

PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Une approche nouvelle et innovante en dermatologie et otologie vétérinaire.

Emmanuel Bensignor (1) - Sébastien Viaud (2)

(1) Spécialiste en dermatologie, Dip ECVD, DESV Dermatologie

(2) Spécialiste en dermatologie, Dip ECVD

Les infections bactériennes représentent une des causes principales de consultation en dermatologie et otologie chez le chien et le chat ¹. La bactérie la plus fréquemment rencontrée en dermatologie vétérinaire est *Staphylococcus pseudintermedius*, qui est retrouvé à l'état naturel sur la peau ou le tractus gastro-intestinal de la majorité des chiens dans des niches écologiques ¹ (cf. photo 1). Sous l'effet de différents facteurs, ces bactéries se multiplient et infectent la peau, provoquant des pyodermites bactériennes ou des otites, plus ou moins graves.

Les progrès médicaux et le développement de nouvelles molécules antibiotiques ont, dans le passé, significativement réduit la mortalité et la morbidité associées aux infections bactériennes. Toutefois deux phénomènes nouveaux compliquent cette situation : l'apparition et la diffusion de plus en plus fréquente de bactéries antibiorésistantes et la quasi-absence de développement de nouvelles molécules antibiotiques depuis une dizaine d'années. En conséquence des infections auparavant simples à soigner deviennent de plus en plus difficiles, voire impossibles, à traiter².



Photo 1 :
Culture de *Staphylococcus pseudintermedius*.
Crédit : E. Bensignor

Il s'agit d'un problème à l'échelle européenne et mondiale ³ dont l'importance dans le domaine vétérinaire dépasse la seule santé de l'animal : les aliments et le contact direct avec les animaux peuvent ainsi représenter un vecteur de transmission de l'antibiorésistance de l'animal à l'homme. Au cours des 10 dernières années, la prise de conscience concernant la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les animaux de compagnie, ainsi que les effets possibles sur la santé humaine, a été en constante augmentation.

Ceci est, en partie, dû à une augmentation des prescriptions d'antibiotiques pour les animaux, alors qu'elles ne sont pas toujours nécessaires, ou encore à de mauvaises habitudes de prescription des antibiotiques en médecine vétérinaire.

Au vu de cette problématique, le besoin de développer de nouveaux agents antimicrobiens augmente, et des efforts importants ont été faits par l'industrie pharmaceutique pour trouver des approches différentes, efficaces, qui puissent être utilisées comme une alternative aux antibiotiques lorsque ceux-ci ne sont pas strictement nécessaires.

Une option prometteuse, à ce jour, est le développement de peptides antimicrobiens (AMP- Anti Microbial Peptides ou PAM- Peptides AntiMicrobiens).

LES RÉSISTANCES EN DERMATOLOGIE

STAPHYLOCOQUES RÉSISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES : une problématique d'actualité

Jusqu'à récemment, les staphylocoques étaient considérés comme faciles à éradiquer, car sensibles à la plupart des antibiotiques utilisés en routine en dermatologie. Toutefois, depuis une dizaine d'années, de nombreux rapports font état du développement de souches résistantes⁴. On retrouve également plus anecdotiquement en dermatologie/otologie canine d'autres espèces résistantes qui méritent également notre attention, no-

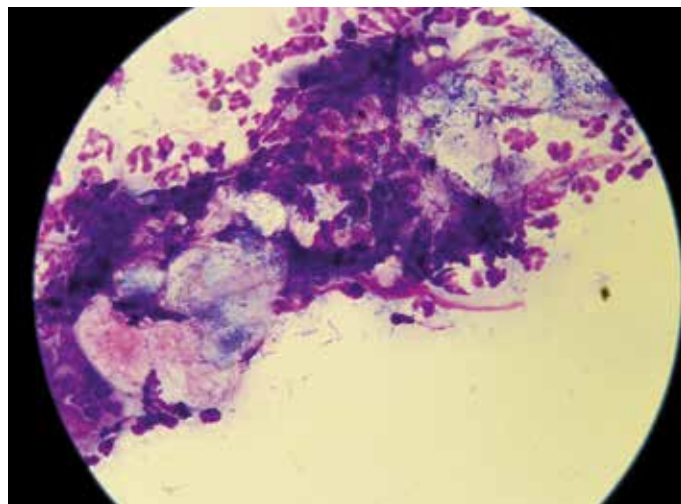


Photo 2 :
Cytologie d'une otite à *Pseudomonas* (nombreux bacilles).
Crédit : T. Hazan

tamment des bactéries gram négatif (*Pseudomonas* et *Proteus*) en cas d'otite (cf. photo 2)⁵.

L'apparition, ou plutôt la sélection, d'espèces bactériennes résistantes aux antibiotiques est un sujet de préoccupation majeur en médecine depuis plusieurs années. Parmi les différents types d'acquisition et de transmission de facteurs de résistance, la résistance à la méthicilline, due à la production par les staphylocoques d'une protéine de liaison aux pénicillines, la PLP2a, qui permet la survie de la bactérie en présence de l'antibiotique, est une des plus étudiées et des plus problématiques en clinique. La production de la PLP2a est due à l'acquisition par la bactérie du gène *mecA*, qui est véhiculé par le SCCmec (« Staphylococcal Cassette Chromosome mec »), un élément génétique mobile qui s'intègre dans le chromosome bactérien.

Pour *S. aureus*, cinq types de SCCmec (I à V) ont été identifiés, qui diffèrent par leur taille et leur composition génétique. Il est possible de déterminer par PCR la présence du gène *mecA* et le type de SCCmec¹. Les

staphylocoques méti-R identifiés à ce jour chez le chien appartiennent aux espèces *S. aureus* (SARM, pour *S. aureus* résistant à la méthicilline), *S. pseudintermedius* (SPRM, pour *S. pseudintermedius* résistant à la méthicilline), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* et à d'autres espèces de Staphylocoques à coagulase négative⁶.

Il semble par ailleurs que ces souches aient une tendance à la polyrésistance : on retrouve en effet de plus en plus fréquemment des résistances multiples aux antibiotiques, notamment aux fluoroquinolones, aux macrolides, aux aminoglycosides et aux tétracyclines⁷.

LES SARM

L'isolement de SARM est signalé chez le chien depuis de nombreuses années. Ces bactéries peuvent être rencontrées en cas de pyodermite mais également chez des chiens sains, au niveau de sites de portage (museau, cavité buccale, anus, muqueuse nasale). Il semble que ces souches soient acquises à partir de l'humain, plusieurs études ayant montré qu'un transfert est possible entre le propriétaire et son animal de compagnie¹.

Les SARM sont généralement hébergés sous forme inapparente chez l'animal, mais ils peuvent également être responsables d'infections. Les taux de portage varient en fonction des études, mais ils pourraient être augmentés dans certaines cliniques vétérinaires, ce qui sous-entend une contamination possible d'un animal à l'autre. Les SARM semblent plus fréquemment en cause dans les pyodermites profondes rebelles (cf. photo 3 et cf. tableau 1)⁸.

Tableau 1 page suivante



Photo 3 :
Pyodermite profonde rebelle à SARM.
Crédit : E. Bensignor



Les facteurs de risque pour l'acquisition d'un SARM sont encore débattus, mais il semble que l'utilisation préalable d'antibiotiques (notamment les bêta-lactamines et surtout les fluoroquinolones) et la pose de cathéters veineux soient en cause dans de nombreux cas (voir encadré).

Encadré : QUAND SUSPECTER UNE INFECTION PAR UNE BACTÉRIE MÉTICILLINE-RÉSISTANTE ?

(d'après 9)

- Infections post-opératoires ou traumatiques (plaies ne guérissant pas)
- Infection au site de pose d'implants (cathéters, prothèses, matériel chirurgical) (cf. photo 4)
- Pyodermite ne répondant pas au traitement
- Commémoratifs d'infection par un SARM ou un SPRM
- Propriétaire porteur de SARM
- Présence de SARM démontrée dans l'environnement



Photo 4 : Furunculose sur site d'un implant chirurgical.
Crédit : E. Besignor

TABLEAU 1

EXEMPLES D'ÉTUDES SUR LA PRÉVALENCE DE LA COLONISATION PAR LES SARM CHEZ LE CHIEN d'après (8)

POPULATION	PAYS	PRÉVALENCE	RÉFÉRENCE
Communauté de chiens tout venant	UK	0 %	Baptiste <i>et al.</i> 2005
	UK	0,4 %	Rich and Roberts 2006
	Hong Kong	0,7 %	Boost <i>et al.</i> 2007
	Slovénie	0 %	Vengust <i>et al.</i> 2006
	USA	4 %	Kottler <i>et al.</i> 2008
	USA	0 %	Griffeth <i>et al.</i> 2008
Chiens présentés dans une clinique vétérinaire	Danemark	0 %	Bagcigil <i>et al.</i> 2007
	Canada	0,5 %	Hanselman <i>et al.</i> 2007
Chiens hospitalisés	UK	9 %	Loeffler <i>et al.</i> 2005
	Canada	0 %	Lefebvre <i>et al.</i> 2006



Photo 5 : Pyodermite récidivante à SPRM.

Crédit : E. Bensignor

LES SPRM

Des souches méti-R de *S. pseudintermedius* sont de plus en plus régulièrement rapportées en dermatologie canine. Diverses études épidémiologiques décrivent une augmentation régulière d'isolement de ces souches en cas d'infection (entre 5 % et jusqu'à 46 % des isollements), mais également une augmentation du portage chez les individus sains (jusqu'à 4,5 % chez le chien, soit près de 10 % des souches isolées). Le gène *mecA* a été régulièrement isolé de souches de *S. pseu-*

dintermedius à la fois en Amérique du nord et, plus récemment, en Europe. Il semble par ailleurs que les SPRM isolés en Amérique du Nord sont différents génétiquement de ceux retrouvés en Europe. L'augmentation, par transfert horizontal de gènes de résistances, de l'incidence de ces souches est prouvée et inquiétante. Les aspects cliniques sont assez semblables aux pyodermites « classiques » et ce type de bactérie est à envisager en présence d'infections récidivantes (cf. photo 5 et tableau 2).

S. SCHLEIFERI SUBSP. COAGULANS MÉTI-R

Les souches de *S. scheiferi* subsp. *coagulans* isolées des cas de pyodermites canines sont fréquemment résistantes à la méticilline (jusqu'à 65 % dans une étude récente). Il semble que la présence de ces souches soit plus fréquente en cas de dermatose que chez le chien sain.

STAPHYLOCOQUES COAGULASE NÉGATIVE MÉTI-R

Ces espèces semblent en augmentation et des souches méti-R sont régulièrement identifiées parmi certaines de ces espèces. Des données récentes françaises font état de plus de 25 % de souches résistantes.

LES RISQUES ZONOTIQUES

Les risques zoonotiques semblent faibles mais ne sont pas nuls. Il existe une possibilité de transmission de l'animal à l'homme (et *vice versa*) par contact direct, par la poussière, par aérosol et par l'alimentation. Plus qu'un risque zoonotique à proprement parler, nous sommes face à une réalité de transmission au chien puis par le chien de gènes de résistance aux antibiotiques¹¹ ... Le phénomène est d'autant plus inquiétant que certains clones rencontrés chez l'homme pourraient s'adapter aux chiens¹² (cf. photo 6).

photo 6 page suivante

TABLEAU 2 :

EXEMPLES D'ÉTUDES SUR LA PRÉVALENCE DE LA COLONISATION PAR LES SPRM CHEZ LE CHIEN d'après (8)

POPULATION	PAYS	PRÉVALENCE	RÉFÉRENCE
Chiens sains	USA	2 %	Griffeth <i>et al.</i> 2008
	Slovénie	1,5 %	Vengust <i>et al.</i> 2006
Chiens présentés dans une clinique vétérinaire	Canada	2 %	Hanselman <i>et al.</i> 2007
	Japon	30 %	Sasaki <i>et al.</i> 2007
Chiens présentant une pyodermite	USA	0 %	Medleau <i>et al.</i> 1986
	USA	7 %	Griffeth <i>et al.</i> 2008
	USA	3,5 %	Kania <i>et al.</i> 2004



EVITER L'APPARITION ET LE DÉVELOPPEMENT DES RÉSISTANCES : un challenge à envisager au quotidien

Il apparaît donc indispensable d'éviter le risque de développement des bactéries résistantes au quotidien, ce qui implique une diminution de l'utilisation des antibiotiques et des mesures d'hygiène : tout léchage par l'animal doit être évité, notamment en présence de plaies cutanées ; un lavage des mains doit être effectué entre chaque consultation ainsi qu'une désinfection des tables et de l'environnement ; l'utilisation systéma-

tique des antiseptiques doit être envisagée car il a été démontré qu'ils pouvaient être efficaces utilisés seuls et permettaient potentiellement une diminution des durées d'antibiothérapie quand utilisés en association avec un antimicrobien par voie systémique^{13,14}... Dans ce contexte, les études se sont multipliées ces dernières années pour trouver des alternatives aux traitements antibiotiques conventionnels : potentialisateurs antibactériens, inhibiteurs de virulence bactérienne, bactériophages, enzymes protéolytiques, vaccination, ...

Parmi ces différentes approches, le recours à des peptides antimicrobiens est une voie alternative nouvelle particulièrement intéressante pour éviter ou diminuer l'utilisation des antibiotiques en clinique.



Photo 6 :
La présence de staphylocoques résistants nécessite des précautions pour le propriétaire et le vétérinaire.

Crédit : E. Besignor

LES POINTS FORTS (d'après 10)

- La résistance à la méticilline est liée à la production par les staphylocoques d'une protéine PBP2a qui leur assure une faible affinité pour les bêta-lactamines et les céphalosporines. Elle est consécutive à l'acquisition d'un gène *mecA* ; ce gène est véhiculé par un élément génétique mobile appelé SCC*mec*.
- Les MRS sont responsables chez le chien et le chat de pyodermites récidivantes superficielles ou profondes et d'otites externes.
- Ces souches sont de plus en plus fréquentes : en 2015 environ 15 à 20 % des souches reçues par le Resapath (réseau de surveillance bactériologique français) sont des SPRM.
- Les souches de *S. pseudintermedius* MR sont résistantes aux bêta-lactamines mais aussi à d'autres classes antibiotiques.
- Le risque de transmission inter-espèces en particulier entre l'animal de compagnie et l'homme existe.
- La réalisation d'un examen bactériologique (et éventuellement d'un antibiogramme) en cas de pyodermite et d'otite externe récidivantes doit être plus systématique.
- Une utilisation rationnelle des antibiotiques, des mesures alternatives à l'antibiothérapie et des mesures d'hygiène rigoureuses restent la meilleure prophylaxie au développement de germes résistants.

LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS : de quoi s'agit-il ?

DISTRIBUTION, STRUCTURE ET RÔLES DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Une vaste majorité des organismes vivants produit des peptides antimicrobiens. Ces peptides (PAM) constituent virtuellement des agents universels de la première ligne de défense immunitaire de toute forme de vie. Les PAM sont classiquement des chaînes d'acides aminés relativement courtes (de 12 à 100 acides aminés), chargées positivement (cationiques), amphipathiques (qui possèdent des propriétés aussi bien hydrophiles que lipophiles), qui ont été isolés chez les micro-organismes unicellulaires, les insectes et autres invertébrés, les plantes, les amphibiens, les oiseaux, les poissons et les mammifères, y compris chez l'Homme^{15,16}.

Leur caractéristique structurelle fondamentale repose sur leur capacité à adopter une forme dans laquelle des groupements d'acides aminés hydrophobes et cationiques sont organisés dans des secteurs discrets de la molécule. A ce jour, plus de 1700 PAM ont été identifiés, soulignant ainsi leur importance dans le système immunitaire non spécifique, principal système de défense pour la majorité des êtres vivants.

Leur rôle principal dans la plupart des cas est de tuer des organismes envahisseurs potentiellement pathogènes. Mais si ces peptides sont décrits comme de puissants antimicrobiens, pour autant, leur activité antimicrobienne directe est certainement inhibée dans les conditions physiologiques normales, par des protéases endogènes, certains anions polyvalents, comme les glycosaminoglycanes, et une faible concentration locale de ces mêmes peptides.

Ces peptides sont par ailleurs d'importants effecteurs, en tant que modulateurs, du système immunitaire. L'expression de ces PAM peut être constitutive ou induite par des stimuli infectieux et/ou inflammatoires (cytokines proinflammatoires, bactéries, constituants moléculaires bactériens comme les lipopolysaccharides [LPS]). Ils sont en effet capables d'accroître le phénomène de phagocytose, de stimuler le largage de prostaglandines, de neutraliser les propriétés septiques des LPS, de renforcer le recrutement et l'accumulation d'une grande variété d'autres cellules de défense sur des sites inflammatoires ou infectieux^{17,18}. Ils sont capables également de promouvoir le phénomène d'angiogénèse et d'induire le phénomène de cicatrisation. De plus, les peptides des Mammifères ont montré un rôle actif dans la transition d'une réponse immunitaire non spécifique vers une réponse immunitaire adaptative par leur chimiotactisme positif pour les monocytes et les lymphocytes T chez l'Homme, mais également de par leurs propriétés adjuvantes et polarisantes sur le développement des cellules dendritiques¹⁹.

Les peptides antimicrobiens constitueraient ainsi les véritables sentinelles de l'immunité adaptative. Ainsi, même si de tels peptides peuvent avoir des effets directs sur des microbes, en déstabilisant ou détériorant les membranes des bactéries, des virus ou des champignons potentiellement pathogènes, ils s'avèrent particulièrement impliqués dans l'orchestration du déroulement des réponses immunitaires et des réponses inflammatoires. D'ailleurs l'importance de leur activité microbicide dans les défenses de l'hôte semblerait varier selon les sites chez un même organisme, mais également entre différents organismes. Chez les animaux pluricellulaires, il semblerait qu'ils soient systématiquement exprimés et/ou localisés sur ou dans certaines cellules ou tissus du corps les plus exposés aux infections, comme les muqueuses et la peau.

DÉFENSINES ET CATHÉLICIDINES : les peptides antimicrobiens prédominants chez les Mammifères

PEPTIDES D'ORIGINE BACTÉRIENNE

Les peptides antimicrobiens d'origine bactérienne (bactériocines) ont été les premiers isolés et caractérisés. Ils contribuent à la survie des bactéries en tuant d'autres bactéries qui entreraient en compétition pour leur alimentation dans un même environnement.

Les bactériocines constituent un groupe vaste et divers classifié en deux grandes catégories : les peptides contenant de la lanthionine (un acide aminé inhabituel) et ceux n'en contenant pas.

Parmi les antibiotiques (contenant donc de la lanthionine), la nisine, produit par *Lactococcus lactis* est sans doute celui qui a été le plus étudié, puisqu'il est utilisé depuis plus de 50 ans comme conservateur alimentaire sans qu'aucun phénomène de résistance n'ait été constaté à ce jour. **La nisine**, sous forme de lingettes imprégnées utilisées seules ou associées à une antibiothérapie orale, a également été étudiée chez le chien dans le traitement des pyodermites bactériennes et des proliférations bactériennes de surface avec un certain succès²⁰.

PEPTIDES DES VERTÉBRÉS

Concernant les Vertébrés, les PAM ont été isolés dans de nombreuses espèces. Ceci signifie que même en présence d'un système immunitaire adaptatif, ces peptides jouent un rôle important dans le système de défense de l'hôte. Leur activité microbicide directe est cependant variable dans des conditions physiologiques,





et est particulièrement marquée sur les sites où ils sont en grande concentration comme dans les granules des cellules phagocytaires des cryptes de l'intestin grêle ²¹.

- Les cathélicidines sont un groupe vaste et divers de PAM chez les Vertébrés. Elles sont caractérisées par un segment commun N-terminal bien particulier (le domaine cathéline), qui est protéolytiquement clivé afin de donner la forme mature active du peptide, et par un peptide cationique de structure variable à son extrémité C-terminale. La plupart des cathélicidines sont ainsi conservées sous leur forme immature inactive, principalement dans les granules des cellules immunitaires circulantes. Les granules des neutrophiles par exemple constituent la source principale de cathélicidines, même si celles-ci peuvent être exprimées au niveau des muqueuses de la bouche, des poumons, génito-urinaires et dans les kératinocytes en cas d'inflammation, comme c'est le cas pour la cathélicidine humaine LL-37 (seule cathélicidine mise en évidence chez l'Homme)²². Au-delà de leur segment N-terminal commun, la diversité structurelle au sein même de cette large famille de peptides témoigne de propriétés distinctes apparentes, avec sans doute des activités microbiocides et immunomodulatrices diverses.

Les cathélicidines ont été isolées chez de nombreuses espèces de Mammifères : comme la souris, le lapin, le mouton, le cheval, le chat, le chien et l'Homme. Les études sur le modèle animal mettent en évidence l'importance des cathélicidines comme acteurs de premier choix dans la défense innée de l'hôte. Ainsi, les souris présentant une anomalie du gène de leur unique cathélicidine sont incapables de contrôler des infections dues à des streptocoques du groupe A²³.

- Les défensines représentent le second groupe prédominant de PAM chez les Mammifères²¹. Ces peptides cycliques sont divisés en trois sous-groupes en fonction de la position de leurs ponts disulfures : les α -défensines, les β -défensines et les θ -défensines.

Comme pour les cathélicidines, les défensines chez les Vertébrés sont synthétisées sous leur forme pré-peptide, qui requiert une maturation en forme active par protéolyse. Les α -défensines et les β -défensines sont largement distribuées chez les Vertébrés, alors que les θ -défensines sont plus rares (chez les singes de l'« Ancien Monde » uniquement).

Les α -défensines et les β -défensines sont présentes dans les granules des neutrophiles, des macrophages, des lymphocytes NK, des cellules intestinales de Paneth et dans les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses pulmonaires et uro-génitales, notamment. Les études *in vitro* ont montré que les défensines possèdent dans l'ensemble un faible pouvoir bactéricide, fongicide et virucide. Les propriétés microbiocides des α -défensines et β -défensines sont inhibées par des concentrations salines physiologiques²⁴. Cependant, les fortes concentrations notamment d' α -défensines que l'on peut rencontrer dans certains sites, et particulièrement dans

les granules des cellules phagocytaires et dans les cryptes intestinales sont *a priori* suffisantes pour exprimer leur potentiel microbiocide malgré l'antagonisme des sels²⁵.

LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS ET LA PEAU

Quatre β -défensines et une cathélicidine ont été isolées dans la peau de l'Homme. Elles ont des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries, y compris les *Staphylococcus aureus* méticillines-résistants (MRSA), des levures et des virus. Six β -défensines (cBD1-like, cBD2-like/122, cBD3-like, cBD102, cBD103 et cBD127) et une cathélicidine (cCath) ont été identifiées dans la peau et les muqueuses du chien^{26,27,28}. Les cBD1-like, cBD2-like/122, cBD3-like, cBD103 et cCath possèdent une activité antimicrobienne contre les MRSA, les *Staphylococcus* méthicilline-sensibles et résistants, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis* et *Candida albicans*. Le cBD103 semble être le plus efficace contre les *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis* et *Candida albicans*. Le cCath, quant à lui, semble le plus efficace contre *Escherichia coli*.²⁹

LES DIFFÉRENTS MODES D'ACTION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS^{21,30,31}

Les PAM ont ciblé une différence fondamentale entre la constitution des membranes des microbes et celle des cellules des organismes pluricellulaires. Ce phénomène est pour le moment bien mieux compris pour les cibles bactériennes des PAM. En effet, les membranes bactériennes sont organisées de telle façon que la couche externe de la membrane cytoplasmique présente au milieu extérieur des lipides et leurs têtes phospholipidiques chargées négativement. A l'inverse, la couche externe des membranes cytoplasmiques des organismes pluricellulaires est composée de lipides ne présentant pas de charge nette. La plupart des têtes phospholipidiques font partie de la couche interne de la membrane cytoplasmique et est dirigée vers le cytoplasme. Un modèle propose le mode d'interaction entre les PAM et la membrane cytoplasmique bactérienne, suivi des modifications structurales de celle-ci (déplacement des phospholipides), de son altération et dans certains cas de l'entrée des PAM dans la bactérie-cible. De plus, la présence de molécules de cholestérol dans la membrane cytoplasmique des organismes pluricellulaires réduit l'activité des PAM de par la stabilisation



qu'il apporte ou tout simplement par ses interactions directes avec les PAM. Cette théorie de perméabilisation de la membrane bactérienne a été pendant relativement longtemps le seul mode d'action envisagé pour les PAM contre les bactéries. Mais il est clair désormais que de nombreux peptides exercent leur activité microbicide par des moyens alternatifs, et même qu'ils pourraient agir sur plusieurs cibles en même temps. Quoi qu'il en soit, presque toutes les stratégies dépendent des interactions entre les PAM et la membrane bactérienne : formation de canaux transitoires dans la membrane bactérienne, « micellisation » ou dissolution de la membrane, translocation au travers de la membrane. Par ce dernier mode d'action notamment, qui ne constitue pas une perméabilisation de la membrane, les PAM seraient capables une fois présents dans le cytoplasme bactérien d'inhiber la synthèse d'ADN, de protéines, d'enzymes et/ou de la paroi bactérienne.

LES PHÉNOMÈNES DE RÉSISTANCE CONCERNENT-ILS LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS ?

L'acquisition d'une résistance par une souche initialement sensible est peu probable. Il y a bien sûr des résistances innées de certaines bactéries, comme *Morganella* spp et *Serratia* spp, dont les membranes ne possèdent pas suffisamment de lipides chargés pour garantir une interaction PAM-bactérie.

La faible probabilité d'apparition de résistance bactérienne aux PAM est tout simplement due à la caractéristique essentielle de leur relation : la structure particulière de la membrane bactérienne. Ainsi, schématiquement, afin d'acquérir une résistance contre un peptide une bactérie devrait revoir l'organisation ou la composition même de sa membrane cytoplasmique.

Si l'on considère la production de protéases par une bactérie contre un ou plusieurs types de PAM,

il faut souligner la présence nécessaire pour ces enzymes d'un site de reconnaissance unique et constant alors que la plupart des PAM sont issus de séquences d'acides aminés indéfinissables privées d'un épitope unique. Enfin, les organismes pluricellulaires attaquent une bactérie à l'aide de plusieurs types de PAM de structures différentes. Ainsi, la destruction d'un type de peptide ne garantirait pas la survie de la bactérie pour autant face aux autres types de PAM en action.

Le problème de l'émergence des résistances bactériennes aux antibiotiques conventionnels, et ainsi le besoin urgent de développer de nouvelles stratégies antibiotiques a donc naturellement stimulé l'intérêt pour le développement des PAM dans l'arsenal thérapeutique en médecine humaine, et plus récemment en médecine vétérinaire. Pour autant, leur développement n'est pas si simple compte tenu de leur toxicité habituelle établie pour les cellules propres de l'hôte aux concentrations thérapeutiques élevées nécessaires.

Leur intérêt antibactérien principal reste donc pour le moment encore une utilisation topique adjuvante.



Photo 8 :
Pyodermitis cutanéomuqueuse chez un chien : une bonne indication d'un traitement avec des peptides antimicrobiens.

Crédit : E. Bensignor



Photo 7 :
Otite suppurée chez un chien : une bonne indication d'un traitement avec des peptides antimicrobiens.

Crédit : E. Bensignor





LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS : leur intérêt en dermatologie

RÉSULTATS D'ÉTUDES SUR L'UTILISATION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS EN DERMATOLOGIE ET OTOLOGIE VÉTÉRINAIRE

PREMIÈRE APPROCHE

Une première approche consiste à favoriser la synthèse des peptides endogènes par l'organisme. Peu d'études ont été publiées validant cette approche. Une étude *in vitro* a montré que l'utilisation d'une combinaison d'extraits de plantes (*Peumus boldus* et *Spiraea ulmaria*) stimulait l'expression de gènes codant pour la synthèse de bédafensine (hBD3) et de cathélicidine (hCath)³² ; *in vivo* une autre étude présentée en poster a évalué la même combinaison qui s'avère plus efficace qu'un placebo pour diminuer le nombre de bactéries sur la peau de chiens atopiques après 14 jours d'application, avec une diminution significative du ratio staphylocoques sur bactéries totales et sans effet secondaire ($p = 0,037$)³³.

SECONDE APPROCHE

Une seconde approche consiste à utiliser directement des peptides antimicrobiens sur la peau. Il s'agit d'une technique validée en dermatologie médicale, notamment pour les staphylocoques multirésistants ; certains peptides de synthèse possèdent en effet, outre leur effet antimicrobien direct, une capacité de diminution de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires mais également de destruction des biofilms bactériens³⁴.

Chez le chien, deux études *in vitro* ont été réalisées, principalement vis-à-vis de l'intérêt de ces peptides de synthèse vis-à-vis des staphylocoques en cas de pyodermite ou d'otite, mais également pour les otites externes, notamment à *Pseudomonas*.

L'un d'entre eux, l'AMP2041 a été créé grâce à un générateur de peptides STAMP et a fait l'objet de recherches démontrant son efficacité et son innocuité notamment vis-à-vis des souches résistantes à la méthicilline chez les bovins, les porcs et les chiens³⁵. Un effet microbicide a été noté après 20 minutes d'incubation à 100 % vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et à 90 % vis-à-vis de *Escherichia coli*. Une diminution de plus de 90 % était notée vis-à-vis de *S. aureus* après 120 minutes d'incubation.

Ce peptide est caractérisé par un haut degré de solubilité dans les environnements aqueux (supérieur à 95 %), garantissant une utilisation facile dans différentes formulations galéniques, une haute stabilité due aux liaisons disulfure, une spécificité envers les cellules procaryotes, un large spectre d'action contre les bactéries et les champignons et une action synergique avec les antibiotiques conventionnels.

AMP2041 agit sélectivement sur la reconnaissance entre les différences de charge et de composition des membranes cytoplasmiques des cellules eucaryotes supérieures et celles des cellules procaryotes et des champignons. Les membranes cellulaires bactériennes sont principalement composées de phospholipides chargés négativement, comme la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol, et le bis(phosphatidyl)glycérol. Les membranes cellulaires eucaryotes, à l'inverse, comportent un grand nombre de composés neutres à pH physiologique, comme le cholestérol, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, et ne sont donc pas « attaquées » par les peptides. L'activité d'AMP2041 se manifeste principalement par la perturbation et la destruction des membranes bactériennes³⁶.

EFFICACITÉ DANS LES PYODERMITES

In vitro, l'intérêt d'une association de peptide antimicrobien AMP2041, de tris EDTA et de digluconate de chlorhexidine a été évaluée sous deux formulations : shampooing contenant respectivement 2 ug/ml, 2 % et 0,08 % et solution contenant respectivement 0,5 ug/ml, 0,5 % et 0,02 %^{37,38}. Le shampooing a été testé dilué à ¼ contre différentes souches bactériennes et fongiques à des intervalles fixes (30 secondes, 1, 5 et 10 minutes).

Un effet antimicrobien complet a été noté après 30 secondes pour *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, *S. pseudintermedius*, *S. canis* et *C. albicans*. Pour *Malassezia pachydermatis*, l'effet était obtenu après 1 minute et après 5 minutes pour *P. mirabilis*, ce qui confirme que le shampooing permet un effet antimicrobien rapide et complet vis-à-vis des principaux microbes responsables d'infection chez le chien.

Pour la solution, des résultats comparables étaient observés (effet bactéricide/fongicide après 30 secondes pour *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pseudintermedius*, *S. canis* et *C. albicans*), après 1 minute pour *P. mirabilis* et *M. pachydermatis* et après 5 minutes





Photo 9 :
Pyodermite à staphylocoque résistant chez un Bouledogue américain.

Crédit : E. Bensignor

pour *S. aureus* et *S. aureus* résistant à la méticilline (cf. photo 9).

EFFICACITÉ DANS LES OTITES

In vitro, l'évaluation d'un gel contenant 0,5 ug/mL du peptide AMP2041, 0,07 % de chlorhexidine digluconate et 0,4 % de Tris et 0,1 % d'EDTA a été testée sur 30 souches de *Pseudomonas* isolées à partir d'otites externes³⁹. Les concentrations minimales bactéricides et la rapidité d'action pour obtenir la mort bactérienne ont été calculées avec des systèmes de dilutions sériées. Un effet bactéricide en moins de 30 secondes a été observé pour toutes les souches testées ce qui suggère une efficacité potentielle en cas d'otite externe.

In vivo, une étude pilote s'est intéressée à l'efficacité des mêmes peptides antimicrobiens associés au tris



Photo 10 :
Otite bactérienne chez un chien Cocker.

Crédit : E. Bensignor

EDTA et à la chlorhexidine dans les otites externes canines, aiguës ou récurrentes causées par des bactéries (cf. photo 10) ou des *Malassezia*⁴⁰.

Le traitement a été appliqué un jour sur deux pendant deux semaines. Les critères évalués étaient le prurit, la douleur, la présence d'exsudat, d'érythème, d'érosions/ulcérations avec un score validé OTIS3 et l'appréciation semi quantitative du nombre de bactéries et de levures. Une amélioration clinique de 48,8 % a été notée après une semaine ; après deux semaines une amélioration de 84,8 % était notée avec 13/16 chiens guéris et 3/16 chiens montrant une nette amélioration. Sur le plan cytologique, à J7 l'amélioration était de 40,2 % et à J14 de plus de 71 % pour les bactéries (cf. photo 11) et plus de 77 % pour les levures. L'évaluation globale par le propriétaire et le vétérinaire était supérieure à 96 % à J14.

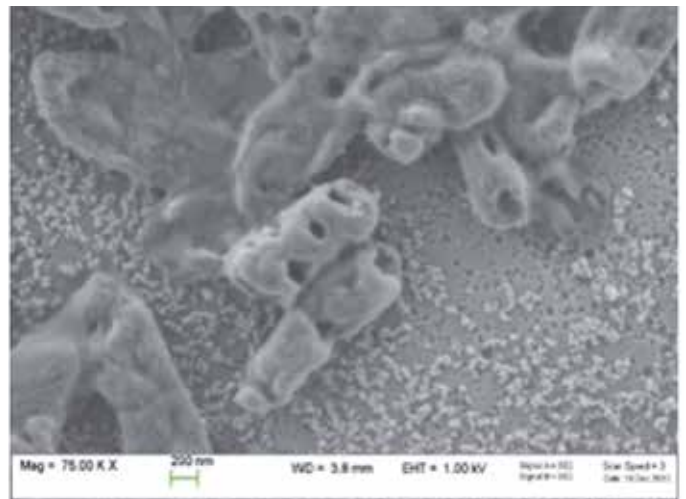


Photo 11 :
Bactéries en bâtonnet ayant des trous évidents dans la membrane bactérienne causés par AMP 2041.

Crédit : Université de Parme

CONCLUSION

Dans le contexte actuel d'une utilisation raisonnée des antibiotiques, du plan Ecoantibio qui prévoit une diminution des quantités prescrites et délivrées à l'animal, et de l'augmentation parfois alarmante des cas de résistance bactérienne tant chez l'homme que chez l'animal, le développement de solutions alternatives à l'antibiothérapie est le sujet de recherches poussées. La découverte et le développement de peptides antimicrobiens s'inscrit dans cette démarche. Les preuves, *in vitro* et *in vivo*, de leur efficacité sont désormais disponibles et il apparaît donc logique d'intégrer cette nouvelle approche dans l'arsenal thérapeutique dont nous disposons aujourd'hui au quotidien.



REFERENCES

- 1- BENSIGNOR E** Atlas des pyodermes canines, 2ème édition, MedCom, Paris, 2014
- 2- Wang SY *et al.*** Antibiotic resistance : a global threat to public health. BCMJ 2014 ; 6 : 295-296
- 3- Roca I *et al.*** The global threat of antimicrobial resistance : science for intervention. New microbes and infections 2015 ; 6 : 22-29
- 4- Kadlek K and Schwarz S** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Dermatol 2012 ; 23 : 276-282
- 5- Arais LR *et al.*** Antimicrobial resistance, intergen carriage and gyrA and gyrB mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. Vet Dermatol 2016 ; 27 : 113-e31
- 6- Frank LA and Loeffler A** Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* : clinical challenge and treatment options. Vet Dermatol 2012 ; 23 : 283-291
- 7- Hillier A *et al.*** Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases) Vet Dermatol 2014 25 : 163-e43
- 8- Weese JS et van Duijkeren E,** Methicillin-resistant *S. aureus* and *S. pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol, 2010 ; 140 : 418-429
- 9- Loeffler A . et coll (2005).** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56, 692-697
- 10- Haenni M, Alves de Moraes N, Chatre P, *et al.*** Characterization of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. Journal of Global Antimicrobial Resistance 2014, 2:119-123
- 11- Loncaric I *et al.*** Carriage of methicillin resistant staphylococci between humans and animals on a small farm. Vet Dermatol 2016; 27: 191-194
- 12-** Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by veterinarians in Australia. Austr Vet Journal 2011, 89: 152-159
- 13- Borio S *et al.*** Effectiveness of a combined protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma : a randomized blinded antibiotic-controlled study. Vet Dermatol 2015 ; 26 : 339-e72
- 14- BENSIGNOR E *et al.*** A split body randomized blinded study to evaluate the efficacy of a topical spray made of essential oils and essential fatty acids from plant extracts with antimicrobial properties. Vet Dermatol 2016, in press
- 15- Martin E.T *et al.*** Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. J Leuc Biol 1995 ; 58:128-136
- 16- Wang Z, Wang G.** APD: the Antimicrobial Peptide database. Nucleic Acids Res 2004 ; 32 : D590-D592
- 17- Elsbach P.** What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? J Clin Investig 2003 ; 111: 1643-1645
- 18- Yang D *et al.*** Mammalian defensins in immunity: more than just antimicrobicidal. Trends Immunol 2002 ; 23: 291-296
- 19- Davidson DJ *et al.*** The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. J Immunol 2004 ; 172:1146-1156
- 20- Frank LA *et al.*** Nisin impregnated wipes for the treatment of canine pyoderma and surface bacterial colonization. NAVDF 24th (2009), Savannah, GA, p. 215
- 21- Janssen H *et al.*** Peptide Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev 2006 ; 19 : 491-511
- 22- Fromm M *et al.*** The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem 1997 ; 272: 15258-15263
- 23- Nizet V *et al.*** Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. Nature 2001 ; 414: 454-457
- 24- Goldman MJ *et al.*** Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell 1997 ; 88: 553-560
- 25- Ayabe T *et al.*** Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol 2000 ; 1: 113-118
- 26- Santoro D *et al.*** Expression and distribution of antimicrobial peptides in the skin of healthy beagles. Vet Dermatol 2001 ; 22: 61-67
- 27- Leonard BC *et al.*** Activity, expression and genetic variation of canine β -defensin 103: a multifunctional antimicrobial peptide in the skin of domestic dogs. J Innate Immun 2012 ; 4: 248-259
- 28- Sang Y *et al.*** Canine cathelicidin (K9CATH) : gene cloning, expression and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide. Dev Comp Immunol 2007; 31: 1278-1296
- 29- Santoro D, Maddox C.** Canine antimicrobial peptides are effective against resistant bacteria and yeasts. Vet Dermatol 2014; 25: 35-e12
- 30- Braff M *et al.*** Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. J Invest Dermatol 2004; 125: 9-13
- 31- Zasloff M.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 2002; 415: 389-395
- 32- Marsella R *et al.*** Evaluation of the in vitro effect of plant extracts on the production of antimicrobial peptides and inflammatory markers in canine keratinocytes :: a pilot study. Vet Dermatol 2013 ; 24 : 295-309
- 33- Santoro D *et al.*** Evaluation of the effects of 0.1% Peumus boldus leaf and Spiraea ulmaria plant extracts on bacterial colonization in canine atopic dermatitis : a preliminary randomized controlled double blinded study. Vet Dermatol 2016, 27 (suppl 1), 6-121
- 34- M Mohamed *et al.*** Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. Nature, scientific reports, 2016, 6, 29707
- 35- Cabassi CS *et al.*** Broad spectrum activity of a novel antibiotic peptide against multidrug resistant veterinary isolates. Vet J 2013; 198: 534-537
- 36- Romani AA *et al.*** in vitro activity of novel in silico-developed antimicrobial peptides against a panel of bacterial pathogens. J Pet Sci 2013; 196: 554-565
- 37- Ghibaudo G *et al.*** In vitro antimicrobial activity of a commercial dermatologic solution (Peptivet sol) containing chlorhexidine digluconate, Tris-EDTA and a novel antimicrobial peptide (AMP2041). Vet Dermatol 2016 ; 27 (suppl 1) ; 6-121
- 38- Ghibaudo G *et al.*** In vitro antimicrobial activity of a commercial shampoo (Peptivet shampoo) containing chlorhexidine, tris-EDTA and a novel antimicrobial peptide (AMP 2041). WCVD 8, Bordeaux, Poster 069
- 39- Ghibaudo G *et al.*** In vitro antimicrobial activity of a gel containing antimicrobial peptide AMP2041, chlorhexidine digluconate and Tris-EDTA on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from canine otitis. Vet Dermatol 2016 ; DOI : 10.1111/vde.12371
- 40- Ghibaudo G** Clinical multicenter pilot study to evaluate the efficacy of a new otologic product (antimicrobial peptide AMP2041, tris-EDTA, chlorhexidine) in 30 dogs with either acute otitis externa or recurrent bacterial and/or yeasts otitis externa. Proceedings ICF session, WCVD8, Bordeaux 2016

La Dépêche

www.depecheveterinaire.com

Technique