

# Quatrième partie : Analyses, discussions, digressions, conclusions

## IV.1) Analyses/Discussions

### a) Limites

Les analyses comparatives des génomes actuellement connus de *R. equi*, des souches 103 S et ATCC 33701 montrent qu'il existe des différences notables entre ces 2 souches : par exemple la présence ou l'absence de bêta-lactamase putative chromosomiale.

L'espèce *R. equi* est assez hétérogène. (McMinn *et al.*, 2000). Ces différences peuvent contribuer au phénotype résistant aux bêta-lactamines observé dans ce travail. Lors de ce travail, aucune analyse de biologie moléculaire n'a pu être entreprise.

### b) Analyses

Notre objectif était d'analyser la susceptibilité de *R. equi* aux bêta-lactamines, notamment au ceftiofur, la structure du peptidoglycane de cette espèce, les modifications structurales éventuelles du peptidoglycane chez les souches résistantes au ceftiofur et d'étudier l'activité intracellulaire des bêta-lactamines.

Pour cet objectif nous avons recueilli un total de 20 souches différentes, dont 17 souches d'origine équine, 1 souche hospitalière humaine et 2 souches de référence ATCC 33701 avec ou sans plasmide de virulence.

**La première partie de ce travail concerne l'analyse de l'activité antibactérienne du ceftiofur sur gélose, microplaques et en intracellulaire.**

Nos résultats font apparaître que les souches de *R. equi* testées sont sensibles à de nombreux antibiotiques de familles différentes (fluoroquinolone, bêta-lactamines, aminosides, macrolides, glycopeptides, ansamycine), ce qui en fait, théoriquement, un agent bactérien facile à traiter et non encore préoccupant du point de vue de l'antibiorésistance en santé publique.

Nous avons pu observer des phénomènes d'interaction, antagonisme ou synergie notamment entre la céfalotine ou la céfalexine et l'imipénème. Ces résultats pouvaient suggérer l'existence d'une céphalosporinase inductible ; cependant le test de détection de bêta-lactamase à la nitrocéfine réalisé sur la souche H prélevée au niveau de la zone d'antagonisme s'est révélé

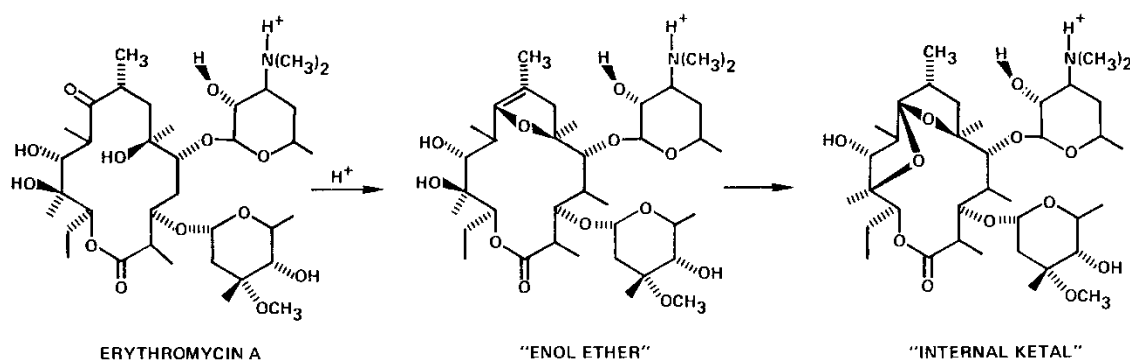
négatif. Nordmann *et al.*, (1993) avaient proposé la possibilité d'une induction d'une PLP (PLP3a) de faible affinité.

Par ailleurs, nos résultats révèlent la présence d'au moins 2 types de populations au sein des souches animales : celles qui sont sensibles à la majorité des bêta-lactamines et celles qui présentent des résistances à certaines bêta-lactamines.

Les résultats en microplaque confirment ceux obtenus sur gélose, pour les 3 souches testées, et illustrent surtout l'importance du pH pour l'activité des antibiotiques. L'activité supérieure des bêta-lactamines à pH acide pourrait impliquer, comme pour la PLP2a de *S. aureus*, une ou plusieurs PLP dont le site actif deviendrait plus accessible en pH acide pour les céphalosporines de 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> générations. En effet, une altération de la PLP2a, associée à la résistance des SARM, a été démontrée à pH acide (Hartman *et al.*, 1984). De ce fait, à pH acide, les bêta-lactamines interfèrent plus activement avec cette PLP qui subit des changements de conformation (Lemaire *et al.*, 2008). Enfin, l'activité de plusieurs bêta-lactamases peut également être modifiée à pH acide (Ohsuka *et al.*, 1995).

En ce qui concerne les macrolides, l'activité moindre en pH acide varie selon les molécules et peut être due soit à une concentration intrabactérienne plus faible (et donc une fixation moindre sur le site d'action, la sous unité 50S du ribosome) car les bactéries sont plus perméables à la forme non ionisée des molécules, soit à une dégradation de la molécule elle-même, comme par exemple l'hémi-acétalisation de l'érythromycine A suivi de la formation de l'anhydroérythromycine (**Figure 39** ; Fiese *et al.*, 1990).

Figure 39 : Dégradation de l'érythromycine A à pH acide d'après Fiese *et al.*, 1990



Pour l'étude de l'activité intracellulaire nous avons comparé 2 antibiotiques d'usage exclusivement vétérinaire, une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération, le ceftiofur, et une

fluoroquinolone, la marbofloxacin, sur une souche animale sensible au ceftiofur (CMI=0.25µg/mL) et une souche humaine intermédiaire (CMI =4µg/mL).

Les études de bactéricidie en milieu liquide suggèrent une action temps-dépendante du ceftiofur et concentration-dépendante pour la marbofloxacin. Pour l'étude de la phagocytose nous avons utilisé les cellules THP1 (une lignée humaine de leucémie monocyttaire aiguë) qui permettent, en raison de leur faible pouvoir bactéricide, de mettre en évidence l'action antibiotique seule. Le ceftiofur possède une activité intracellulaire vis-à-vis de la souche vétérinaire mais bactériostatique aux doses physiologiques. Cette activité semble inférieure à celle de la marbofloxacin qui, comme la majorité des fluoroquinolones, pénètre probablement mieux et dont l'action est concentration-dépendante.

### **La deuxième partie de notre travail est une analyse préliminaire de la structure du peptidoglycane de *Rhodococcus equi***

Nous avons initialement étudié la souche hospitalière H. En phase stationnaire, le peptidoglycane de *R. equi* possède essentiellement des tétrapeptides et des liaisons de type 4-3, générées par D,D transpeptidation (92,8 %). L'analyse de la fraction réduite nous a donné la composition des sucres ; on trouve à la fois des dimères originaux GlucNac-MurNglyc mais aussi des dimères classiques GlucNac-MurNac. Ces résultats suggèrent qu'en l'absence d'antibiotique, en phase stationnaire, le peptidoglycane de la souche hospitalière est synthétisé très majoritairement au moyen de la voie de D,D-transpeptidation, la voie de L,D-transpeptidation étant présente mais minoritaire.

A partir d'une souche vétérinaire et de la souche hospitalière, différents mutants ont ensuite été sélectionnés dans l'optique d'étudier les modifications du peptidoglycane associées à la résistance ainsi que sa composition en présence de ceftiofur. Les mutants obtenus étaient bien résistants au ceftiofur ; les mutants obtenus à partir de la souche vétérinaire sont également résistants à l'ampicilline. Tous les mutants conservent une sensibilité à l'imipénème et à la céfoxitine.

L'exploitation des profils de peptidoglycane obtenus sur les mutants sera partielle en l'absence de résultats de spectrométrie de masse à l'heure actuelle. On note que contrairement à ce qu'on trouve chez *M. tuberculosis* mais de façon identique à ce que l'on trouve chez *C. jeikeium*, la voie L,D-transpeptidation chez les mutants et en présence de ceftiofur ne devient pas majoritaire

et ne remplace pas la voie D,D-transpeptidation usuelle. Ces résultats confortent l'idée que chez *R. equi* la résistance aux bêta-lactamines implique une PLP de faible affinité. Nordmann *et al.*, (1993) ont pu extraire 4 PLP par électrophorèse chez *R. equi*. Elles ont chacune une sensibilité différente à la pénicilline et aux carbapénèmes. Chez le mutant résistant, l'affinité de la PLP 3a était 40 fois supérieures pour le méropénème en comparaison à la PLP3 non résistante. (**figures 40 et 41**) Les auteurs ont montré l'implication de la PLP3, d'une de ses formes modifiées PLP3a dans les phénomènes de résistance à l'imipénème et ils supposaient son implication dans les phénomènes d'antagonisme entre bêta-lactamines.

Figure 40 Electrophorèse des PLP de *R. equi* d'après Nordmann *et al.*, 1993

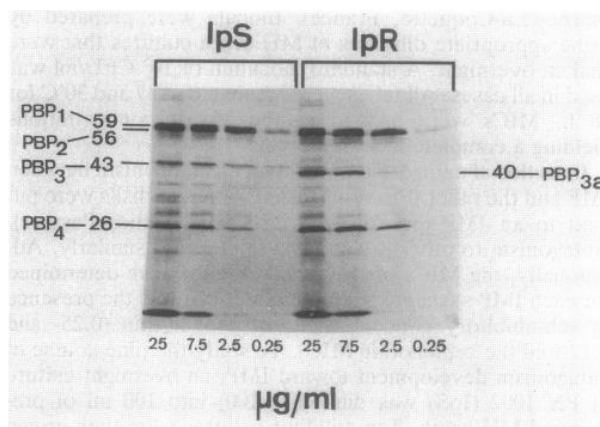


Figure 41 Affinité des PLP de *R. equi* à la pénicilline, à l'imipénème et au méropénème d'après (Nordmann *et al.*, 1993)

TABLE 2. Affinities of PBPs of strains IpS and IpR for  $\beta$ -lactam antibiotics

PBP	50% saturation ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>					
	[ <sup>3</sup> H]penicillin G		Imipenem <sup>b</sup>		[ <sup>14</sup> C]meropenem	
	IpS	IpR	IpS	IpR	IpS	IpR
1/2	2	1	<0.12	<0.12	0.09	0.13
3	4	— <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	—	0.12	—
3a	—	9	—	3	—	4
4	5	4	<0.12	<0.12	0.07	0.05

<sup>a</sup> The MICs of [<sup>3</sup>H]penicillin G, imipenem, and [<sup>14</sup>C]meropenem for the IpS and IpR strains were 8 and 8  $\mu\text{g/ml}$ , 0.25 and 2  $\mu\text{g/ml}$ , and 0.5 and 4  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

<sup>b</sup> A competition experiment was performed.

<sup>c</sup> —, absent or barely visible.

<sup>d</sup> ND, not detectable, since this PBP always disappeared during the competition experiments.

## IV.2) Digressions/Perspectives

Nous signalons, à nouveau, la facilité avec laquelle des mutants très résistants aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> ont pu être obtenus dans ce travail, surtout dans le contexte actuel de

questionnements sur l'utilisation de ces molécules et de leur conséquence sur l'émergence d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

De nombreux travaux font état d'une résistance croissante des entérobactéries et de *Pseudomonas* au ceftiofur au cours des dernières années. (Theelen *et al.*, 2013) (Dierix *et al.*, 2012). Des isolats équitains d'entérobactéries résistantes au ceftiofur montrent une multirésistance et montrent un potentiel de transfert horizontal au moins *in vitro* (Van duijkeren *et al.*, 2007).

L'antibiorésistance croissante voit l'émergence de nouveaux concepts pour une utilisation raisonnée des agents antibactériens.

#### a) PAE (post antibiotic effect) Effet post antibiotique

Le PAE pour un antibiotique donné pour un microorganisme donné est défini comme la persistance de l'inhibition de la croissance bactérienne, en l'absence de système immunitaire et après une brève exposition à un agent anti-bactérien. Des atteintes génétiques sont envisagées pour expliquer ce mécanisme. Cet effet est intéressant car il signe une efficacité pour un agent anti-bactérien à des concentrations en dessous de la CMI, ce qui se produit en fin de traitement et entre les prises de médicaments. Un PAE long limiterait la survenue de résistance.

Giguere *et al.*, (2012) ont étudié le PAE des antibiotiques courants en médecine équine (**figure 42**). Les PAEs de la rifampicine, de l'érythromycine, de la clarithromycine, de la vancomycine, et de la doxycycline sont relativement longs avec une durée moyenne entre 4,5 et 6,5 h. L'azithromycine, la gentamicine, et l'imipénème ont des PAEs moyens entre 3,3 et 3,5 h. L'amikacine, l'enrofloxacin, et le ceftiofur ont des PAE assez courts entre 1,3 et 2 h.

Cette étude montre aussi une synergie entre macrolides (érythromycine, azithromycine ou clarithromycine) et rifampicine ou doxycycline, ainsi qu'un antagonisme entre aminosides (gentamicine ou amikacine) et macrolides. Le comportement des macrolides avec les bêta-lactamines testées (ceftiofur et imipénème) est neutre.

Figure 42 PAE de 11 antibiotiques contre *R. equi* d'après Giguère *et al.*, 2012

Antimicrobials	PAE (h)
Rifampin	4.7 (4.0–7.8)
Erythromycin	6.5 (6.4–6.5)
Clarithromycin	6.3 (5.1–6.4)
Azithromycin	3.5 (3.4–3.6)
Amikacin	1.3 (1.0–1.4)
Gentamicin	3.5 (3.3–3.7)
Enrofloxacin	1.5 (1.1–1.5)
Vancomycin	5.7 (4.5–6.4)
Imipenem	3.3 (2.9–4.5)
Ceftiofur	2.1 (1.6–2.8)
Doxycycline	4.5 (4.1–7.0)

b) MPC (concentration prévenant la survenue de mutant) et MSW (fenêtre de sélection de mutant)

(Blondeau *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 1999; Drlica *et al.*, 2004).

De nouveaux concepts ont émergé récemment en pharmacodynamie et pharmacocinétique dans le cadre de l'étude des antibactériens. L'objectif n'est plus uniquement de traiter et de dépasser une CMI, mais aussi d'examiner l'impact du traitement sur l'émergence de résistance. On parlera alors de MPC (concentration prévenant la survenue de mutant) et de MSW (fenêtre de sélection de mutant).

La MPC correspond à la concentration à laquelle aucun mutant n'apparaît en présence d'un inoculum bactérien élevé, ou la concentration nécessaire pour prévenir la sélection des « premiers mutants ». (**figures 44 et 45**) La MPC est supérieure à la CMI. La CMI est la concentration pour laquelle la plupart des bactéries présentes ont leur croissance inhibée. Cependant quelques bactéries au sein de l'inoculum, avec une fréquence de 1 pour  $10^7$ - $10^9$  sont naturellement résistantes, mutées et peuvent continuer à croître après un temps d'adaptation. (Martinez et Baquero, 2000) Les techniques usuelles de détermination de CMI se font avec un inoculum faible de l'ordre de  $10^5$ - $10^6$  cfu ; elles ne permettent donc pas de mettre en évidence ce phénomène.

La MSW est la période durant laquelle la concentration plasmatique, ou locale est comprise entre la MPC et la CMI. Les premiers mutants se multiplient et peuvent alors muter à nouveau toujours avec une fréquence de l'ordre de  $10^7$ - $10^9$ . (**Figures 44 et 45**)

Figure 43 Illustration de la MPC/ Comparaison avec la CMI d'après <http://www.facm.ucl.ac.be/Advanced-Courses/cours-2004/French/4B-Resistance-and-PK-PD-FR.pdf>

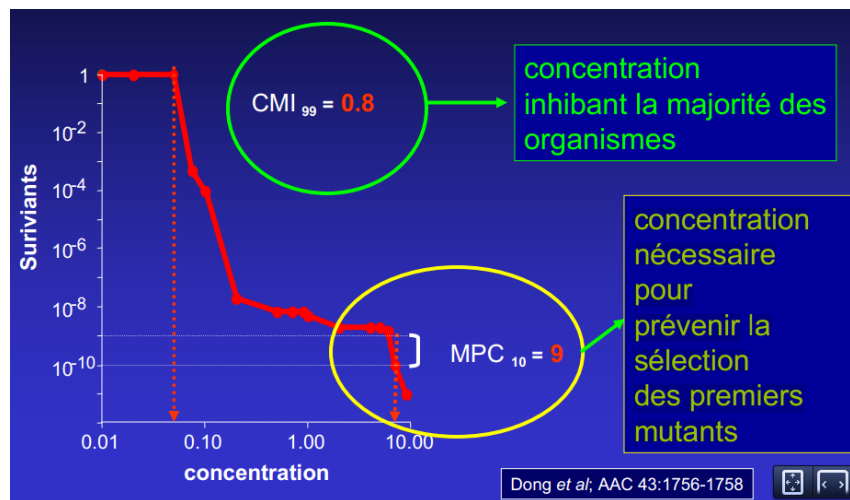
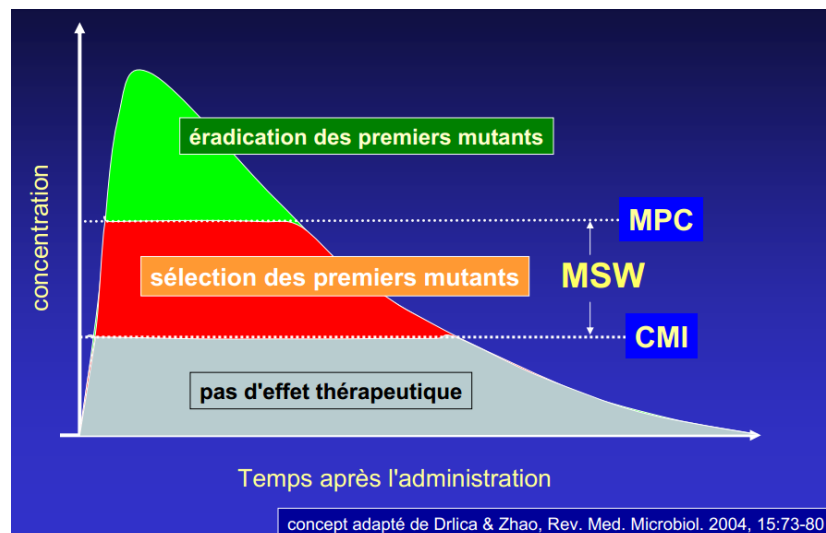


Figure 44 Illustration de la MSW d'après <http://www.facm.ucl.ac.be/Advanced-Courses/cours-2004/French/4B-Resistance-and-PK-PD-FR.pdf>



Un agent antibactérien pour lequel la concentration plasmatique ou locale restera le moins longtemps en dessous de la MPC ne permettra pas la sélection d'une population bactérienne résistante. On exprimera ce concept en pharmacocinétique par un ratio aire sous la courbe sur MPC élevé.

Une seule étude à ce jour a été menée pour déterminer les MPC et MSW de 10 antibiotiques couramment utilisés en médecine équine sur *R. equi*: l'érythromycine, la clarithromycine, l'azithromycine, la rifampicine, l'amikacine, la gentamicine, l'enrofloxacin, la vancomycine, l'imipénème, et la doxycycline. (Giguère *et al.*, 2013) (**figures 45 et 46**)

Figure 45 : CMI et MPC de 10 antibiotiques courants contre 4 souches virulentes de *R. equi* d'après Giguère *et al.*, 2013

Antimicrobial	<i>R. equi</i> 156867			<i>R. equi</i> 156261			<i>R. equi</i> 162059			<i>R. equi</i> 103		
	MIC	MPC	Ratio	MIC	MPC	Ratio	MIC	MPC	Ratio	MIC	MPC	Ratio
Rifampin <sup>a</sup>	0.031	512	16,384	0.031	512	16,384	0.5	≥1024	≥2048	0.063	512	16,384
Erythromycin <sup>b</sup>	0.25	4	16	0.25	4	16	64	0.5	4	8	0.5	16
Clarithromycin <sup>c</sup>	0.031	1	32	0.063	1	64	0.031	1	32	0.031	1	32
Azithromycin <sup>b</sup>	0.5	32	64	1	32	32	0.5	16	32	0.125	32	256
Amikacin <sup>a</sup>	4	512	128	4	512	256	4	256	64	1	256	256
Gentamicin <sup>b</sup>	0.5	16	32	0.25	16	16	0.5	16	32	0.125	16	128
Enrofloxacin <sup>b</sup>	1	64	64	0.5	64	32	0.5	8	16	1	32	32
Vancomycin <sup>b</sup>	0.125	8	64	0.25	8	32	0.25	4	16	0.125	4	32
Imipenem <sup>b</sup>	0.5	128	256	1	128	128	1	16	16	0.5	32	64
Doxycycline <sup>b</sup>	1	64	64	0.5	64	32	0.5	16	32	0.25	4	16
Azithromycin + rifampin	0.5 <sup>d</sup>	2 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	1	4 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	0.5	2 <sup>e</sup>	4	0.125	2 <sup>e</sup>	16 <sup>e</sup>
Clarithromycin + rifampin	0.031 <sup>d</sup>	0.24 <sup>e</sup>	8 <sup>e</sup>	0.063	0.24 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	0.031	0.12 <sup>e</sup>	4	0.031	0.24 <sup>e</sup>	8 <sup>e</sup>
Erythromycin + rifampin	0.25 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	0.031	0.24 <sup>e</sup>	8 <sup>e</sup>	0.5	1 <sup>e</sup>	2	0.5	0.5 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>

<sup>a-c</sup> Different letters between drugs indicate a statistically significant ( $P < 0.05$ ) difference in MPC between drugs.

<sup>d</sup> MIC of the macrolide.

<sup>e</sup> MPC and MIC/MPC ratios of the drug combination are significantly lower than that of each individual respective drug.

Figure 46 : Paramètres pharmacocinétiques des 10 antibiotiques testés d'après Giguère *et al.*, (2013)

Antimicrobial	Dosage regimen (mg/kg)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	AUC <sub>24</sub> (µg h/ml)	AUC <sub>24</sub> /MPC (h)	%T > MIC	%T > MPC	%T <sub>MSW</sub>
<b>Plasma</b>							
Rifampin	10, q 24 h, PO	7.4	162	0.3 (≤0.2-0.3)	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Erythromycin	25, q 6 h, PO	1.4	12.4	3.1 (0.8-3.1)	71 (42-100)	0 (0-0)	71 (42-100)
Clarithromycin	7.5, q 12 h, PO	0.9	6.8	6.8 (6.8-6.8)	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Azithromycin	10, q 24 h, PO	0.6	8.1	0.3 (0.3-0.5)	34 (0-100)	0 (0-0)	34 (0-100)
Amikacin	25, q 24 h, IV	58	195	0.6 (0.4-0.8)	33 (33-100)	0 (0-0)	33 (33-100)
Gentamicin	12, q 24 h, IV	71	211	13 (13-13)	100 (100-100)	17 (17-17)	83 (83-83)
Enrofloxacin	25, q 24 h, IV	2.1	58.5	1.4 (0.9-7.3)	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Vancomycin	6.6, q 8 h, IV	13	285.9	54 (35-71)	100 (100-100)	44 (25-63)	61 (47-75)
Imipenem	10, q 6 h, IV	9.0	25.6	0.5 (0.2-1.6)	43 (36-50)	0 (0-0)	43 (36-50)
Doxycycline	10, q 12 h, PO	4.1	70.6	2.8 (1.1-18)	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Clarithromycin (+ rifampin)	7.5 + 10, q 12 h, PO	0.2	2.4	10 (10-20)	100 (67-100)	0 (0-0)	100 (67-100)
<b>BAL cells</b>							
Rifampin	10 q 24 h, PO	4.9 <sup>a</sup>	NA	NA	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Erythromycin	25 q 6 h, PO	2.5	103	26 (6.4-26)	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Clarithromycin	7.5 q 12 h, PO	74.2	2328	2328 (2328-2328)	100 (100-100)	100 (100-100)	0 (0-0)
Azithromycin	10 q 24 h, PO	49.8	4679	146 (146-292)	100 (100-100)	100 (100-100)	0 (0-0)
Doxycycline	10 q 12 h, PO	6.3	NA	NA	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Clarithromycin (+ rifampin)	7.5 + 10 q 12 h, PO	24.8 <sup>a</sup>	NA	NA	100 (100-100)	100 (100-100)	0 (0-0)
<b>PELF</b>							
Rifampin	10 q 24 h, PO	8.5 <sup>a</sup>	NA	NA	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Erythromycin	25 q 6 h, PO	<LOD	NA	NA	NA	0 (0-0)	NA
Clarithromycin	7.5 q 12 h, PO	49.0	1258	1258 (1258-1258)	100 (100-100)	100 (100-100)	0 (0-0)
Azithromycin	10 q 24 h, PO	10.0	494	146 (146-292)	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Doxycycline	10 q 12 h, PO	11.3	NA	NA	100 (100-100)	0 (0-0)	100 (100-100)
Clarithromycin (+rifampin)	7.5 + 10 q 12 h, PO	3.3 <sup>a</sup>	NA	NA	100 (100-100)	100 (100-100)	0 (0-0)

<sup>a</sup>Concentration 12 h after drug administration; LOD, limit of detection; NA, data not available.

PELF (pulmonary epithelial lining fluid) pour le liquide baignant les cellules épithéliales pulmonaires. Les BAL (bronchoalveolar) cells pour les macrophages pulmonaires. %T<sub>MSW</sub> quantifie le pourcentage d'exposition à des concentrations "dangereuses", en dessous de la MPC lors d'un traitement d'un poulain aux posologies et modalités d'administration usuelles

Dans cette étude, la clarithromycine possède la plus faible MPC et *a contrario* la rifampicine la plus haute MPC et la plus longue exposition à la MSW.



Il est important de signaler, que malgré l'incapacité de tous les composés testés à dépasser leur MPC au niveau plasmatique, la clarithromycine seule et l'association rifampicine-clarithromycine permettent d'être systématiquement au-dessus de la MPC au niveau pulmonaire tout au long du traitement.

### c) Autres approches pour le traitement de la rhodococcose

#### Vaccin

De nombreux essais sont en cours pour élaborer un vaccin efficace et facile d'emploi (MSD vaccin intrarectal ; Cardoso *et al.* (2013) vaccin vivant oral et intranasal).

Cardoso *et al.* (2013) travaillent sur une souche atténuée et modifiée de *Salmonella enterica typhimurium* qui a prouvé son efficacité dans la délivrance et la présentation, par un mécanisme non complètement élucidé, de l'antigène VapA, ainsi que dans l'induction d'une réponse immunitaire Th1 durable chez la souris, que ce soit par voie orale ou nasale. Cependant, ce type de vaccin OGM risque de se heurter aux commissions d'enregistrement en France et en Europe.

#### Modulation de la réponse inflammatoire

L'addition de streptolysine-O (SLO) au régime antibiotique standard a des résultats supérieurs au traitement antibiotique seul après infection expérimentale des poulains à *R. equi*. Plusieurs gènes importants dans la réponse inflammatoire (MMP9, MMP2, TIMP2, COL1A1, COL12A1, ITGAL, ITGB1, FN1, CCL2, CCL3, CXCL9, TNF $\alpha$ , SMAD7, CD40, IL10, TGFB1, TLR2) sont significativement inhibés, en lien avec l'amélioration clinique. (Gurel *et al.*, 2013)

En dehors de son activité anti-bactérienne, le ceftiofur inhibe la myéloperoxidase responsable de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les neutrophiles. Dans un modèle murin d'infection pulmonaire, le ceftiofur réduit l'infiltration pulmonaire par des cellules inflammatoires, diminue la fibrose, et la production de cytokines proinflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, et IL-8). Selon ces études, le ceftiofur possède un effet protecteur vis-à-vis des lésions pulmonaires aiguës induites par le LPS et son utilisation pourrait être justifiée en cas de pathologie pulmonaire inflammatoire. (Xinxin Ci *et al.*, 2008 ; Xiao Chu *et al.*, 2010)

#### Aérosolthérapie.

De nouveaux schémas thérapeutiques permettent l'utilisation de la marbofloxacine par inhalation chez le cheval. On obtient localement aux sites infectieux des concentrations au moins 10 fois supérieures au Cmax. Les mesures de la fonction pulmonaire ne sont pas

différentes entre le groupe soumis à l'inhalation de marbofloxacin et le groupe soumis à l'inhalation de solution saline. Aucun effet indésirable (inconfort, toux) n'est observé. Quinze minutes après l'inhalation de marbofloxacin, la concentration antibiotique dans le liquide bronchoalvéolaire est 5,5 fois plus élevée et la concentration sanguine est 27 fois plus faible que lors de l'administration de marbofloxacin en intraveineux. L'utilisation hors AMM de marbofloxacin en cas d'infection des voies respiratoires chez le cheval semble justifiée par les résultats d'une étude qui compare les indices de fonction pulmonaire après inhalation de cet antibiotique. Outre l'absence d'effets secondaires, ce protocole montre que la concentration intrapulmonaire en antibiotique suite à une aérosolthérapie est meilleure que celle obtenue par voie intraveineuse. Quelques céphalosporines, comme la ceftazidime, peuvent être utilisées en inhalation. L'utilisation du ceftiofur est une option innovante déjà décrite et utilisée chez le cheval dans le cadre d'infections pulmonaires chez l'adulte. (Leleu, 2007)

### VI.3) Conclusions

La rhodococcose pose de sérieux problèmes économiques. Les traitements de référence actuels chez le poulain reposent sur l'association de macrolides et d'ansamycine, dont les effets secondaires ne sont pas nuls. De plus, l'émergence aux Etats-Unis de souches virulentes résistantes aux macrolides et à la rifampicine, nécessite la recherche d'alternatives rationnelles et sans danger. Il est bon aussi de rappeler à ce stade que *R. equi*, actinomycétale proche de *M. tuberculosis* et *C. jeikeium*, est aussi transmissible et infectieux pour l'homme, surtout chez les immunodéprimés. Le risque de transmission interspécifique de mécanismes de résistance est tout à fait possible.

Les bêta-lactamines sont des antibiotiques cruciaux, et utilisés massivement. Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération occupent une part grandissante en médecine vétérinaire ces dernières années et leur utilisation irraisonnée est un sujet de préoccupation majeure surtout dans les filières porcine, aviaire et bovine. En médecine canine et équine, le problème risque de se poser dans les années à venir, du moins du point de vue de la réglementation avec la restriction de leur usage.

Ce travail, outre la composition mixte (ponts 3,3 et 4,3) du peptidoglycane de *R. equi* en phase stationnaire, a mis en évidence l'implication probable de PLP de faible affinité dans les mécanismes de résistances aux bêta-lactamines. *In vitro* et *in cellulo*, le ceftiofur possède une activité intéressante contre les souches sauvages testées de *R. equi*. Cependant, l'usage du ceftiofur ne semble pas, au vu de ce travail, une alternative envisageable et raisonnable au traitement actuel de la rhodococcose chez le poulain. Les interdictions réglementaires à venir iront probablement dans ce sens.

Ces 20 dernières années, d'importants progrès ont été faits dans la compréhension de la biologie, des mécanismes de virulence, des paramètres épidémiologiques de la rhodococcose, et particulièrement au cours des deux dernières années à la suite du séquençage du génome de la souche 103 S de *R. equi*. Cependant, il reste beaucoup à faire dans l'élaboration de plans de gestion efficaces, responsables et pérennes, mais aussi il reste à approfondir les mécanismes de résistance, notamment aux bêta-lactamines.

La vaccination et l'approfondissement de nos connaissances concernant les mécanismes immunologiques mis en jeu, les nouveaux agents anti-bactériens naturels, la mise en place de bonnes pratiques d'élevage et de soin, sont autant de pistes nécessaires mais complexes à explorer dans le futur.

Le traitement des maladies infectieuses repose encore sur l'utilisation de molécules ciblant plus ou moins spécifiquement l'agent pathogène responsable. L'optimisation de la réponse immunitaire, l'utilisation de phages restent des voies de recherche intéressantes.

*« La méthode, c'est le chemin, une fois qu'on l'a parcouru. » Marcel Granet*



<http://aces.nmsu.edu/aces/labs.html>

# Cinquième partie : Matériels et Méthodes

## V.1) Consommables

Eau miliQ : eau distillée osmosée passée sur résine échangeuse d'ions

PBS : Tampon phosphate (Phosphate buffered saline)

Pour 2 L : NaCl 16g ; KCl 0,4g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4g (Sigma)

BSA (Bovine Serum Albumin) pour le dosage des protéines (Sigma)

### Milieux de culture

Le milieu de référence utilisé pour établir les CMI est le milieu de Mueller Hinton (MH) : (BD)

Pour 1 L de bouillon MH type II : Extrait de Bœuf 1g ; peptone de caséine 12,5g ; amidon de maïs 1,5g

Pour 1L de gélose MH 17g d'agar en plus.

La réalisation des comptages bactériens pour les expériences de bactéricidie totale, de phagocytose ou d'activité intracellulaire est faite sur des géloses de type cœur-cervelle (BH - brain heart-) (BD)

Pour 1 L de bouillon Protéose peptone 10g Infusion de cervelle de veau 12,5g infusion de cœur de bœuf 5g Glucose 2g NaCl 5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5g

Pour 1L de gélose BH 15g d'agar en plus

Les cultures cellulaires (THP1), et les expériences d'activité intracellulaire ont été réalisées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) additionné à 5% de FCS (fœtal calf serum) (pour favoriser la phagocytose). (Sigma)

### Antibiotiques :

Pénicilline G / Gentamicine Erythromycine/ Céphalexine / Amoxicilline / Ampicilline / Oxytétracycline (Sigma)

Azithromycine (Pfizer) / Ceftazidime (Fortum© GSK) / Ceftriaxone (Rocéphine ©Roche) / Céfoxitine (Merck) / Imipénème (Tienam © Merck) / Vancomycine (Vancocyn© Illy lilly)/ Rifampicine (Sanofi) / Ceftiofur (Axience) / Marbofloxacin (Marbocyl © Vétoquinol)

### Souches de *Rhodococcus equi* :

20 souches animales de terrain ont été fournies gracieusement par le laboratoire Vétoquinol

1 souche humaine hospitalière isolée à partir d'un patient ayant subi une greffe de rein a été fournie par le Pr Mainardi à l'hôpital Georges Pompidou à Paris (El Karoui *et al.*, 2009)

2 souches de référence ATCC 33701 avec et sans plasmide de virulence ont été fournies gracieusement par le Pr Leclercq.

### Cellules

Les THP1 sont maintenues en culture au sein du laboratoire de pharmacologie moléculaire et cellulaire de l'UCL.

## V.2) Protocoles détaillés

### a) Détermination des CMI en milieu solide

Des dilutions d'antibiotique sont incorporées dans des milieux de Mueller-Hinton gélifiés qui sont ensuite coulés en boîte de Pétri. Chaque boîte contient une concentration antibiotique différente.

Des dilutions d'antibiotiques sont préparées selon le **tableau 20**

1 mL de solution d'antibiotique est mélangé dans 19 mL de gélose liquide à 42°C. On homogénéise la gélose qui est coulée en boîte de Pétri, puis on fait sécher les boîtes sous hotte pendant 1h. Les concentrations finales vont de 128 à 0,25 µg/mL.

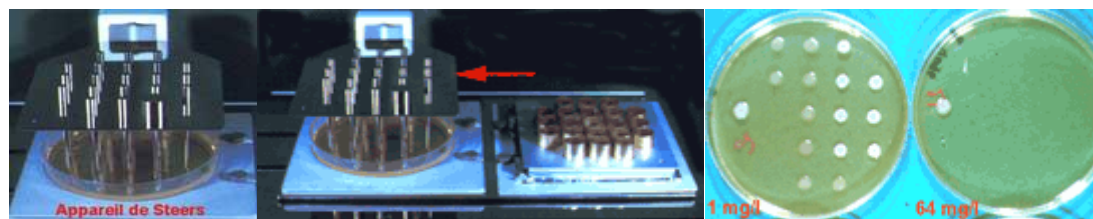
Des solutions bactériennes à 10<sup>7</sup>CFU/mL sont préparées à partir d'une culture de 12h. La spectrophotométrie à 450 nm permet de déterminer la dilution à effectuer. On utilise la machine de Steers pour l'ensemencement simultané des 20 souches. (**Figure 47**)

Chaque point d'inoculation ensemence 10<sup>4</sup> CFU sur la gélose. Après incubation, la dilution la plus grande inhibant la croissance d'une souche est notée.

Tableau 20 : Table permettant de déterminer les dilutions nécessaires à la fabrication de géloses contenant des concentrations croissantes d'antibiotiques d'après Eucast

Antimicrobial concentration (mg/L) in stock solution	Volume stock solution (mL)	Volume distilled water (mL)	Antimicrobial concentration obtained (mg/L)	Final concentration in medium after addition of 19 mL of agar
10 240	1	0	10 240	512
10 240	1	1	5120	256
10 240	1	3	2560	128
2560	1	1	1280	64
2560	1	3	640	32
2560	1	7	320	16
320	1	1	160	8
320	1	3	80	4
320	1	7	40	2
40	1	1	20	1
40	1	3	10	0.5
40	1	7	5	0.25
5	1	1	2.5	0.125
5	1	3	1.25	0.06
5	1	7	0.625	0.03
0.625	1	1	0.3125	0.015
0.625	1	3	0.1562	0.008
0.625	1	7	0.0781	0.004

Figure 47 : Appareil d'ensemencement de Steers d'après microbes-edu.org



### b) Détermination des CMI par E test®

Le principe de l'E-test® est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test® consiste en une bande en plastique non poreuse calibrée par un gradient pré établi de concentration d'antibiotiques couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en  $\mu\text{g/ml}$  d'une souche testée en milieu gélosé. (**figure 48**)

Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,016 à 256  $\mu\text{g/ml}$  ou 0,002 à 32  $\mu\text{g/ml}$  selon l'antibiotique.

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 12 h. La suspension a été calibrée à  $10^8$  CFU/mL.

Le E-test® se fait de préférence dans des boîtes de pétri de 150mm de diamètre.

L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage,

Incuber immédiatement les boîtes à 37°C pendant 24 heures.

Figure 48 : Détermination de la CMI par E-test® d'après biomérieux.com



### c) CMI en microplaques

Dans une plaquette à 96 puits (stérile) 100  $\mu\text{L}$  de MHB sont répartis au pH désiré (7 ou 5.5) dans chaque puits. Les deux dernières colonnes seront des témoins respectivement de croissance positive (pas d'antibiotique mais un inoculum bactérien), et un témoin négatif de stérilité (pas d'antibiotique ou d'inoculum bactérien).

Chaque ligne sur la plaque correspond à une gamme de concentration d'un antibiotique. Ainsi dans la première colonne on dispose 100µL de solution d'antibiotique quatre fois plus concentrée que la plus haute concentration dans la gamme, soit 1024µg/mL ou 8µg/mL. Des dilutions en série sont ensuite réalisées jusqu'à la dixième colonne grâce à la pipette multicanaux.

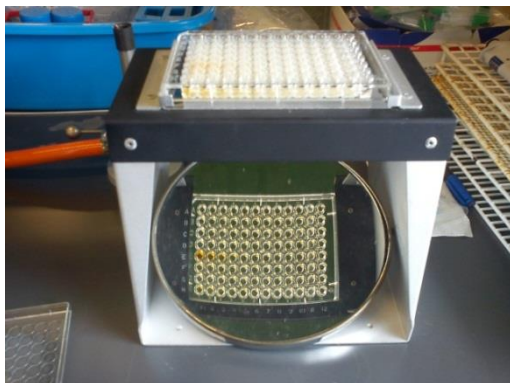
Les plaques ainsi préparées sont congelées à -20°C.

Les souches bactériennes à tester sont mises en culture, à 37°C sous agitation à 100 tours/minute sans CO<sub>2</sub>, dans du MHB à pH 7 ou 5,5. Le matin de l'expérimentation, les cultures de la nuit sont relancées dans du MHB frais avec une densité optique au temps 0 de 0,1 soit 10<sup>8</sup> bactéries/mL. Après 6h on obtient une culture de bactéries en phase exponentielle que l'on dilue afin d'obtenir une suspension de 10<sup>6</sup> bactéries/mL.

On décongèle les plaques 2 heures à l'avance en étuve à 37 °C, et l'on ajoute 100 µL de suspension bactérienne à 10<sup>6</sup> bactéries/mL dans les colonnes 1 à 11.

L'incubation est de 24h à 37°C sans agitation. La lecture est faite à l'œil nu. (**figure 49**)

Figure 49 : Lecture des CMI en microplaque



#### d) Bactéricidie totale

Quatre antibiotiques à 2 concentrations différentes ont été testés à pH 7: L'érythromycine (2CMI, 4CMI), la marbofloxacin (0,5 CMI, CMI), la rifampicine (CMI, CMax) et le ceftiofur (CMI, CMax)

Une culture bactérienne de 18 h dans du MHB à pH 7, est relancée au matin, dans du MHB frais avec une DO initiale de 0,2, pour 3 H à 37°C avec agitation. Puis on dilue ce bouillon dans du MHB frais pH 7 afin d'obtenir 2.10<sup>6</sup> bactéries/mL. Dans des tubes stériles de 5 mL, on met 1 mL de ce bouillon additionné de 1 mL de solution antibiotique 2 fois concentrée dans du MHB pH 7. Un comptage bactérien est réalisé sur gélose BH au temps 0, après 3 h, 6h et 24 h d'incubation à 37°C sous agitation. Les expériences sont réalisées en triplicate. Un tube sans antibiotique sert de témoin.



### e) Phagocytose

On cherche à préciser le nombre de bactéries phagocytées par cellule. On travaille à 500 000 cellules/mL avec 0,5, 1, 2,5, 5, 20 bactéries par cellules en triplicate. Les centrifugations se font à 1300 rpm/min pendant 8 minutes sur un rotor Eppendorf 5801R.

Pour chaque condition testée, une flasque de 5 mL de RPMI additionnée à 5 % de FCS est préparée à 500 000 cellules/mL après comptage avec une lame de Malassez, centrifugation et resuspension.

A partir d'une culture de 18h dans du MHB dilué, on ajoute dans les flasques le nombre de bactéries nécessaires. Après incubation de 1 h à 37 °C, sous 5 % de CO<sub>2</sub> sans agitation, les bactéries extracellulaires et non adhérentes aux cellules sont éliminées par centrifugation et lavage : centrifugation, récupération du culot et resuspension dans 5 mL de PBS additionné de gentamicine à 50µg/mL. Le milieu est incubé 45 minutes à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> sans agitation. On réalise 3 lavages au PBS afin d'éliminer la gentamicine, puis les cellules sont lysées dans de l'eau milliQ osmosée stérile afin de permettre le comptage bactérien par la technique de dilution. Enfin ces suspensions cellulaires sont soniquées afin de réaliser par la suite un dosage des protéines cellulaires ce qui permet un point de comparaison entre les expériences.

### f) Dosage des protéines en microplaque

C'est un dosage de type biuret qui utilise un lecteur de microplaque de marque Biorad. Les quantités de protéines à doser sont dans une gamme de 0 à 200µg/mL.

On dépose 40µL de blanc (eau milliQ ici), ou d'étalon (BSA à 25, 50, 100, 150, 200µg/mL), ou d'échantillon dans un puits. Dans chaque puits on ajoute ensuite 20µL de réactif Biorad DC Protein Assay Reagent A et 160µL de réactif Biorad DC Protein Assay Reagent B à l'aide d'une pipette multicanaux. A l'aide du lecteur de plaque on agite la plaque et on laisse à température ambiante 15 minutes. La lecture se fait à 655 nm.

### g) Activité intracellulaire

La technique est la même que pour la phagocytose avec 10 bactéries par cellules jusqu'au troisième lavage au PBS. Une partie du culot sert au dénombrement au temps 0 comme vu précédemment ; on ajoute au reste la quantité ad hoc d'antibiotiques et on laisse incuber 24 h à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. On effectue alors une lyse cellulaire, un dénombrement bactérien et un dosage protéique.

## h) Détermination de la structure du peptidoglycane

La détermination de la structure du peptidoglycane repose sur l'extraction du peptidoglycane, puis sa digestion et une séparation par HPLC, et enfin l'analyse par un spectromètre de masse. Ces protocoles reprennent ceux de Arbeloa *et al.*, 2004.

### Culture

Une préculture est réalisée à partir d'un isolat dans 20 ml de BHI + 0,5% tween 80 à 37°C sous agitation. Une culture dans 500mL de BHI +0,5% tween 80 est réalisée à partir de la préculture ; on dilue au 1/50<sup>e</sup> pour avoir une densité optique à 650nm de 0,15-0,2 et on laisse 1 heure à 37°C sous agitation. La D.O de la solution est relevée toutes les 30 minutes jusqu'à obtenir une D.O à 650 nm de 0,7-0,8 en environ 5h30-6h. On arrête alors la culture dans de la glace pendant 20 minutes. La suspension est centrifugée dans un pot de 1 L à 600t/min pendant 20 minutes à 4°C (rotor 9.100 Beckman). Le culot est congelé à -20°C.

### Cassage des bactéries

On réalise ensuite le cassage des bactéries. Le culot est remis en suspension dans 6mL de tampon phosphate Potassium, 10mM, pH 7,0. Dans une fiole de Mickler avec 6 mL de suspension on ajoute 6g de billes de verre (150-200µm). Le cassage dure une nuit à +4° avec un appareil de Mickler. Puis la suspension bactérienne est centrifugée après dépôt des billes 15 minutes à 10 000 t/min dans des tubes en polycarbonate de 50 mL (rotor 25.50 Beckman).

Le culot est constitué de mycolyl-arabinogalactane-proteine-peptidoglycane, le surnageant contient les membranes plasmiques. Ces éléments peuvent être congelés à -20°C.

### Délipidation

Le culot est repris dans 6 mL de tampon phosphate, 10mM, pH 7,0. On ajoute 6 mL de SDS 8% bouillant et on fait bouillir 30 minutes en agitant avec un aimant magnétique. On laisse ensuite 12 h à température ambiante.

Pour éliminer le SDS, 3 lavages à l'eau stérile sont réalisés, puis on ajoute de l'eau stérile et on centrifuge 20 minutes à 20 000t/min à 20°C (rotor JA 25.50 Beckman). Le surnageant est jeté et le culot est repris dans de l'eau stérile. Le processus est fait trois fois.

### Purification enzymatique (coupure des liaisons peptidiques internes)

Le dernier culot est repris dans 1 mL de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7.4. A ce mélange on ajoute 20 µL de pronase à 10 mg/mL (Boehringer Mannheim). Le tout est laissé à incuber 12h à 37°C.

Trois lavages sont réalisés avec une ultracentrifugeuse Beckman dans un tube de 7 mL en polycarbonate à 40 000t/min 40 minutes à 4°C (rotor MLA 55).

Le culot est repris dans 1 mL de tampon Phosphate, 20mM, pH 7,8 et on ajoute 20µL de trypsine à 10mg/mL (Sigma T8253) pour une incubation de 12 h à 37°C.

A nouveau on lave comme vu précédemment.

Coupure des liaisons peptidiques : hydrolyse des polysaccharides de la paroi bactérienne

On reprend le culot dans 25µL de muraminidase à 10mg/mL (mutanolysine Sigma M9901), 20 µL de lysozyme à mg/mL (Sigma L6876), 100µL de tampon phosphate, 250 mM, pH 6.5, 1µL de MgCl<sub>2</sub>, 100mM, et 850µl d'eau stérile. Et on incube 12 h à 37°C. On chauffe ensuite pendant 3 minutes à 100°C pour inactiver les enzymes. Enfin on ultracentrifuge 90 minutes à 40 000t/min et à 4°C dans un tube polycarbonate de 3 mL (rotor TLA 110).

Le peptidoglycane est le surnageant.

Elimination des sucres et réduction

Une meilleure identification par spectrométrie de masse des structures composant le peptidoglycane est obtenue en éliminant les dissaccharides MurNac GlcNac. On génère ainsi des lactoyl peptides.

On mélange le surnageant avec un volume égal de tampon borate (0.5 M, pH 9). La réduction se fait à température ambiante en ajoutant du borohydrure de sodium pendant 15 minutes. On ajoute de l'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> afin de neutraliser l'excès de borohydrure jusqu'à obtenir un pH de 4.

HPLC

Les disaccharides-peptides réduits (200 µl) ou les lactoyl-peptides (200 µl) ont été séparés par chromatographie en phase liquide haute performance ou HPLC (reversed-phase high pressure liquid chromatography) sur une colonne C<sub>18</sub> (3 µm, 4.6 × 250 mm; Interchrom, Montluçon, France) avec un débit de 0.5 mL/min avec un gradient de 0 à 20 % entre 10 et 90 minutes. Les 2 solvants utilisés ont été : Solvant A 0,05% acide trifluorique dilué de l'eau distillée ; Solvant B 0,035% acide trifluorique dilué dans de l'acétonitrile. (**figure 50**)

La détection s'est fait dans les UV à 210 nm. L'intégration de la courbe obtenue permet de déterminer l'abondance relative entre les différents composés. Les fractions obtenues ont été congelées à -20°C pour analyse ultérieure au spectromètre de masse.



### Spectrométrie de masse

Les données de spectrométrie de masse ont été collectées avec un spectromètre de masse en mode positif (Qstar Pulsar I, Applied Biosystems, Courtabœuf, France). Les fractions recueillies, lyophilisées diluées dans 100  $\mu$ l d'eau miliQ, sont injectées au moyen d'une pompe HPLC dans le spectromètre de masse avec un débit de 0.2ml/min. Les données sont acquises avec une tension de 5200 V, avec un potentiel de 20 V. L'identification des muopeptides repose sur une table donnant les masses probables des différents composés.

#### i) Sélection de mutants résistants au ceftiofur

A partir des souches V1 et H, une culture dans 5 mL de milieu BHI pendant 24h est réalisée à 37°C avec agitation. La culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le culot est remis en suspension dans 5 mL de milieu BHI additionné de ceftiofur. La culture est mise 24 h en incubation. 100  $\mu$ L de cette culture sont mis en culture sur 3 géloses additionnées de ceftiofur et 1 gélose BH sans antibiotique. La première étape est de récupérer et de congeler à -20°C 3 souches parmi celles qui ont poussé. Les étapes suivantes se feront toujours en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. La gamme d'antibiotiques allait de  $\frac{1}{4}$  de la CMI de la souche à 4096 mg/L.