

## Troisième partie : étude expérimentale portant sur la structure du peptidoglycane et considérations sur l'efficacité du ceftiofur notamment en modèle intracellulaire chez *Rhodococcus equi*

**Tous les protocoles expérimentaux se situent dans la partie Matériels et Méthodes de ce document.**

Les objectifs de mon travail de thèse sont doubles : déterminer si parmi la famille des bêta-lactamines, des molécules représentent de bons candidats thérapeutiques dans le traitement de la rhodococcose équine et déterminer la structure du peptidoglycane de *Rhodococcus equi*, ce qui n'avait jamais encore été fait. Ce travail a nécessité plusieurs étapes réalisées dans différents laboratoires.

Les bêta-lactamines ont deux modalités d'action qui permettent la bactéricidie : un effet direct par inhibition de la polymérisation du peptidoglycane (action sur les PLP) et parfois un effet indirect par activation des cellules immunitaires notamment les polynucléaires ou les macrophages (activation de la NADPH oxydase, synergie avec les mécanismes bactéricides).

Les travaux préliminaires permettant de mieux connaître le comportement des souches utilisées, l'extraction du peptidoglycane de ces souches et la finalisation de la réalisation des mutants ont été réalisés dans le laboratoire du Dr Arthur (unité INSERM UMR S 872) sous la supervision du Pr Mainardi. Le travail intracellulaire a été réalisé au sein du laboratoire de l'Université catholique de Louvain (UCL) du Pr Tulkens sous la supervision du Dr Lemaire. Les premières étapes de la réalisation des mutants ont été réalisées auprès du Pr Boulouis au sein du laboratoire d'analyses bactériologiques de l'ENVA (LCAAST).

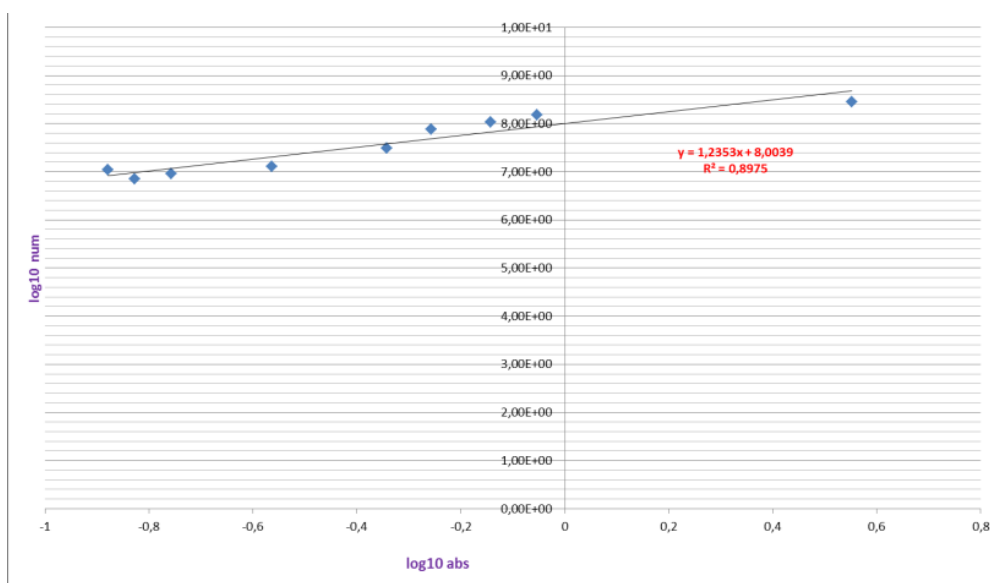
20 souches différentes de *R. equi* ont été utilisées dans cette étude : 17 souches d'origine équine collectées et fournies gracieusement par le laboratoire de bactériologie du laboratoire Vétérinaire, 1 souche hospitalière humaine (H) isolée chez un patient de l'hôpital Georges Pompidou (Pr Mainardi et 2 souches de référence ATCC 33701 avec ou sans plasmide de virulence fournies gracieusement par le Pr Leclercq (CHU Caen).

### III.1) Travaux préliminaires : mieux connaître *Rhodococcus equi* et sélectionner les souches de l'étude

#### a) Courbe de croissance et corrélation absorbance numération

L'estimation de la taille de la population bactérienne en fonction de l'absorbance à 450 nm de la culture dans un milieu BHI a permis de déterminer les durées de croissance nécessaires aux expériences ultérieures. Le temps de doublement à 37°C sur BHI est de 180 min, ce qui est relativement rapide. **(figure 28)**

Figure 28 : Corrélation entre Absorption et croissance pour la souche hospitalière à 650 nm



#### b) Sensibilité *in vitro* aux antibiotiques : antibiogrammes et CMI

Les profils généraux de sensibilité des souches H, et ATCC 33701 ont été réalisés par la méthode du E-test® (**Figure 29**), et la méthode des disques (**Tableaux 12 et 13**)

Figure 29 : Détermination de la CMI par la technique des E-test® sur milieu MH (souche H)

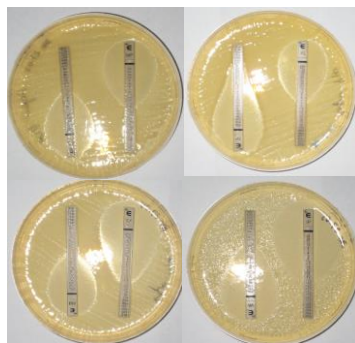


Tableau 12 : Sensibilités sur gélose MH par les méthodes des disques et E-test® et concentration minimale inhibitrice (CMI en mg/L) de la souche hospitalière et des souches de référence ATCC 33701

	Souche clinique	ATCC33701 sans plasmide de virulence	ATCC 33701 avec plasmide de virulence		Souche clinique	ATCC33701 sans plasmide de virulence	ATCC33701 avec plasmide de virulence
	HEGP				HEGP		
AMX (E-test)	CMI 4			ATM			
AMC (E-test)	CMI 4			IMI (E-test)	CMI 0.125		
AM (E-test)	CMI 4			Méropénème	CMI 0.38		
PIP				VA (E-test)	CMI 0.75		
FOX				TEC (E-test)	CMI 0.125		
CRO (E-test)	CMI 1			RA			
CTX				GM			
CXM				K			
CF				E			
CEFALEXINE				CIP			
CAZ				MARBO			
				C			

**Abréviations disques:**  
 AM Ampicilline  
 AMC Amoxicilline + Acide clavulanique  
 AMX Amoxicilline  
 C Chloramphénicol  
 CF Céfalothine  
 CRO Ceftriaxone  
 CTX Céfotaxime  
 CXM Céfuroxime  
 FOX Céfoxitine  
 GM Gentamicine  
 IMI Imipénème  
 VA Vancomycine  
 MARBO Marbofloxacin  
 E Erythromycine  
 TE Teicoplanine  
 CIP Ciprofloxacine  
 RA Rifampicine  
 ATM Aztréonam  
 PIP pipéracilline  
 K kanamycine

**Légende :** Rouge pour résistant ; Jaune pour intermédiaire ; Vert pour sensible ; Blanc pour non testé

Pour l'interprétation des diamètres d'inhibition et des CMI les recommandations des experts de la société française de microbiologie ont été utilisées. (Voir annexes)

Les souches de *R. equi* testées sont sensibles à de nombreux antibiotiques de familles différentes (fluoroquinolone, bêta-lactamines, glycopeptides, aminosides, ansamycine).

Au cours de cette expérience il a été possible d'observer des phénomènes d'interaction, antagonisme ou synergie *in vitro* sur milieu gélosé, notamment entre la céfalotine ou la céfalexine (céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération) et l'imipénème vis-à-vis de *R. equi* (**figure 30**), ce qui avait déjà été remarqué par Nordmann *et al.*, 1993. Ces observations sont résumées dans le **tableau 13**.

Figure 30 : Antagonisme sur gélose (à gauche photographie personnelle, à droite Nordmann *et al.*, 1993)

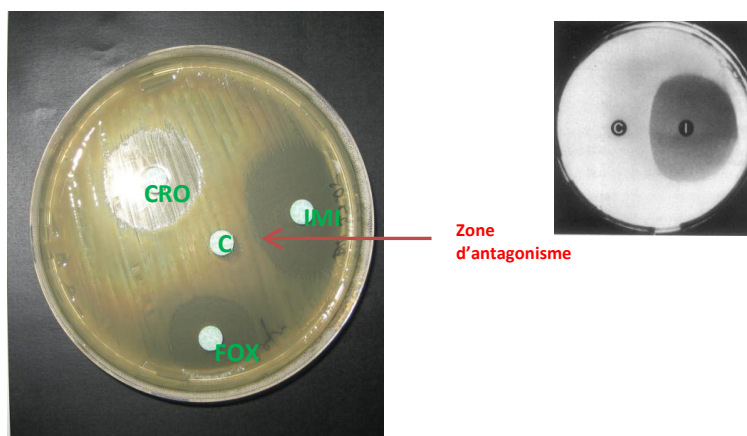


Tableau 13 : Interactions entre bêta-lactamines en milieu gélosé pour la souche H

	AM C	CF	Cefal	FOX	CAZ	CRO	CTX	IPM	TEC	VA
AMC	I	NT	NT	-	NT	-	φ	-	NT	NT
CF		R	NT	-	NT	φ ?	NT	-	NT	NT
Cefalexine			R	-	ND	-	φ	-	φ	NT
FOX				S	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CAZ					R	NT	NT	NT	NT	NT
CRO						S	NT	NT	NT	NT
CTX							R	NT	NT	NT
IPM								S	+	+
TEC									S	NT
VA										S

**Abréviations disques:**  
 AM Ampicilline  
 AMC Amoxicilline + Acide clavulanique  
 AMX Amoxicilline  
 C Chloramphénicol  
 CF Céfalothine  
 CRO Ceftriaxone  
 CTX Céfotaxime  
 CXM Céfuroxime  
 FOX Céfoxitine  
 GM Gentamicine  
 IMI Imipénème  
 K Kanamycine  
 VA Vancomycine  
 MARBO Marbofloxacine  
 E Erythromycine  
 TE Teicoplanine  
 CIP Ciprofloxacine  
 RA Rifampicine  
 ATM Aztréonam  
 PIP pipéracilline

**Légende :** En rouge antagonisme ; en orange aucun effet visible avec la méthode (indifférence) ; en vert synergie

L'étape suivante a été de réaliser une étude des CMI en milieu gélosé de différents antibiotiques vis à vis de souches animales et humaines (**tableau 14**).

Tableau 14 : CMI (mg/L) de différents antibiotiques pour différentes souches animales et humaines de *R. equi* en milieu gélosé MH

Souches	AM	VA	Ceftiofur	Cefquinome	IMI	Céfalexine	Marbo
1	4	0,5	0,25	0,5	0,5	64	2
2	2	0,5	0,5	4	1	64	1
3	16	0,5	0,5	16	0,5	>512	4
4	16	1	0,5	16	1	>512	1
5	16	0,5	0,5	>16	1	>512	2
6	16	0,5	4	>16	0,5	>512	1
7	2	0,5	0,5	0,25	1	64	0,5
9	2	0,5	0,5	0,5	0,5	64	1
10	16	0,5	0,5	16	2	>512	2
12	16	0,5	4	>16	1	>512	2
14	16	1	4	>16	0,5	>512	1
15	16	0,5	4	>16	0,5	>512	1
16	16	0,5	1	>16	0,5	>512	1
17	16	0,5	4	>16	1	>512	1
18	16	0,5	4	>16	1	>512	2
19	2	0,5	0,25	1	2	64	1
20	2	2	4	4	2	64	1
H	16	0,5	4	>16	0,5	>512	NDEF
P+	16	1	4	>16	0,25	>512	NDEF
P-	NDEF	NDEF	4	>16	0,25	512	NDEF
E	2	2	>16	8	>4	256	NDEF

Souche H souche hospitalière humaine fournie par le Pr Mainardi ; souche E souche d'*enterococcus faecium* de référence souche Souche P+ souche ATCC33701 avec plasmide de virulence ; souche P- souche ATCC 33701 sans plasmide de virulence ; souches 1 à 20 souches vétérinaires cliniques fournies par Vétquinol AM pour ampicilline VA pour vancomycine IMI pour imipénème Marbo pour Marbofloxacin.

Les résultats présentés dans le **tableau 14** révèlent la présence de 2 types de populations au sein des souches animales : celles qui sont sensibles à la majorité des bêta-lactamines (1 ; 2 ; 7 ; 9 ; 19 ; 20) et celles qui sont résistantes à certaines bêta-lactamines.

Toutes les souches sont résistantes à la céfalexine. Une seule souche est sensible à la marbofloxacin (CMI<1 mg/L valeur seuil). Toutes les souches sont sensibles à l'imipénème (CMI< 2 mg/L).

Sur les 20 souches testées, aucune souche n'est résistante au ceftiofur (CMI <4 mg/L), 10 sont intermédiaires et 10 sont sensibles (CMI<2mg/L valeur seuil ou « breakpoint »). Ces résultats font du ceftiofur, un bon candidat parmi les bêta-lactamines autorisées à l'utilisation vétérinaire, contrairement au cefquinome pourtant plus intéressant du point de vue de la

facilité d'emploi ou aux carbapénèmes, trop précieux en médecine humaine pour les experts européens pour le traitement de la rhodococcose équine.

Il faut cependant noter que le ceftiofur doit être actif dans une gamme de concentrations compatibles avec les données pharmacocinétiques sur les formes intracellulaires, intramacrophagiques, et donc dans la gamme de pH acide phagolysosomal. Afin d'aborder ce problème la souche 1 (V) et la souche H ont été sélectionnées pour l'étude à l'UCL (Université catholique de Louvain).

Les CMI ont été déterminées sur microplaque à différent pH (**Tableau 15**).

Tableau 15 : CMI sur microplaque et à pH différents des souches V H P+ et P-

	H pH=7	H pH=5,5	V pH=7	V pH=5,5	P+ pH=7	P+ pH=5,5	P- pH=7	P- pH=5,5
Erythromycine	0,16	4	0,08	4	0,16	4	0,16	4
Azithromycine	0,63	64	0,31	64	0,31	64	0,63	64
Gentamicine	1	8	0,63	8	0,63	8	1	8
Oxytétracycline	4	2	8	4	8	2	8	2
Marbofloxacin	1	4	1,25	2	0,31	0,62	0,31	2
Vancomycine	0,31	0,5	0,31	0,16	0,31	0,31	0,31	0,31
Rifampicine	0,16	0,25	0,16	0,25	0,08	0,25	0,16	0,25
Pénicilline G	8	4	1	1	32	16	32	16
Amoxicilline	8	4	1	1	16	2,5	8	2,5
Ampicilline	16	8	1,25	1	32	8	16	8
Céphalexine	>256	>256	32	128	>256	>256	>256	>256
Ceftazidime	>256	64	64	32	>256	64	>256	64
Céfoxitine	2	4	2,5	8	2,5	2	8	2
Ceftriaxone	1	0,5	0,63	0,31	2,5	0,31	2	0,31
Ceftiofur	128	4	0,63	0,5	256	4	64	4
Imipénème	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16

Souche H souche hospitalière ; Souche V souche vétérinaire choisie ; Souche P+ souche ATCC 33701 avec plasmide de virulence ; Souche P- souche ATCC 33701 sans plasmide de virulence

Ces résultats confirment nos résultats sur gélose, à savoir les sensibilités contrastées des souches de *R. equi* aux bêta-lactamines, et illustrent surtout l'effet important du pH sur l'activité des antibiotiques, notamment pour certaines bêta-lactamines comme le ceftiofur plus actives à pH acide et les macrolides inactivés en pH acide. Les quelques différences observées par rapport aux résultats sur gélose sont dues vraisemblablement à la taille de l'inoculum et à un défaut de contrôle strict du pH des gélouses.

La présence du plasmide de virulence ne semble pas affecter la sensibilité aux bêta-lactamines.

### III.2) Etude de l'efficacité du ceftiofur *in cellulo* : construction d'un modèle intracellulaire

Dans un premier temps la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et d'antibiogrammes sur une collection de 20 souches de *R. equi* a permis le choix pour l'étude intracellulaire de deux antibiotiques d'usage exclusivement vétérinaire, une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération, le ceftiofur, et une fluoroquinolone, la marbofloxacin, qui servira de témoin de bactéricidie, sur une souche animale sensible au ceftiofur (CMI=0.25µg/mL) et une souche humaine résistante au ceftiofur (CMI>16µg/mL). Elles seront appelées respectivement dans la suite de ce document V et H. La comparaison avec une souche de référence, ATCC 33701 avec et sans plasmide de virulence n'a pu être traitée qu'en partie.

Le travail au sein du laboratoire de l'UCL repose sur la mise en place du modèle d'infection intracellulaire. La référence dans ce domaine ont été les travaux de l'équipe du Pr Tulkens, et en particulier du Dr Lemaire sur les SARM (Lemaire *et al.*, 2005; Barcia-Macay *et al.*, 2006)

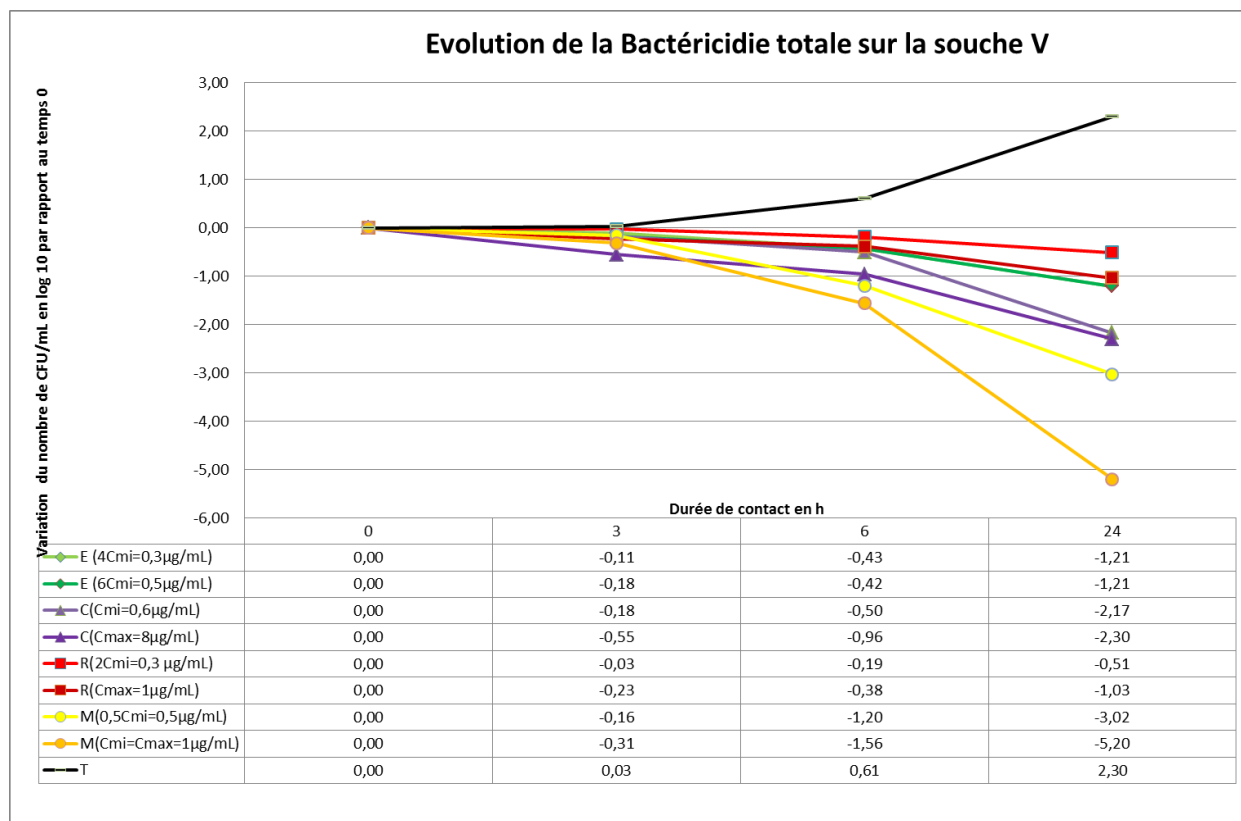
#### a) Bactéricidie totale

Cette étape vise à préciser l'activité directe des antibiotiques sur les souches testées.

Cette technique permet de mesurer la survie bactérienne après différents temps de contact et en présence de différentes concentrations antibiotiques. Le comportement des 4 antibiotiques majeurs intervenant dans le traitement de la rhodococcose a été examiné : le ceftiofur, la marbofloxacin, la rifampicine (bactéricides) et l'érythromycine (bactériostatique) ont été testés seuls, à leur CMI et à leur CMax (valeur pharmacocinétique donnant la concentration plasmatique maximale aux posologies usuelles administrée par voie intraveineuse) pour les trois premières, et à 4 et 6 fois la CMI pour l'érythromycine, afin d'objectiver un éventuel effet bactéricide mais en restant dans les domaines des concentrations atteignables dans l'organisme.

La CMI du ceftiofur chez les souches H et ATCC 33701 étant supérieure à leur CMax (8 µg/mL), seule la souche V a été testée. L'expérimentation a été faite à pH=7.

Figure 31 : Évaluation de la bactéricidie totale sur la souche V au cours du Temps



E : Erythromycine C : Ceftiofur R : Rifampicine M : Marbofloxacin. Le témoin T est un témoin de croissance sans antibiotique. Les valeurs sont exprimées en logarithme décimal. CFU (Colony forming unit). Les résultats présentés sont issus d'une expérience représentative de 2

Ces résultats suggèrent une action temps-dépendante du ceftiofur (même comportement bactéricide pour les différentes concentrations) et concentration-dépendante pour la marbofloxacin. Une gamme de concentrations plus importante devrait être étudiée pour valider ces hypothèses.

L'effet bactéricide du ceftiofur à son CMax semble supérieur à ceux de la rifampicine et de l'érythromycine. Il reste à confirmer ces résultats et à étudier son effet sur les formes intracellulaires.



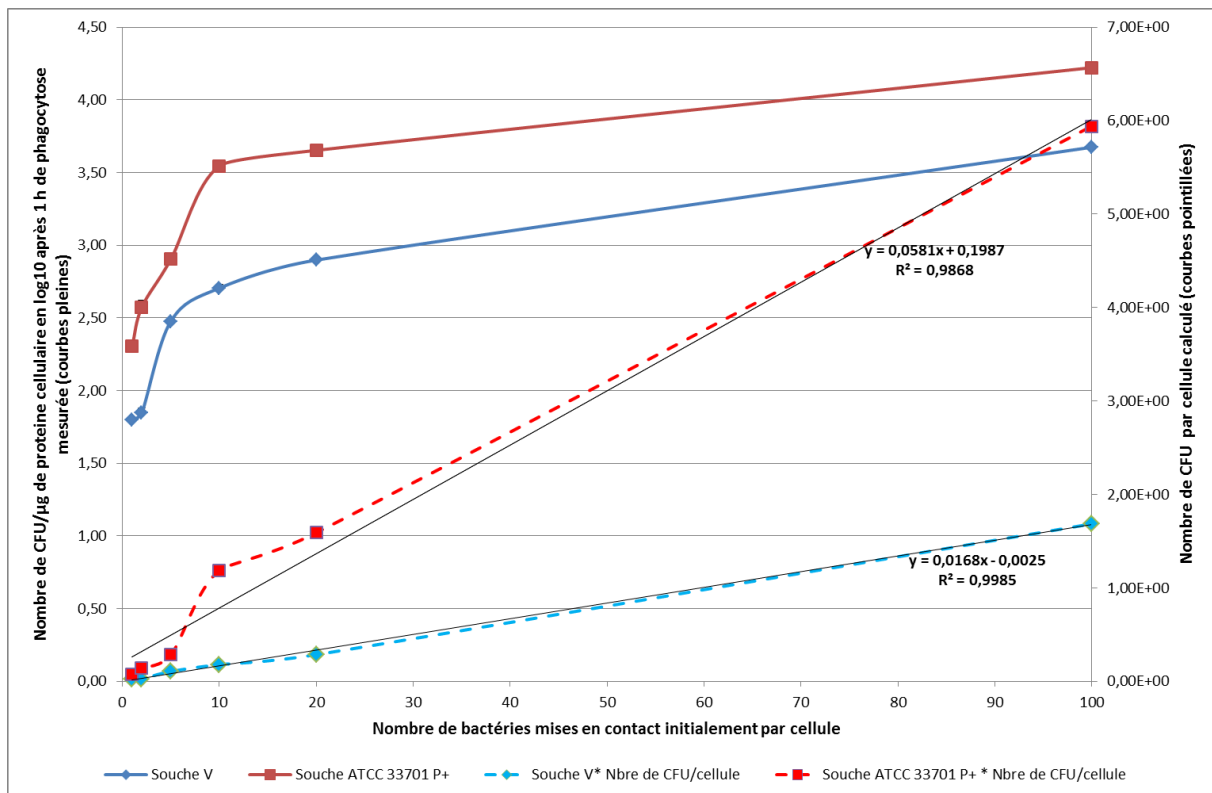
## b) Phagocytose en modèle cellulaire THP1

Cette technique a pour but de reproduire un modèle d'infection intracellulaire. Il est nécessaire de déterminer la quantité de bactéries à mettre en contact avec les cellules dans l'épreuve de bactéricidie intracellulaire.

Plusieurs modèles cellulaires sont possibles en fonction des techniques usuelles du laboratoire, et des bactéries : polynucléaires neutrophiles, fibroblastes, macrophages animaux ou humains, notamment une lignée humaine de leucémie monocyttaire aiguë (Tsuchiya *et al.*, 1980), prolifique, peu exigeante et avec un pouvoir bactéricide résiduel faible, les macrophages THP1. Ce modèle a été choisi principalement parce que *R. equi* cible les macrophages et que le pouvoir bactéricide faible des THP1 permet de mettre en évidence l'action antibiotique seule.

Afin d'avoir des résultats comparables entre les différentes expériences, on utilise comme référence la quantité de protéines cellulaires en  $\mu\text{g}$ , ce qui permet de ne pas tenir compte des pertes éventuelles de cellules au cours des différents lavages. La quantité de protéine a été mesurée pour les témoins réalisés sans bactérie. La moyenne des quantités de protéine sur les 3 expériences a été rapportée au nombre de cellule initiale soit 500 000 cellules. Le nombre de bactéries phagocytées est ainsi calculé. (**figure 32**)

Figure 32 : Phagocytose des souches V et ATCC 33701 avec le plasmide de virulence par les Macrophages THP1



Moyenne de 3 expériences (écart-types <0.05 non visibles sur le graphique) En pointillé nombre de CFU par cellule après 1 h de mise en contact en fonction du nombre de bactéries par cellule, mis en contact initialement

Ces résultats montrent une différence significative ( $p < 0,0002$  test de Student par paire) de comportement entre la souche V et la souche de référence avec le plasmide de virulence. La souche avec le plasmide de virulence est phagocytée en plus grand nombre que la souche V. Une étude comparative entre les souches P+ et P- ne montre aucune différence (résultats non montrés dans ce document). On peut envisager l'existence d'un facteur chromosomique pour expliquer cette différence, ce qui interdit une généralisation hâtive des résultats obtenus sur une seule souche (même si c'est une souche de référence), à l'ensemble des souches de *R. equi*.

Le travail de bactéricidie intracellulaire requiert 500 000 cellules/mL, et pour des raisons pratiques de n'avoir que  $10^3/10^4$  CFU/mL au final. Grâce au travail de phagocytose, nous avons pu déterminer l'inoculum initial soit 10 bactéries/cellule.