

c) Activité intracellulaire du ceftiofur et de la marbofloxacin en modèle cellulaire THP1

A partir des travaux préliminaires, nous avons pu établir les conditions expérimentales de l'infection intracellulaire. Des macrophages THP1 sont mis en présence d'un inoculum bactérien correspondant à 10 bactéries par cellule, et de ceftiofur ou de marbofloxacin. Les concentrations choisies, 5 X CMI, CMax et 100 X CMI pour le ceftiofur, CMax=CMI, 10 X CMI, 100 X CMI pour la marbofloxacin reflètent le choix de rester dans des concentrations acceptables physiologiquement (concentration qui peut être au moins 10 fois supérieure au CMax en cas d'inhalation par exemple) et permettre de voir un effet bactéricide.

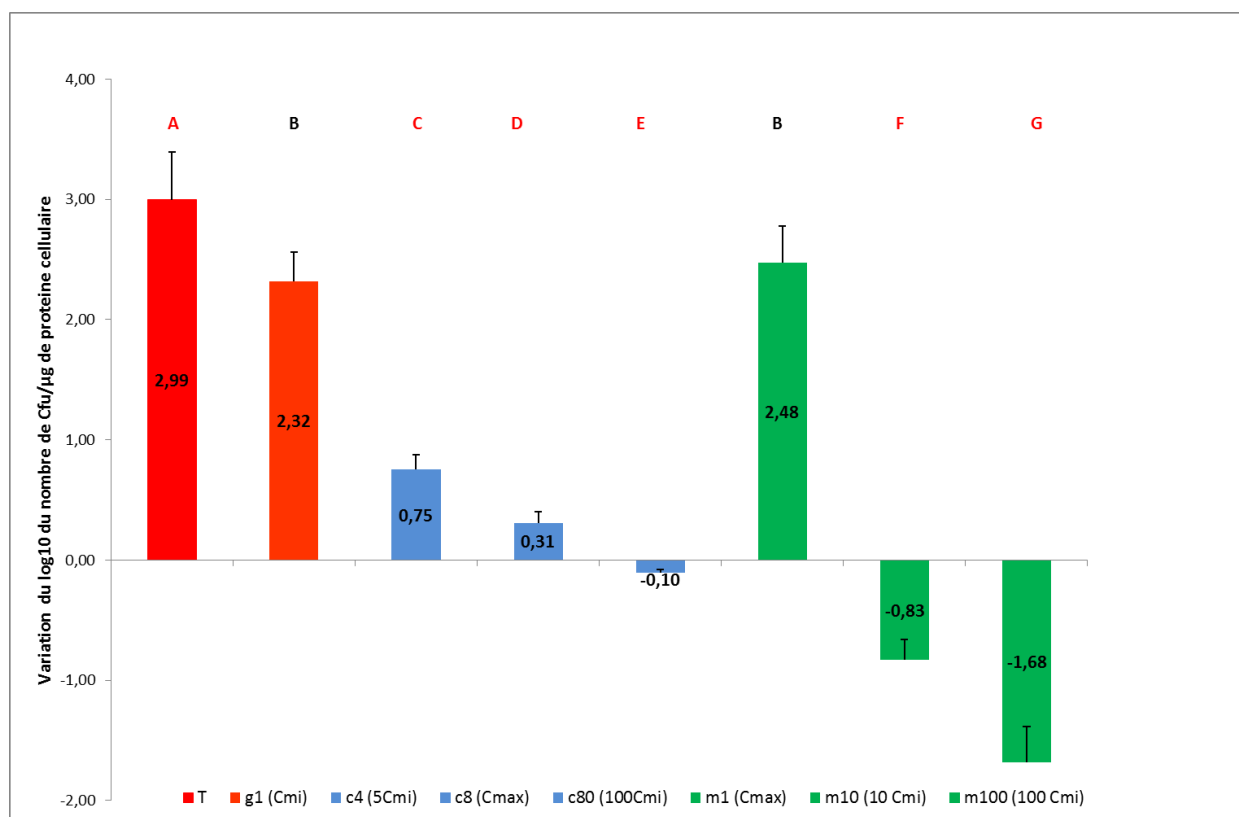
Seule la souche V a été examinée. L'utilisation d'un témoin à 1µg/mL de gentamicine découle directement de la technique sur les SARM où le temps de doublement est beaucoup plus court que chez *R. equi* (1h contre 3h), ce qui permet d'avoir un témoin dénombrable au bout de 24h. La gentamicine ne pénètre pas en intracellulaire et n'a aucune activité intracellulaire.

Le dosage de la pénétration intracellulaire des antibiotiques n'a pu être réalisé faute de méthode validée de dosage biologique avec une souche de référence ou d'antibiotiques marqués.

Résultats

Les résultats sont, comme pour la phagocytose, exprimés en logarithme décimal de CFU par µg de protéines cellulaires. (**figure 33**)

Figure 33 : Bactéricidie intracellulaire après 24 h sur la souche V



T : le témoin de croissance sans aucun antibiotique ; g1 : Témoin gentamicine à 1μg/mL.

C4, C8, C80 correspondent respectivement à l'activité du ceftiofur à la dose de 4, 8 et 80 μg/mL.

M1, M10, M100 correspondent à l'activité de la marbofloxacin à la dose de 1, 10, et 100 μg/mL

Moyenne et écart type de 3 expériences A,B,C,D,E,F,G correspondent aux différences statistiques (test de student par paire bilatéral < 0.05) entre les données. 2 barres légendées avec la même lettre ne sont pas différentes

Le ceftiofur a une activité intracellulaire indéniable vis-à-vis de la souche V, bactériostatique aux doses physiologiques. Cette activité semble inférieure à celle de la marbofloxacin.

L'activité de la marbofloxacin à la concentration de 1 mg/L (la CMI) n'est pas différente du témoin en présence de gentamicine.

Ces résultats restent préliminaires et doivent être confirmés sur un panel plus large de souches.

III.3) Structure du peptidoglycane de *Rhodococcus equi* et comparaison avec celui de *Corynebacterium jeikium*

Mainardi *et al.*, (2009) puis Lavollay *et al.*, (2010) ont mis en évidence une voie alternative de polymérisation du peptidoglycane chez *E.faecium* et *M.tuberculosis* qui explique en partie les résistances observées aux bêta-lactamines.

L'objectif ici est de déterminer l'importance la voie de L,D-transpeptidation dans synthèse du peptidoglycane chez *R. equi* et son implication dans la résistance aux bêta-lactamines.

L'approche est faite en trois phases : tout d'abord une étude préliminaire sur la souche hospitalière afin de mettre au point la technique d'analyse, puis sur les souches de référence et enfin vers la sélection et l'étude de mutant résistant au ceftiofur et à l'ampicilline.

a) Résultats du travail préliminaire

L'analyse du profil HPLC et les résultats du spectromètre de masse permettent de déterminer la composition et la configuration du peptidoglycane de *R.equi* en phase stationnaire.

Après élimination des sucres des muropeptides, on trouve essentiellement des térapeptides pour les structures monomériques, et des liaisons de type 4-3 générées par D,D transpeptidation (PLP) pour les structures dimériques ou trimériques. (**tableau 16**) L'analyse de la fraction réduite permet de déterminer la composition des sucres ; on trouve à la fois des dimères originaux GlucNac-MurNglyc (N-AcetylDglucosamineN-Glycolylmuramique) mais aussi des dimères classiques GlucNac-MurNac (N-AcetylDglucosamineN-Acetylmuramique). Les masses des différents muropeptides ayant permis l'interprétation en spectrométrie de masse sont résumées dans le **tableau 17**.

Tableau 16 : Composition du peptidoglycane de la souche H de *R. equi* en phase stationnaire de croissance

Monomère	12%	Tri+Térapeptides	84%
		Pentapeptides	16%
Dimères	51%	Pont 4-3 (D,D)	92,8%
		Pont 3-3 (L,D)	7,2%
Trimères	37%		

Figure 34 : Profil HPLC de la fraction beta-éliminée de la souche H

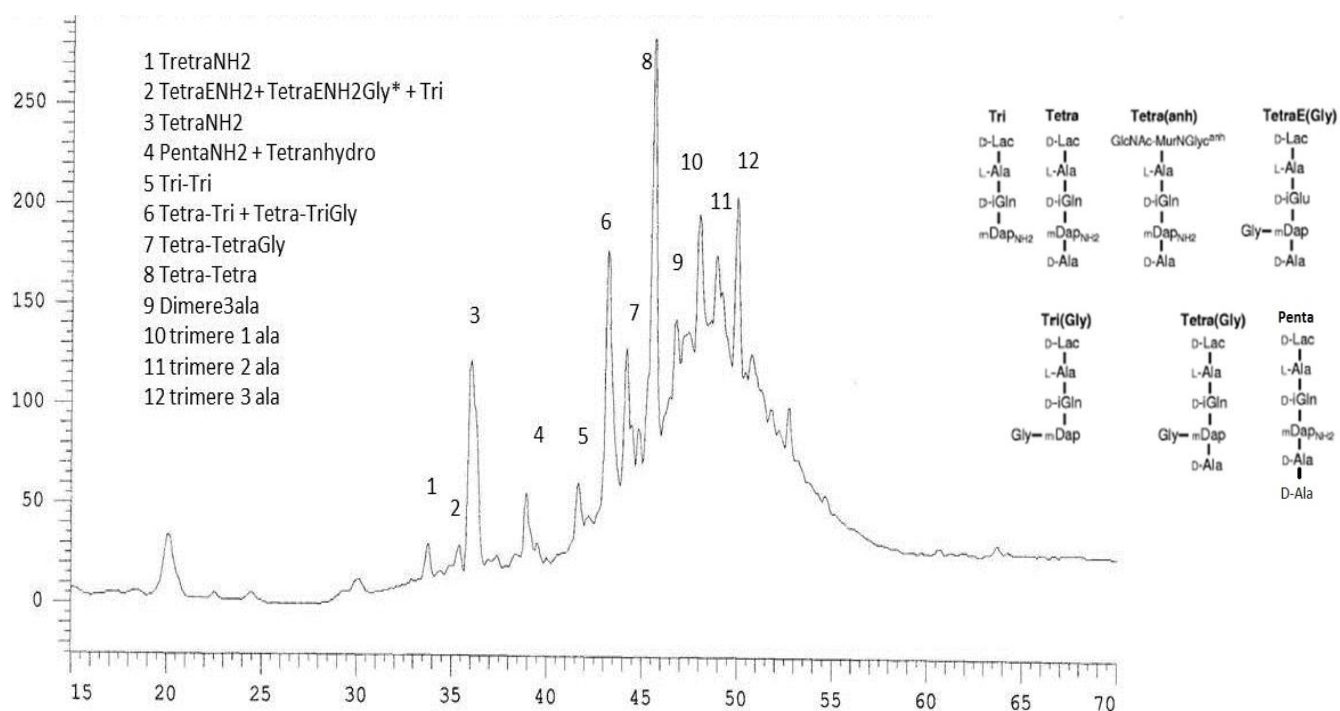


Tableau 17 : Masses des différents muropeptides d'après Lavollay (2009)

Pic	Muropeptide	Pont	Masses ^a
Monomères			
1	Tri	NA ^b	460.2
2	Tri-Asn	NA	574.3
3	Tri(Gly)	NA	518.2
4	Tetra	NA	531.3
5	Tetra(Gly)	NA	589.3
6	TetraE(Gly)	NA	590.3
14	Tetra(anh)	NA	935.4
Dimères			
7	Tri - Tri	3-3	902.5
8	Tri - Tri-Asn	3-3	1,016.5
9	Tetra - Tri-Asn	4-3	1,087.6
10	Tri - Tetra	3-3	973.5
11	Tri(Gly) - TriE(Gly)	3-3	1,019.5
12	TriE(Gly) - TriE(Gly)	3-3	1,020.5
13	Tetra - Tetra	4-3	1,044.5
15	Tri(Gly) - TetraE(Gly)	3-3	1,090.5
17	TriE(Gly) - TetraE(Gly)	3-3	1,091.5
19	Tetra(Gly) - TetraE(Gly)	4-3	1,161.6
20	Tri - Tetra(anh)	3-3	1,377.7
Trimères			
16	Tri - Tri - Tetra	MD ^c	1,415.7
18	Tri - Tetra - Tetra	ND	1,486.8

La présence d'une majorité de dimères branchés en 4-3 (92,8%) permet de conclure qu'en l'absence d'antibiotique, en phase stationnaire, le peptidoglycane de la souche hospitalière est synthétisé très majoritairement par de la voie D,D-transpeptidation même si la voie L,D-transpeptidation est présente.

b) Sélection de mutants et études

Différents mutants ont été réalisés dans l'optique d'étudier les modifications du peptidoglycane en présence de ceftiofur à partir de la souche vétérinaire V (CMI =0.5 mg/mL) et de la souche H (CMI=4mg/mL). L'obtention de mutants très résistants (>4096 mg/L) au ceftiofur à partir de la souche hospitalière a été aisée (3 étapes : 1024 mg/L, 2048 mg/L et 4096 mg/L), et à peine plus longue à partir de la souche V (5 étapes : 4mg/L, 32 mg/L, 1024 mg/L, 2048 mg/L et 4096 mg/L).

Le **tableau 18** présente la sensibilité des différentes souches résistantes déterminée par la méthode des disques.

Tableau 18 : Diamètres d'inhibition à différents antibiotiques pour les souches mutantes résistantes au ceftiofur.

Diamètre en mm	Témoin H	Mut Cft 1024	Mut CFT 2048	Mut CFT 4096	Témoin V	MutV CFT 32	MutV CFT 2048	MutV CFT 4096
Ceftiofur cft	35	C	C	C	35	C	C	C
Ampicilline Am	12	10	C	C	21	C	C	C
Imipénème	30	28	24	24	40	28	32 Ant cft et fox	30 Ant cft et Am
Céfotaxime	18	C	C	C	22	C	C	C
Céfoxitine fox	28	30	26	32	26	26	30	30
Vancomycine	28	30	30	36	25	32	32	27

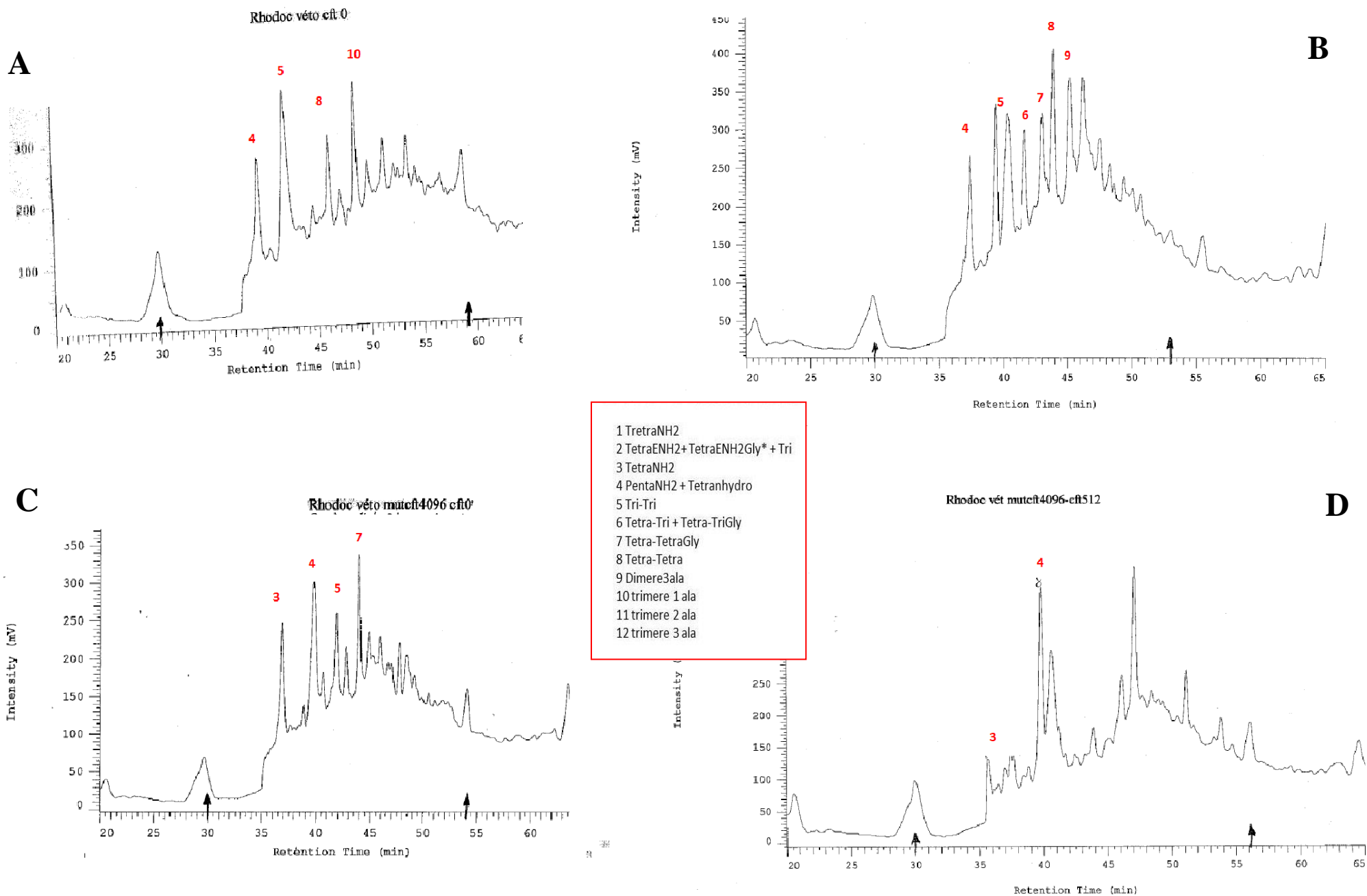
C pour contact Ant pour Antagonisme Cft pour ceftiofur Fox pour cefoxitine Rouge pour résistant Vert pour sensible

Les mutants obtenus sont bien résistants au ceftiofur. Les mutants obtenus à partir de la souche vétérinaire sont également résistants vis-à-vis de l'ampicilline. Tous les mutants conservent leur sensibilité à l'imipénème et à la céfoxitine.

c) Peptidoglycane des souches résistantes au ceftiofur

Les résultats des profils de peptidoglycane obtenus sur les mutants seront partiels en l'absence de confirmation en spectrométrie de masse à l'heure actuelle.

Figure 35 : Profils HPLC des peptidoglycanes des souches V et V4096.



A : souche V cultivée en l'absence de ceftiofur ; B : Souche V cultivée en présence de 0,25 mg/L de ceftiofur

C : souche mutante V4096 cultivée en l'absence de ceftiofur ; D : Souche V4096 cultivée en présence de 512 mg/L de ceftiofur

En se basant sur le profil et l'analyse connue de la souche H, il a été possible d'annoter ces 4 profils. Les 2 profils en haut sont ceux de la souche V en l'absence de ceftiofur (A) et en présence de concentration subinhibitrice de ceftiofur (B) (0,25 mg/L). En bas les profils sont ceux de la souche V4096 résistante au ceftiofur en l'absence (C) et en présence de ceftiofur (D) (512 mg/L).

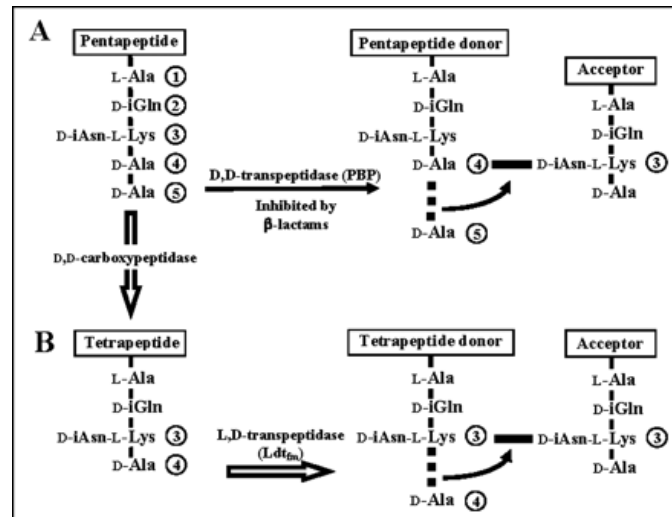
En l'absence de ceftiofur, la souche V et la V4096 possède des ponts interpeptidiques générés par D,D et L,D-transpeptidation

En concentrations subinhibitrices, la réponse bactérienne au niveau de la structure de son peptidoglycane est différente selon les souches. Cependant la diminution d'amplitude du pic 5 (tri-tri) caractéristique de la L,D transpeptidation chez la souche sauvage en présence de ceftiofur et sa disparition chez la souche mutante en présence de ceftiofur implique que le mécanisme principal de résistance au ceftiofur ne repose pas sur la L,D transpeptidation.

Il en va de même en D, avec la disparition apparente des tétrapeptides concomitants avec l'augmentation des pentapeptides (substrat de la D,D).

Les mécanismes de transpeptidations sont rappelés dans la **figure 36**.

Figure 36 : Voies de transpeptidation du peptidoglycane d'après Mainardi *et al.*, 2005



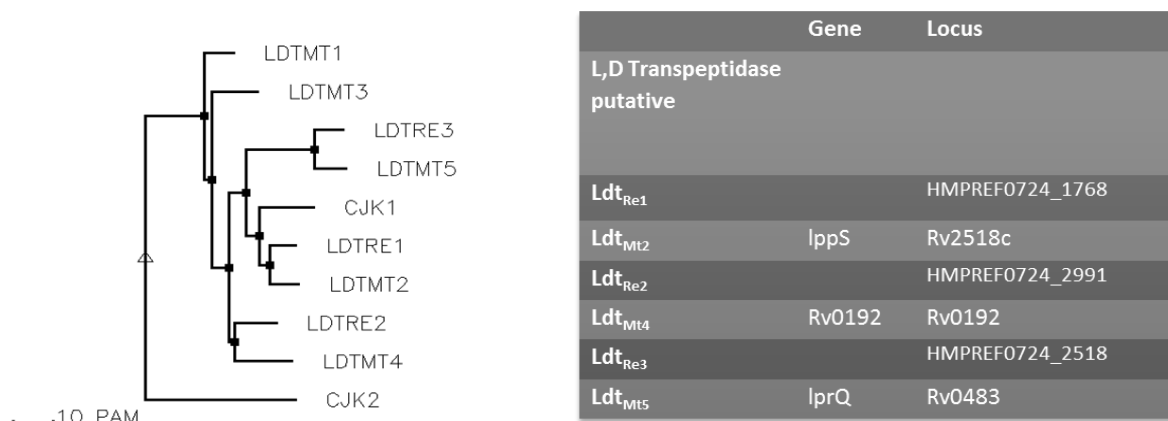
d) Analyse bio-informatique

L'objectif ici est de rechercher au sein du génome de la souche 103 S de *R. equi* qui vient d'être séquencé (Letek *et al.*, 2010), les séquences codant les protéines putatives impliquées dans la transpeptidation (L,D et D,D) à partir des séquences connues chez les espèces proches (*M.tuberculosis* et *C.jejikeium*).

Le modèle pour les enzymes de la L,D transpeptidation seront les L,D transpeptidases putatives de *M. tuberculosis*, isolées et testées *in vitro* par Marie Lavollay au sein de l'équipe du Pr Mainardi, et *C.jejikeium* pour les enzymes de la D,D transpeptidation.

L,D transpeptidation :

Figure 37 : Arbre de proximité entre les L,D putatives de *R.equi* et *M.tuberculosis* d'après COBALT sur le site NCBI



LdtMt sont les L,D-transpeptidases putatives de *M.tuberculosis* et LdtRe celles de *R.equi*.

Les séquences protéiques sont annotées en annexes.

R.equi possède donc des L,D transpeptidases putatives proches de celles décrites chez *M.tuberculosis* et par la même de *E.faecium*.

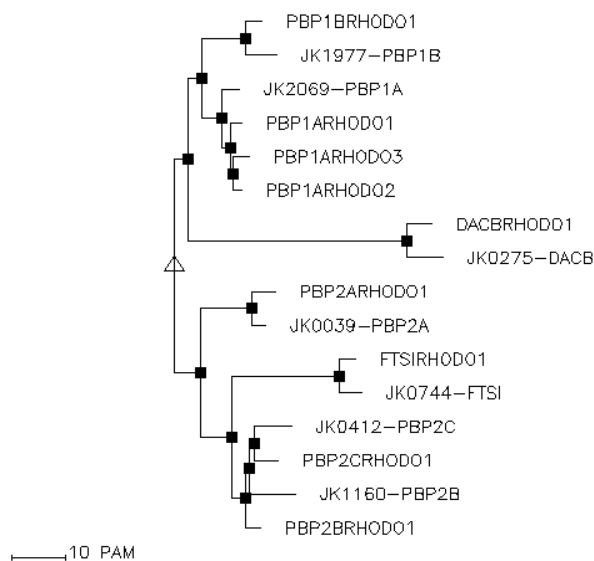
LdtMt2 est responsable de la résistance aux bêta-lactamines et est essentielle pour le maintien structural du peptidoglycane en phase de croissance chez *M.tuberculosis*. (Lavollay 2009) (Gupta *et al.*, 2010) et (Both *et al.*, 2013)

LdtRe1 pourrait donc être la L,D transpeptidase putative la plus utile à étudier.

D,D transpeptidation

L'analyse informatique sur le portail NCBI et sur la souche 103 S de *R. equi* a permis de mettre en évidence 7 PLP différentes, toutes proches de celles de *Corynebacterium jeikeium* (**figure 38 et tableau 19**).

Figure 38 : PLP putatives de *R. equi* et proximité avec celles de *C. jeikeium*



Les séquences annotées sont en annexes.

Tableau 19 : PLP putatives, gène et locus chez *R. equi*

PLP putative	Gène	Locus
PLP1a Classe A	Mrcb ponA	Hm 3401
PLP1b Classe A	Pon	
PLP2a Classe B		Hm 3502
PLP2b Classe B		HM 2760 Hm 2900
PLP2c Classe B		Hm 2900 Hm 2760
ftsI PLP 3 Classe A		Hm 1483
Dacb PLP 4 BPM	Dacb	

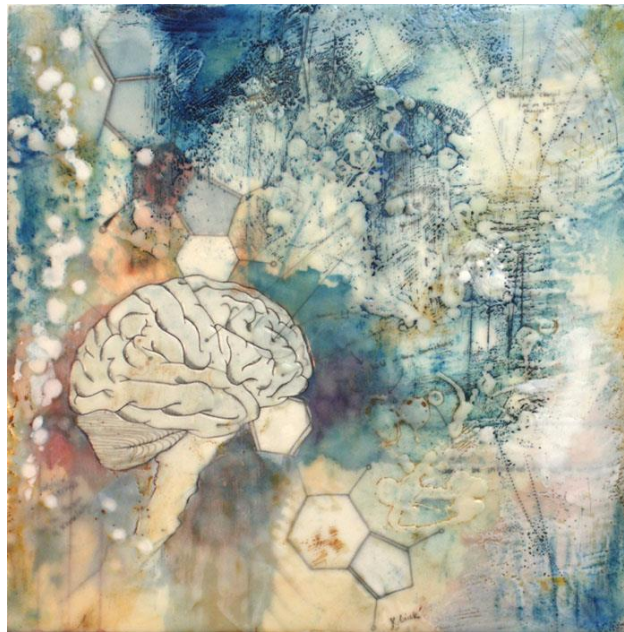
La résistance aux bêta-lactamines est médiée chez *C. jeikeium* par une PLP de faible affinité, PLP2c. La L,D transpeptidation n'est pas impliquée car la formation des substrats tétrapeptidiques est sous le contrôle de la PLP4 et non de DdcY ou VanY comme chez *M. tuberculosis*. (Lavollay, 2009)

L'analyse bioinformatique a permis d'identifier un gène candidat (PLP4) codant une D,D-carboxypeptidase potentielle. (Lavollay, 2009) En revanche, aucun homologue de DdcY ni de VanY n'a été détecté dans le génome de cette souche. DdcY et VanY sont des D,D-carboxypeptidases insensibles à la pénicilline. Ce sont des métallo-enzymes qui n'appartiennent pas à la famille des PLP (Mainardi *et al.*, 2008).

Béta-lactamases

Chez la souche ATCC 33701 une béta-lactamase putative a pu être détectée mais elle n'est pas retrouvée chez la souche 103S. La grande variabilité génétique des isolats de *R. equi*, pourrait expliquer ce phénomène.

Ne cherche pas à savoir toute chose, de peur de tomber dans l'ignorance totale. Démocrite



<http://www.kindracrick.com/index.php/projects/illusion-of-knowledge/>