



ACTION N°5

Lutte contre les mammites : La piste des probiotiques

Identification des espèces de bactéries lactiques associées à l'écosystème mammaire des bovins laitiers biologiques en vue de développer un probiotique mammaire

Maître d'œuvre : UMR 1253 INRA - Agrocampus Ouest STLO Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes

Partenaires : Initiative Bio Bretagne, Réseau GAB/FRAB, Chambres d'Agriculture de Bretagne, Centre International de Ressource Microbienne - Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA, structure hébergée au sein du STLO, certifiée ISO9002 ayant pour objectif la conservation et l'étude de la biodiversité des écosystèmes bactériens associés aux denrées alimentaires)

Durée du programme : 2^{ème} année du programme / 2 ans

Contexte et enjeux de l'action

Les mammites sont le plus souvent liées à des infections intra-mammaires. Elles représentent un problème sanitaire majeur chez les ruminants et provoquent de lourdes pertes économiques pour la filière laitière. Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est un des principaux pathogènes impliqués dans ces infections dont la prévention (vaccinale) et le traitement (antibiothérapie) se montrent pour l'heure assez inefficaces. De plus, l'usage des antibiotiques est limité en Agriculture Biologique et doit être restreint dans l'ensemble des systèmes d'élevage en raison du risque d'émergence et de propagation de souches résistantes et des conséquences directes en santé publique. Il y a donc un réel besoin de moyens alternatifs et non-antibiotiques de lutte contre les mammites dans le cadre d'une agriculture durable, respectueuse des hommes et de l'environnement.

Le concept émergent de lutte biologique et de probiotique mammaire constitue une voie à explorer. Les probiotiques sont utilisés aujourd'hui dans certains écosystèmes naturels, tels que les écosystèmes intestinal et vaginal. Ce sont des écosystèmes riches qui doivent rester équilibrés pour exercer leur rôle positif et notamment leur rôle barrière vis-à-vis des pathogènes. Un déséquilibre de la composition et/ou de l'abondance de l'écosystème (dysbiose) est susceptible d'augmenter la fréquence d'infections par des espèces pathogènes. L'introduction de flores probiotiques favorise généralement un retour à l'équilibre de l'écosystème et la restauration



de son rôle barrière. L'effet bénéfique des probiotiques peut reposer sur un effet antagoniste direct sur les flores d'altération ou les pathogènes (inhibition de leur croissance ou de leur virulence), ou indirect (compétition pour les nutriments ou la colonisation du site, stimulation du système immunitaire).

Le développement de probiotiques repose généralement sur l'isolement de bactéries candidates de l'écosystème ciblé, dans la mesure où ces isolats sont, a priori, adaptés à cet environnement. Pour l'heure, l'écosystème microbien de la mamelle de vache n'a été que très peu étudié. La littérature scientifique fait état de quelques études décrivant la diversité microbienne au niveau du canal du trayon chez la vache (Espeche et al. 2009). Une étude récente reposant sur des approches métagénomiques (identification de la flore présente par séquençage global de l'ADN extrait, sans séparation préalable des composantes bactériennes de l'écosystème) a caractérisé l'écosystème mammaire de vaches laitières avec ou sans mammite (Oikonomou et al. 2012). Cette étude souligne une variation de la composition de l'écosystème mammaire bovin en fonction de l'état sanitaire de l'animal et du pathogène responsable de la mammite, suggérant que la notion d'écosystèmes équilibrés ou en dysbiose s'applique au contexte de la glande mammaire bovine.

Les bactéries lactiques ont un statut d'innocuité (statut QPS : "Qualified Presumption of Safety"). Elles sont utilisées depuis des milliers d'années pour leurs propriétés technologiques et sont également mises en avant aujourd'hui pour leurs propriétés probiotiques pour l'homme ou l'animal. Les bactéries lactiques constituent de ce fait des candidats pertinents pour le développement de probiotiques mammaires. Elles méritent plus d'attention, d'autant que des résultats encourageants ont pu être obtenus récemment avec l'utilisation d'une souche de *Lactococcus lactis* dans le traitement des mammites chez la vache (Klostermann et al. 2008).

Objectifs

Le projet proposé avait pour objectif de **caractériser l'écosystème mammaire bovin** et en particulier d'**isoler et d'identifier les espèces de bactéries lactiques** présentes au sein de cet écosystème. Les écosystèmes microbiens mammaires de **bovins laitiers sains et souffrant de mammites ont été comparés**.

- La composition en bactéries lactiques est-elle modifiée selon le statut sanitaire de l'animal ?
- Existe-t-il des **espèces marqueurs d'un écosystème mammaire sain versus déséquilibré chez les bovins** ?
- Les **bactéries lactiques isolées de l'écosystème mammaire**, en particulier celles qui sont associées spécifiquement à un écosystème "sain", seront ensuite caractérisées de manière à établir leur **potentiel probiotique**.



Protocole

Une campagne de prélèvements a été réalisée sur 2 exploitations en partenariat avec le réseau GAB-FRAB et la Chambre Régionale d'Agriculture de Bretagne au printemps 2012. Des prélèvements ont été réalisés sur 20 vaches, sélectionnées sur la base des comptages de cellules somatiques réalisés mensuellement par le contrôle laitier. Onze vaches avaient des taux de cellules somatiques inférieurs à 300 000 cellules/mL sur la lactation en cours et sur la ou les précédentes : elles étaient considérées comme "saines". Neuf vaches présentaient des taux de cellules élevés au cours de la lactation en cours et des précédentes lactations et étaient considérées comme "sujettes aux mammites".

Après nettoyage du pis, un échantillonnage de l'écosystème du canal du trayon a été réalisé par prélèvement des premiers jets de lait et écouvillonnage de l'entrée du trayon. La population bactérienne du lait de premier jet a été évaluée sur différents milieux, de manière à avoir une estimation de la flore bactérienne totale (PCA), des staphylocoques (MSA), des entérobactéries (Mc conkey), et des flores lactiques (MRS, MRS 5.4 et M17). Les milieux M17 et MRS favorisent la croissance des bactéries lactiques sans toutefois être très sélectifs. Le milieu MRS acidifié à pH 5,4 est plus sélectif pour les lactobacilles.

Les différents échantillons ont, d'autre part, été enrichis sur différents milieux de culture favorables aux bactéries lactiques (MRS, MRS 5.4 et M17) puisensemencées par étalement sur les mêmes milieux gélosés. Les colonies bactériennes présentant des morphotypes différents ont été purifiées et mises en collection. L'identification de l'espèce bactérienne de ces isolats a été réalisée par séquençage de l'ADN 16S. L'identification des isolats nous a permis de comparer, d'un point de vue qualitatif, la composition en flore lactique de l'écosystème mammaire des vaches saines et sujettes aux mammites.

Résultats et commentaires

► Une charge bactérienne des laits de premier jet plus élevée pour les trayons infectés

Dans les échantillons de 1^{er} jet, la flore mésophile totale (poussant à 30°C sur le milieu non sélectif PCA) est évaluée entre 10 à 4.10⁵ UFC/mL (Unité Formant Colonie par mL).

Cf. Figure 1 ►

Les numérations sur différents milieux de culture sélectifs révèlent une grande variabilité inter-animale, avec des différences de plusieurs log¹⁰ entre vaches pour un même milieu, indépendamment de l'état sanitaire des animaux. Les staphylocoques (dorés ou non) peuvent atteindre une population relativement importante (7,5.10³ CFU/mL), alors que les populations de lactobacilles et d'entérobactéries ne dépassent pas 50 et 300 UFC/mL respectivement.

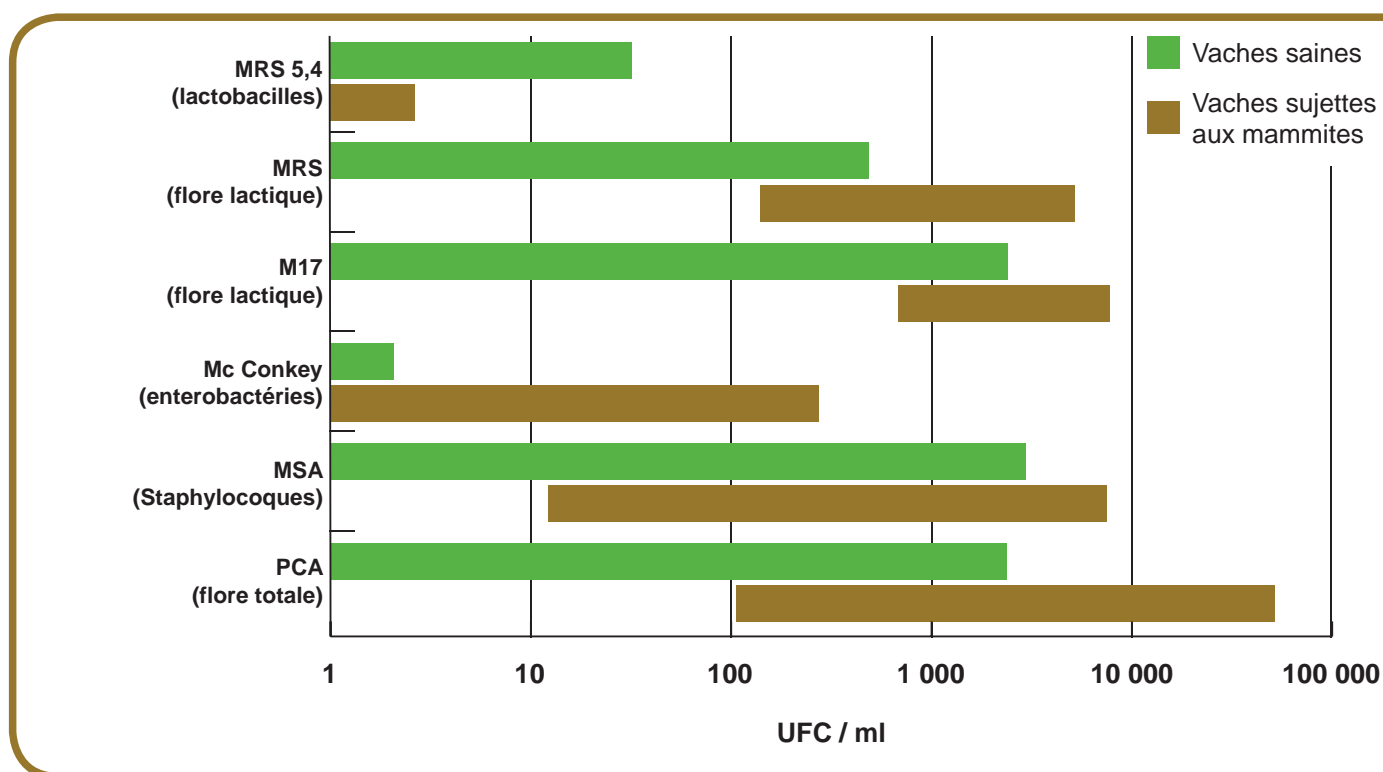


Figure 1 : Dénombrement de la flore bactérienne des laits de premier jet pour les vaches sujettes aux mammites et les vaches saines

Les barres indiquent la gamme de dénombrement sur chaque milieu. PCA : milieu non sélectif permettant d'évaluer la flore totale - MSA : milieu sélectif pour les staphylocoques - Mc Conkey : milieu sélectif pour les enterobactéries (*E. coli* par ex) - M17 et MRS : milieux favorables à la croissance des bactéries lactiques - MRS pH 5.4 : milieu sélectif pour les lactobacilles.

Les données ont été analysées en considérant la répartition des animaux en fonction de leur état sanitaire ou du troupeau auquel ils appartiennent. L'analyse statistique ne révèle aucune différence significative de la charge bactérienne entre les deux exploitations quel que soit le milieu de numération considéré. Par contre, les vaches saines ont des taux statistiquement plus faibles de flores sur la plupart des milieux.

► Bilan de la collecte

La campagne de prélèvement nous a permis de collecter 192 isolats. Sur ces 192 isolats, 135 ont pu être identifiés au niveau de l'espèce et 29 au niveau du genre seulement. Un tri des isolats potentiellement redondants (isolés d'une même vache mais sur différents milieux ou à partir d'un échantillonnage différent - 1^{er} jet et écouvillonnage) a été effectué de manière à établir, pour chaque vache, la liste des espèces identifiées. Cette sélection a permis de conserver 38 isolats pour les vaches saines et 38 pour les vaches sujettes à mammite

Cf. Tableau 1 ►



Tableau 1 : Distribution des isolats de vaches saines et sujettes aux mammites

Nombre d'isolats de...	vaches sujettes aux mammites		vaches saines	
		%		%
Enterobactéries	3	8%	4	11%
<i>Escherichia coli</i>	3	8%	3	8%
<i>Klebsiella oxytoca</i>			1	3%
Enterocoques	10	26%	12	32%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	3%		
<i>Enterococcus faecium</i>	3	8%	4	11%
<i>Enterococcus hirae</i>	2	5%	2	5%
<i>Enterococcus sp</i>	4	11%	6	16%
Lactobacilles	9	24%	8	21%
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	8%	1	3%
<i>Lactobacillus casei</i>	2	5%		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	11%	7	18%
Lactocoques	2	5%	3	8%
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	3%	3	8%
<i>Lactococcus lactis</i>	1	3%		
Staphylocoques	1	3%	2	5%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3%		
<i>Staphylococcus sp</i>			2	5%
Streptocoques	13	34%	9	24%
<i>Streptococcus infantarius</i>	7	18%	6	16%
<i>Streptococcus parauberis</i>			1	3%
<i>Streptococcus uberis</i>	3	8%	1	3%
<i>Streptococcus sp</i>	3	8%	1	3%
Total	38	100%	38	100%

► **Pas d'espèces lactiques marqueurs de l'état sanitaire du trayon**

Parmi les isolats identifiés après enrichissement sur milieu favorable à la croissance des bactéries lactiques (M17 et MRS), nous retrouvons les mêmes espèces dans les 2 groupes d'animaux et dans des proportions similaires.



Ainsi, nous retrouvons une majorité d'entérocoques (32% et 26% des isolats chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement) et de streptocoques (24 et 34% des isolats chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement).

Cf. Figure 2 et Tableau 1

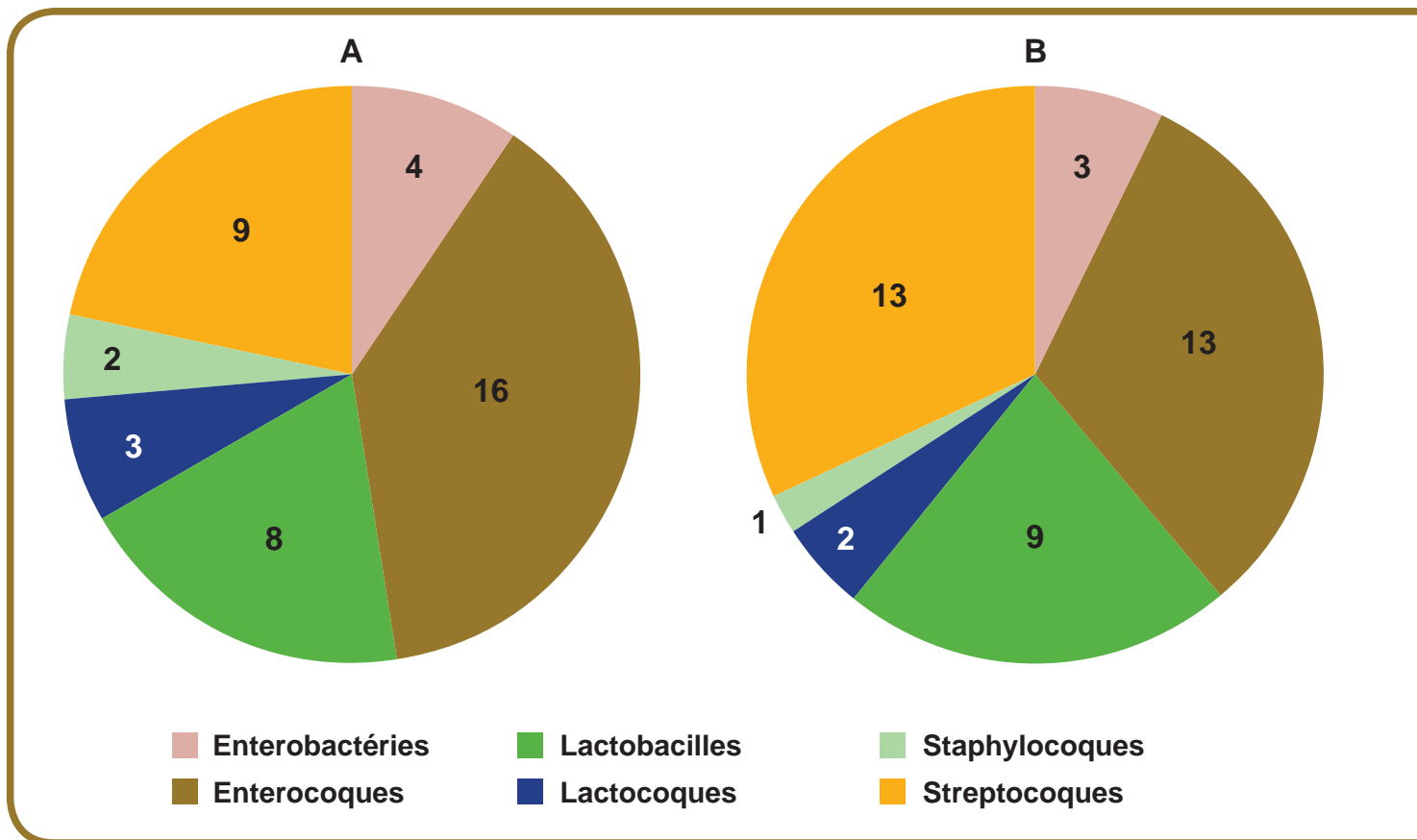


Figure 2 : Distribution des isolats de vaches saines (A) et sujettes à mammites (B)

Les lactobacilles sont également fortement représentés parmi les isolats (21 et 24% des isolats chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement). Nous avons également isolé des espèces non lactiques sur les milieux utilisés dans la mesure où ces milieux sont favorables à la croissance des bactéries lactiques mais non strictement sélectifs. Ainsi, quelques coliformes et staphylocoques ont été isolés.

En conclusion, la composition, d'un point de vue qualitatif, en flores lactiques (lactocoques, lactobacilles, enterocoques, streptocoques) ne semble pas fortement altérée chez les vaches sujettes aux mammites. En particulier, les lactobacilles connus pour exercer un rôle probiotique dans d'autres écosystèmes sont présents



dans les 2 types d'écosystème. De même, l'espèce *Streptococcus uberis*, un des principaux agents responsables de mammites, est présente dans les deux types d'écosystèmes. L'analyse au niveau de l'espèce révèle toutefois une légère différence : en effet, des isolats correspondant à *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis* ont été isolés chez des vaches sujettes aux mammites alors que ces espèces ne sont pas retrouvées chez les vaches saines.

Cette observation demande à être validée sur un plus grand échantillonnage, le nombre d'isolats correspondant à ces 2 espèces étant très limité.

Nos travaux ne permettent donc pas de faire ressortir, à l'heure actuelle, d'espèces de flores lactiques marqueurs de l'état sanitaire. Toutefois, il est important de noter ici qu'il s'agit d'une comparaison qualitative (les mêmes espèces sont retrouvées chez les vaches saines et sujettes aux mammites) mais non quantitative (les bactéries lactiques ont été isolées après enrichissement sur milieux sélectifs). Les proportions des différentes espèces ne sont peut-être pas conservées.

Recommandations pratiques issues de l'action - mise en perspectives avec les enjeux de la filière

Conclusion et perspectives

Cette campagne de prélèvements a permis de collecter 192 isolats du trayon de vaches. L'analyse qualitative de ces isolats n'a pas permis de conclure à l'existence de flores lactiques marqueurs de l'état sanitaire de l'animal (sain ou sujet aux mammites).

Toutefois, si les espèces retrouvées sont les mêmes, il est possible que les proportions de ces différentes espèces soient modifiées en fonction de l'état sanitaire.

La caractérisation de l'écosystème mammaire bovin se poursuit actuellement dans le cadre d'un projet du métaprogramme INRA MEM (Métagénomique et Ecosystèmes Microbiens) intitulé "Milk Ecosystem and Udder Health" (Ecosystème du lait et santé de la mamelle). Ce projet explore la composante bactérienne de l'écosystème mammaire bovin par une approche métagénomique, ce qui devrait nous apporter des éléments de réponses sur la composition qualitative et quantitative de l'écosystème en lien avec l'état sanitaire du trayon.

D'autre part, parmi les isolats collectés, nous avons retenu les 22 souches de lactocoques et lactobacilles pour poursuivre nos travaux. L'évaluation du potentiel probiotique de ces souches est en cours (capacité à inhiber la croissance des pathogènes responsables des mammites (*E. coli*, *S. aureus*, *S. uberis*), à inhiber la colonisation du tissu mammaire, à stimuler le système immunitaire).



Contact :

Sergine EVEN, Damien BOUCHARD, Yves LE LOIR

Rédigé d'après les travaux de **Taous SARAoui** (stage de Master 2) et **Damien BOUCHARD** (Doctorant)

UMR 1253 INRA - Agrocampus Ouest

STLO Science et technologie du lait et de l'œuf

Tél. : 02 23 48 59 44

sergine.even@rennes.inra.fr

www.rennes.inra.fr/stlo



Reference List

Espeche, M. C., M. C. Otero, F. Sesma and M. E. Nader-Macias. 2009. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet. Microbiol.* 135: 346-357.

Klostermann, K., F. Crispie, J. Flynn, R. P. Ross, C. Hill and W. Meaney. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75: 365-373.

Oikonomou, G., V. S. Machado, C. Santisteban, Y. H. Schukken and R. C. Bicalho. 2012. Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. *PLoS One.* 7: e47671.