIN J.P., BRONZE M.S., SCHABERG D.R. Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 2834-2840.
- KANANGAT S., BRONZE M.S., MEDURIG.U., POSTLETHWAITE A., STENTZ F., TOLLEY E., SCHABERG D. Enhanced extracellular growth of *Staphylococcus aureus* in the presence of selected linear peptide fragments of human interleukin (IL)-1beta and IL-1 receptor antagonist. *J. Infect. Dis.*, 2001, **183**, 65-69.
- KANG B.Y., CHUNG S.W., KIM T.S. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by parthenolide, a predominant sesquiterpene lactone in *Tanacetum parthenium*: involvement of nuclear factor-kappaB. *Immunol. Lett.*, 2001, **77**, 159-163.
- LYSS G., SCHMIDT T.J., MERFORT I., PAHL H.L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kappaB. *Biol. Chem.*, 1997, **378**, 951-961.
- MEDURI G.U., KANANGAT S., STEFAN J., TOLLEY E., SCHABERG D. Cytokines IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha enhance *in vitro* growth of bacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, 961-967.
- MEDURI G.U., KANANGAT S., BRONZE M., PATTERSON D.R., MEDURI C.U., PAK C., TOLLEY E.A., SCHABERG D.R. Effects of methylprednisolone on intracellular bacterial growth. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, **8**, 1156-1163.
- PAHL H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, **18**, 6853-6866.
- SANDHOLM M., KAARTINEN L., PYÖRÄLÄ S. Bovine mastitis: why does antibiotic therapy not always work? an overview. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 1990, **13**, 248-260.
- SHEEHAN M., WONG H.R., HAKE P.W., MALHOTRA V., O'CONNOR M., ZINGARELLI B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol. Pharmacol.*, 2002, **61**, 953-963.
- SUTRA L., POUTREL B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 79-89.

## PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- BOULANGER D., BUREAU F., MELOTTE D., MAINIL J., LEKEUX P. Increased nuclear factor kappaB activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 1259-1267.
- BOULANGER D., BROUILLETTE E., JASPAR F., MALOUIN F., MAINIL J., BUREAU F., LEKEUX P. Helenalin reduces *Staphylococcus aureus* infection *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Microbiol.*, 2007, **119**, 330-338.

## REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée grâce aux financements octroyés par le Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture, par Janssen Animal Health (Belgique) et par le Service public fédéral-Santé publique.