



Université Catholique de Louvain
Ecole des Sciences Biomédicales
Unité de Pharmacologie cellulaire et moléculaire

**Etude de l'activité de l'ertapénème vis-à-vis des
infections bactériennes à *Listeria monocytogenes* et
*Staphylococcus aureus***

Mémoire présenté par Sandrine Lemaire pour l'obtention du titre de
Licencié en Sciences Biomédicales (Orientation Sciences Biomédicales
Expérimentales)

Promoteur : Prof. P.M. Tulkens
Co-Promoteur : Prof. F. Van Bambeke

Année académique 2003-2004

Ce travail n'aurait jamais pu être mené à son terme sans la participation de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Tulkens, mon promoteur, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir soutenu tout au long de ce mémoire.

Je remercie également le Professeur Marie-Paule Mingeot – Leclercq et le Professeur Françoise Van Bambeke pour leur disponibilité, leur soutien et l'encadrement continu de ce mémoire.

Je tiens également à remercier Nancy Aguilera, Chantal Dax et Sébastien Van de Velde pour leur précieux conseils, ainsi que tous les membres de l'unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, pour leur accueil et leur soutien inconditionnel (Anne, Dorian, Emilie, Evelina, Francine, Gauthier, Hélène, Hugues, Léna, Marie-Claire, Marianne, Marie, Martial, Nancy, Narcissa, Nathalie, Nuno, Olga, Stéphane, Violetta).

Je tiens également à associer les membres de l'unité CELL de m'avoir accueillie dans leur laboratoire pour les études de morphologie cellulaire et je remercie particulièrement le Professeur Pierre Courtoy d'avoir mis le matériel de son unité à ma disposition.

Mes remerciements et ma reconnaissance s'adressent également à mes parents, pour leur appui et leur présence lors des moments difficiles.

Sandrine Lemaire

Résumés

L'éradication des infections intracellulaires bactériennes constitue un véritable défi thérapeutique, par (i) le caractère récurrent de ces infections, (ii) l'inaccessibilité des bactéries vis-à-vis des défenses immunitaires humorales et finalement, (iii) la nécessité d'utiliser des antibiotiques capables de s'accumuler dans le compartiment subcellulaire infecté. *L. monocytogenes* et *S. aureus* sont des bactéries capables de se multiplier dans des compartiments subcellulaires distincts, à savoir le cytosol (*L. monocytogenes*) et les phagolysosomes (*S. aureus*). Le traitement actuel de ces infections consiste en l'administration d'une β -lactame (ampicilline, méropénème) en association avec un aminoglycoside. Une difficulté liée à l'usage des β -lactames réside, cependant, dans leur courte demi-vie, qui impose des administrations répétées.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'activité de l'ertapénème dans les modèles d'infections intracellulaires à *L. monocytogenes* et *S. aureus* (macrophages humains THP-1). Cette molécule présente l'avantage d'une demi-vie prolongée, permettant d'obtenir une exposition adéquate chez le patient au moyen d'une administration unique quotidienne.

Dans une première étape, nous avons caractérisé l'activité intrinsèque (CMI, CMB) et les propriétés pharmacodynamiques de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes* et *S. aureus* en bouillon, en comparaison avec le méropénème et l'ampicilline. Les trois antibiotiques montrent une activité bactériostatique vis-à-vis de *L. monocytogenes* et une activité bactéricide temps- et concentration-dépendante vis-à-vis de *S. aureus*. Dans une seconde étape, nous avons comparé l'activité intracellulaire de ces antibiotiques dans un modèle de macrophages humains THP-1. Vis-à-vis de *L. monocytogenes*, l'ertapénème se montre incapable d'empêcher la croissance intracellulaire, alors que l'ampicilline et le méropénème présentent une activité bactéricide se développant au cours du temps. Par contre, vis-à-vis de *S. aureus*, les trois antibiotiques démontrent une activité bactéricide temps- et concentration-dépendante du même ordre de grandeur. En microscopie électronique, les cellules traitées à l'ertapénème et infectées par *L. monocytogenes* montrent une croissance bactérienne active, alors que celles infectées par *S. aureus* montrent de nombreuses bactéries dont la structure est altérée.

Pour expliquer la divergence d'activité de l'ertapénème dans ces deux modèles, nous avons étudié (i) la concentration cellulaire d'ertapénème dans les macrophages, (ii) sa stabilité et (iii) sa capacité de liaison aux protéines sériques dans les conditions expérimentales. Les résultats montrent que l'ertapénème atteint dans les cellules une concentration cellulaire excédant la CMI de *L. monocytogenes*. Les études de stabilité montrent que la dégradation d'ertapénème est inférieure à celle du méropénème. Finalement, la réduction de la concentration de sérum dans le milieu de culture cellulaire (de 10% à 2%, pour accroître la fraction libre d'ertapénème) n'améliore pas significativement l'activité intracellulaire de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes*. Aucun de ces paramètres ne semblent donc responsable du manque d'activité de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes* intracellulaire.

The eradication of bacterial intracellular infections remains a real therapeutic challenge, because of (i) the recurrent character of these infections, (ii) the incapacity for humoral immune defences to gain access to intracellular bacteria and (iii) the necessity to use antibiotics able to accumulate in the infected compartment.

L. monocytogenes and *S. aureus* are able to multiply in distinct subcellular compartments, namely the cytosol (*L. monocytogenes*) and phagolysosomes (*S. aureus*). The current treatment for these infections consists in the administration of a beta-lactam (ampicillin, penem) in association with an aminoglycoside. However, due to their short half-life, beta-lactams need to be administered several times per day, which makes their use uneasy in the clinics.

In this work, we have studied the activity of ertapenem in models of intracellular infection by *L. monocytogenes* and *S. aureus* using THP-1 human macrophages. This molecule is characterized by a prolonged half-life as compared to most beta-lactams. Accordingly, it can be administered once-daily only, with sustained therapeutic serum levels can be obtained by a once daily administration.

In a first step, we have characterized the intrinsic activity (MIC, MBC) and the pharmacodynamic properties of ertapenem in broth, in comparison with that of ampicillin and meropenem. The three drugs showed a bacteriostatic activity against *L. monocytogenes* and a time- and concentration-dependent bactericidal activity against *S. aureus*. In a second step, we have compared the intracellular activity of these antibiotics. Ertapenem was unable to prevent the intracellular growth of *L. monocytogenes* while ampicillin and meropenem displayed a time-dependent bactericidal effect. In contrast, the three antibiotics proved equally active against intracellular *S. aureus*, with a bactericidal effect developing on a time- and concentration-dependent manner. In electron microscopy, intracellular *L. monocytogenes* actively multiplied in cells exposed to ertapenem, while the morphology of intracellular *S. aureus* was markedly affected.

To try to explain the contrasting effects of ertapenem in these two models, we have then studied (i) the cellular concentration of ertapenem, (ii) its stability, and (iii) its binding to serum proteins. None of these studies allowed us to provide a satisfactory explanation, since (i) ertapenem reached a cellular concentration above the MIC of *L. monocytogenes*, (ii) the stability of ertapenem was higher than that of meropenem, and (iii) ertapenem activity was not improved by a reduction of the percentage of serum in the culture fluid (10% to 2% so as to increase the free fraction).

Table des matières

<u>Remerciements</u>	2
<u>Résumés</u>	3
<u>Table des matières</u>	6
<u>Liste des abréviations</u>	11
<u>Introduction</u>	14
I. <u>Les phagocytes et l'infection bactérienne intracellulaire</u>	16
1. <u>Les phagocytes</u>	16
2. <u>Les bactéries intracellulaires</u>	17
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	18
2.1.1. Caractéristiques microbiologiques	18
2.1.2. Physiopathologie des infections à <i>L. monocytogenes</i>	19
2.1.3. Cycle intracellulaire de <i>L. monocytogenes</i>	20
2.1.3.1. Internalisation	21
2.1.3.2. Prolifération intracellulaire	21
2.1.3.3. Transmission intercellulaire	21
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.2.1. Caractéristiques microbiologiques	21
2.2.2. Physiopathologie des infections à <i>S. aureus</i>	22
2.2.3. Cycle intracellulaire de <i>S. aureus</i>	23
II. <u>Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des antibiotiques intracellulaires</u>	25
1. <u>Généralités</u>	26
2. <u>Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de l'antibiothérapie intracellulaire</u>	26
2.1. Propriétés pharmacocinétiques	26
2.2. Propriétés pharmacodynamiques	27
III. <u>Les β-lactames dans le traitement des infections intracellulaires</u>	29
1. <u>Généralités</u>	29

2.	<u>Distribution intracellulaire des β-lactames</u>	29
3.	<u>Activité intracellulaire des β-lactames en relation avec leur capture cellulaire</u>	30
IV.	<u>L'ertapénème</u>	31
1.	<u>Généralités</u>	31
2.	<u>L'ertapénème</u>	32
2.1.	Structure chimique	32
2.2.	Mécanisme d'action et spectre anti-bactérien	32
2.3.	Propriétés pharmacocinétiques	32
	2.3.1. Distribution	32
	2.3.2. Elimination	33
2.4.	Indications	33
2.5.	Effets indésirables	33
2.6.	Contre-indications	33
	<u>Objectif du mémoire</u>	34
	<u>Matériel et méthodes</u>	36
1.	<u>Matériel</u>	37
1.1.	Souches bactériennes, conservation et culture	37
1.2.	Cellules	37
1.3.	Antibiotiques	38
2.	<u>Méthodes</u>	38
2.1.	Dosages	38
	2.1.1. Dosage de protéines	38
	2.1.2. Dosage de l'ertapénème et du méropénème	38
	2.1.2.1. Dosage microbiologique	39
	2.1.2.2. Dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)	39
	2.1.3. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)	39
2.2.	Dénombrement des bactéries	40
2.3.	Détermination de l'activité intrinsèque de β -lactames : CMI et CMB	40
2.4.	Cinétique d'activité en bouillon : courbes de bactéricidie	40

2.5.	Détermination de l'activité intracellulaire d'antibiotiques	40
2.5.1.	Infection intracellulaire de macrophages THP-1 par <i>L. monocytogenes</i>	40
2.5.2.	Infection intracellulaire de macrophages THP-1 par <i>S. aureus</i>	41
2.6.	Etude de la morphologie bactérienne	42
2.6.1.	Microscopie optique	42
2.6.2.	Microscopie électronique à transmission	42
2.7.	Etude de stabilité	43
2.8.	Mesure de l'accumulation cellulaire des carbapénèmes	44
2.9.	Mesure de la fraction libre de l'ertapénème et du méropénème aux protéines sériques du milieu de culture cellulaire	44
2.10.	Tests statistiques	45

Résultats 46

1.	<u>Activité intrinsèque de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème vis-à-vis de <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. aureus</i> : détermination de la CMI et CMB</u>	47
2.	<u>Activité de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème vis-à-vis de <i>L. monocytogenes</i></u>	50
2.1.	<u>Activité en bouillon</u>	50
2.1.1.	Influence du temps sur l'activité des β -lactames	50
2.1.2.	Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames	51
2.2.	<u>Activité dans un modèle cellulaire (macrophages THP-1)</u>	53
2.2.1.	Influence du temps sur l'activité des β -lactames	53
2.2.2.	Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames	54
2.3.	<u>Morphologie bactérienne</u>	55
2.3.1.	Macrophages infectés par <i>L. monocytogenes</i>	56
2.3.2.	Macrophages infectés par <i>L. monocytogenes</i> et traités à l'ertapénème	57
3.	<u>Activité de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème vis-à-vis de <i>S. aureus</i></u>	58
3.1.	<u>Activité en bouillon</u>	58
3.1.1.	Influence du temps sur l'activité des β -lactames	58
3.1.2.	Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames	59

3.1.3.	Influence du pH phagolysosomal sur l'activité des β -lactames	59
3.2.	<u>Activité dans un modèle cellulaire (macrophages THP-1)</u>	62
3.2.1.	Influence du temps sur l'activité des β -lactames	62
3.2.2.	Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames	63
3.3.	<u>Morphologie bactérienne</u>	64
4.	<u>Etudes mécanistiques visant à expliquer les divergences d'activités de l'ertapénème vis-à-vis de deux modèles d'infections bactériennes distinctes</u>	66
4.1.	<u>La concentration cellulaire d'antibiotique excède-t-elle la CMI ?</u>	67
4.2.	<u>Les β-lactames sont-elles instables ?</u>	67
4.2.1.	Etude de la stabilité en solution aqueuse	67
4.2.1.1.	Stabilité dans l'eau millipore-Q	67
4.2.1.2.	Stabilité dans le milieu RPMI \pm 10 % de sérum foetal	67
4.2.1.3.	Stabilité dans le tampon PBS \pm 10 % de sérum foetal	68
4.2.1.4.	Influence du pH phagolysosomal sur la stabilité	69
4.2.2.	<u>Les produits de dégradation jouent-ils un rôle dans l'activité vis-à-vis de <i>L. monocytogenes</i> ou <i>S. aureus</i> ?</u>	
4.3.	La liaison de l'antibiotique exerce-t-elle une influence sur l'activité ?	
4.3.1.	Détermination de la fraction libre d'ertapénème et de méropénème	
4.3.2.	Influence du sérum sur l'activité intracellulaire de l'ertapénème vis-à-vis de <i>L. monocytogenes</i>	
4.3.3.	Influence du sérum sur la capture cellulaire d'ertapénème	

Discussion et perspectives

Annexe

Bibliographie

Abréviations

AUC : Area Under Curve
ATCC : American Type Cell Culture
BSA : Bovine Serum Albumin
C : Cytosine
Cc : Concentration cellulaire
Ce : Concentration extracellulaire
CFU : Colony Forming Unit
CFU-G : CFU des granulocytes
CFU-M : CFU des monocytes
Cmax : Concentration Maximale Sérique
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
D-Ala : D-Alanine
De : extracellular Drug
DFCS : De complemented Foetal Calf Serum
DHP-1 : DeHydroPeptidase 1
Di : intracellular Drug
ESBL : Extended Spectrum β -Lactamase
Fc : Fragment Cristallisable de l'immunoglobuline
FcR : Fc Receptor
FCS: Foetal Calf Serum
G : Guanine
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
Ig : Immunoglobuline
IFN-gamma : Interféron-gamma
I.M. : Intra-Musculaire
I.V. : Intra-Veineuse
LDH : Lactate DesHydrogenase
LLO : Listériolysine O
Log. : Logarithme
MRSA : Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus*
P.M. : Poids Moléculaire
PBP : Penicillin Binding Protein
PBS : Phosphate Buffer Saline
PC : Pharmacocinétique
PD : Pharmacodynamie
Plc : Phospholipase C

PMN : PolyMorphoNucléaire
RNI : Reactive Nitrogen Intermediate
ROI : Reactive Oxygen Intermediate
SLO : StreptoLysine O
SNC : Système Nerveux Central
t ½ : temps de demi-vie
TSA : Tryptic Soy Agar
TSB : Tryptic Soy Broth
TSST-1 : Toxic Shock Syndrome Toxin
Vd : Volume de Distribution

Introduction

I. Les phagocytes et l'infection bactérienne intracellulaire

1. Les phagocytes

Les phagocytes professionnels sont de puissants effecteurs des réponses immunitaires cellulaires, que ce soit les réponses naturelles ou adaptatives (Silverstein, 1979). Ces cellules expriment des récepteurs membranaires spécifiques de structures antigéniques bactériennes, et la reconnaissance des germes s'opère par reconnaissance directe (récepteurs « scavengers,...) ou reconnaissance dépendante des opsonines (récepteur de la fraction Fc des immunoglobulines, récepteurs du complément, intégrines, ...) (Jones, 1999).

Les phagocytes professionnels regroupent deux types cellulaires, à savoir les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et les cellules mononuclées (monocytes sanguins, macrophages tissulaires et des cavités séreuses). Les PMN sont des cellules dérivant des myéloblastes et dont le développement a lieu dans la moelle osseuse. Ces cellules sont ensuite destinées à la circulation sanguine et finalement, aux tissus, où elles vivent 1 à 2 jours avant de devenir apoptotiques et d'être phagocytés par les macrophages résidents (Glasser et al, 1987). Le développement des monocytes, dérivant des monoblastes, s'accomplit de façon similaire dans la moelle osseuse. Ils atteignent ensuite la circulation sanguine et leur différenciation morphologique et structurelle en macrophages s'effectue au niveau tissulaire. La durée de vie des macrophages s'étend de quelques semaines à quelques années (Territo et Golde, 1982).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressés aux macrophages, dont les fonctions sont résumées dans le tableau I.1, car leur propension à ingérer et détruire des microorganismes pathogènes joue un rôle central dans la défense de l'hôte lors de l'infection bactérienne. Différentes étapes interviennent lors de ce processus, impliquant (i) l'adhérence du germe au phagocyte, (ii) la phagocytose et l'internalisation du germe dans une vacuole cytoplasmique (ou phagosome), (iii) sa destruction lors de la fusion phagolysosomiale, et finalement (iiii) le relargage de corps résiduels.

D'autres cellules se comportent occasionnellement comme des phagocytes (cellules épithéliales, fibroblastes, ...) mais elles ne disposent ni de récepteurs d'opsonines, ni de mécanismes bactéricides. Elles sont dès lors considérées comme des phagocytes non professionnels.

Tableau I.1. Fonctions du macrophage (d'après Auwerx, 1991)

Fonctions du macrophage	
Activité bactéricide/tumoricide	
Chimiotactisme	
Pinocytose	
Phagocytose de cellules sénescents ou endommagées	
Présentation d'antigènes aux lymphocytes	
Sécrétion de (d') :	
	- Cytokines
	- Prostaglandines
	- Composants du complément
	- Facteurs de coagulation
	- Enzymes
	- Protéines de la matrice extracellulaire
	- protéines de liaison
	- Lipides bio-actifs
	- Réactifs intermédiaires de l'oxygène, radicaux libres, NO
Explosion respiratoire (burst oxydatif)	

2. Les bactéries intracellulaires

Une des caractéristiques remarquables de *Listeria monocytogenes* et de *Staphylococcus aureus* est leur capacité de survie intracellulaire. Différentes voies peuvent être empruntées par les parasites intracellulaires pour échapper aux mécanismes de défense survenant après phagocytose et elles aboutissent à des localisations subcellulaires distinctes (tableau I.2.) (voir pour revue : Carryn et al, 2003). Dès lors, durant les différentes étapes du processus infectieux, les microorganismes sont à l'abri du système immunitaire (Mackaness, 1962).

L. monocytogenes est un parasite intracellulaire (à localisation cytosolique) responsable d'infections persistantes et sévères, essentiellement chez des patients immunodéprimés. Le taux de mortalité moyen de ces infections est de l'ordre de 20%, même lors d'antibiothérapie précoce, mais il peut atteindre jusqu'à 60% en cas de pathologies sous-jacentes du système nerveux central (Lorber, 1996). Le second germe d'intérêt, *S. aureus*, est restreint au compartiment phagolysosomal (Alexander et Hudson, 2001). Il est impliqué dans des infections communautaires et nosocomiales sévères dont la fréquence est, depuis quelques années, en recrudescence (à cause de l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques).

Tableau I.2. Les principales bactéries intracellulaires, leurs cellules cibles et la localisation subcellulaire des formes virulentes (Carryn et al., 2003)

Germes intracellulaires	Type de parasite	Cellules cibles	Localisation subcellulaire
<i>Brucella spp.</i>	facultatif	macrophages	phagosomes
<i>Chlamydia spp.</i>	obligatoire	cellules du parenchyme pulmonaire	inclusions
<i>Coxiella brunetii</i>	obligatoire	macrophages, cellules du parenchyme pulmonaire	phagosomes, phagolysosomes
<i>Francisella tularensis</i>	facultatif	macrophages	phagosomes
<i>Legionella pneumophila</i>	facultatif	macrophages	réticulum endoplasmique
<i>Listeria monocytogenes</i>	facultatif	macrophages, hépatocytes	cytosol
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	facultatif	macrophages	endosomes tardifs
<i>Rickettsia spp.</i>	obligatoire	cellules endothéliales	cytosol
<i>Salmonella spp.</i>	facultatif	macrophages	phagosomes
<i>Shigella flexeneri</i>	facultatif	macrophages	cytosol
<i>Staphylococcus aureus</i>	opportuniste	macrophages, PMNs	phagolysosomes

2.1. Listeria monocytogenes

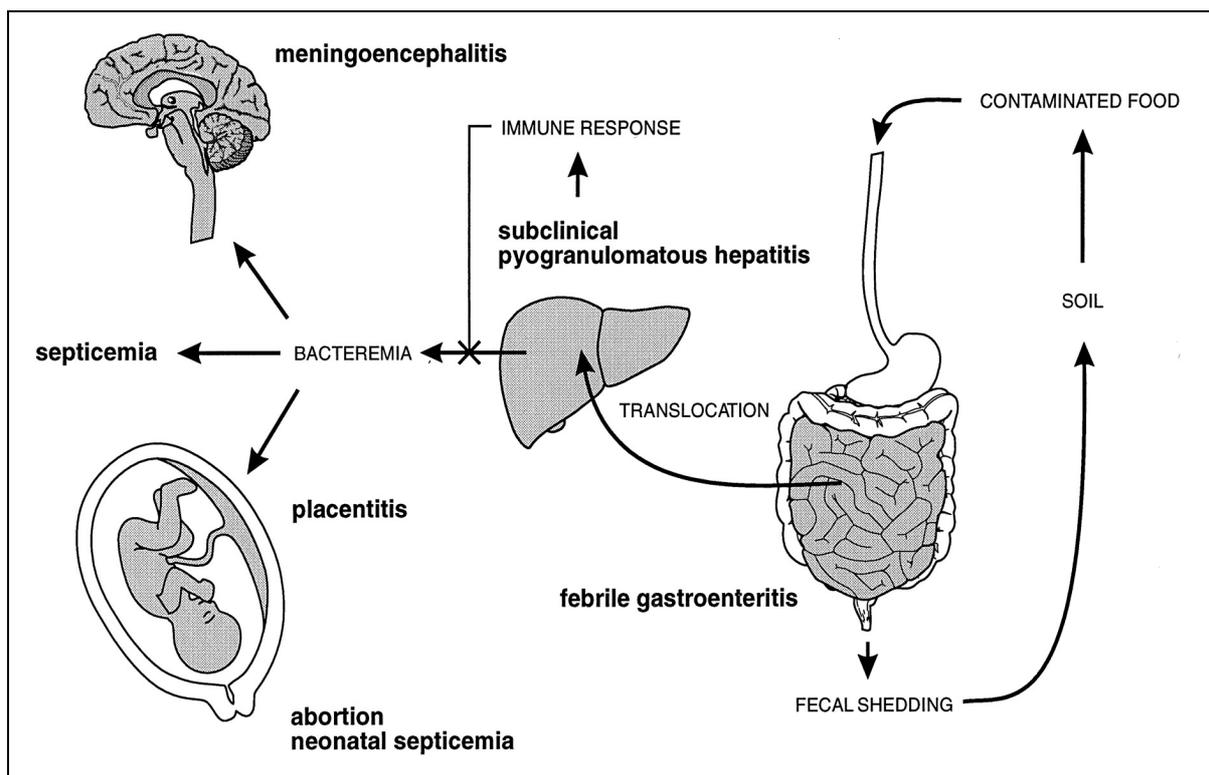
2.1.1. Caractéristiques microbiologiques (voir pour revue : Vazquez-Boland, 2001)

A ce jour, le genre *Listeria* regroupe six espèces : *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* et *L. grayi*. Parmi celles-ci, *L. monocytogenes* est potentiellement pathogène chez l'homme et responsable de la listériose. Ce bacille Gram positif anaérobie facultatif peut tolérer une gamme variée de températures (4°C à 40°C), de pH et de concentrations en sels, bien qu'il ne possède ni capsule ni spores. De ce fait, il est largement distribué dans l'environnement (sol, eau, aliments, fèces, ...) et est responsable d'infections alimentaires.

2.1.2. Physiopathologie des infections à *L. monocytogenes*

Après ingestion d'aliments contaminés (Schlech et al., 1983), les bactéries sont en partie détruites par l'acidité gastrique. Les germes survivants sont ensuite, semble-t-il, internalisés au niveau des cellules épithéliales intestinales (Rácz et al., 1972) ou des cellules M des plaques de Peyer (Marco et al., 1997). Ce germe peut alors, par voie lymphatique ou sanguine, atteindre les ganglions lymphatiques mésentériques, la rate et le foie (Fig. I.1.) où des macrophages hépatiques et spléniques déciment la majorité des germes (North, 1970). Quelques bactéries indemnes sont toutefois capables d'être internalisées dans des hépatocytes et d'y proliférer (Conlan et al, 1992). Dès lors, si ce type d'infection n'est pas contrôlé par des réponses immunitaires efficaces, il s'ensuit la dissémination du germe dans la circulation sanguine et son tropisme pour le système nerveux central et l'utérus gravide (Fig. I.1.) est à l'origine de listériose chez l'adulte (immunodéprimés, personnes âgées) et le fœtus.

Fig.I.1. Représentation schématique de la physiopathologie des infections à *L. monocytogenes* (Vazquez-Boland et al., 2001).



La listériose fœto-maternelle est, généralement, asymptomatique chez la femme enceinte, avec de temps à autre, un léger syndrome pseudo-grippal (fatigue, maux de tête, myalgies, ...). Par contre, elle est responsable, après colonisation du fœtus par voie transplacentaire (Hamada et al, 1981), d'infections sévères chez le fœtus, les formes les plus graves se caractérisant par une granulomatose disséminée à de nombreux organes (foie,

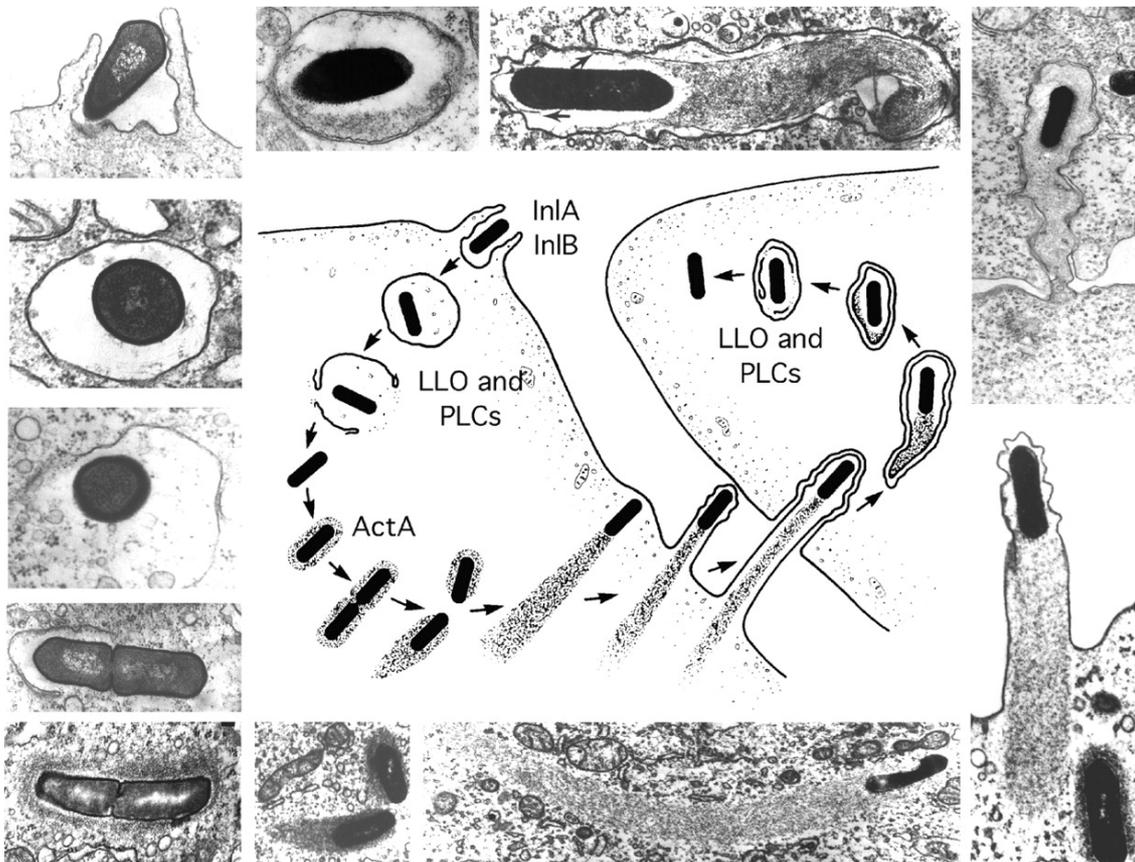
poumons, SNC, ...). *L. monocytogenes* constitue, par ailleurs, une des trois principales causes de méningites bactériennes chez le nouveau-né et est responsable d'avortements, de septicémie néonatale, ...

Chez l'adulte, ce germe est responsable de bactériémie, de septicémie, de méningites et de méningo-encéphalites (Gray et Killinger, 1966). D'autres formes cliniques atypiques existent, telles que l'endocardite, l'arthrite, la pneumonie, l'hépatite,... (Blendin, 1987 ; Farber et Peterkin, 1991).

2.1.3. Cycle intracellulaire de *L. monocytogenes*

Le parasitisme intracellulaire de *L. monocytogenes*, non seulement dans des macrophages (Mackaness et al., 1962), mais également dans des cellules épithéliales, des fibroblastes, des hépatocytes, des cellules nerveuses et des cellules endothéliales (Racz et al., 1972 ; Gaillard et al., 1987 ; Dramsi et al., 1995 ; Drevets et al., 1995), constitue le fondement même de sa pathogénicité. Il se constitue d'étapes distinctes, résumées dans la figure I.2., à savoir l'internalisation, la prolifération intracellulaire et la transmission de cellules à cellules.

Fig.I.2.Etapes du cycle intracellulaire de *L. monocytogenes* (Portnoy et al., 2002) et les photographies de microscopie électronique représentative des différentes étapes.



2.1.3.1. Internalisation (Gaillard et al, 1991)

Les bactéries interagissent avec les cellules hôtes au moyen de l'internaline A (Fig. I.2.), qui est codée par le gène chromosomique *inIA*. Cette protéine est présente en surface du germe et son interaction avec des récepteurs cellulaires facilite l'ingestion du germe dans la cellule. Un autre mode d'internalisation, dépendante de l'internaline B existe et agit, de concert, avec la voie médiée par l'internaline A (Dramsi et al., 1995).

2.1.3.2. Prolifération intracellulaire

Après internalisation du germe dans une vacuole phagocytaire (Fig. I.2.), cette dernière est rapidement acidifiée par des pompes à protons (De Chastellier et Berche, 1994). *L. monocytogenes*, qui est incapable de proliférer dans de telles conditions, dégrade le phagosome, au moyen de la listériolysine O (LLO, Gaillard et al, 1986) et d'une phospholipase C codée par le gène *plc A* (Camilli et al, 1993).

2.1.3.3. Transmission intercellulaire

Après internalisation, *L. monocytogenes* est capable de survivre dans le cytosol des cellules hôtes et d'y proliférer (Mackaness et al., 1969). La réplication intracytoplasmique s'accompagne d'une polymérisation de l'actine cellulaire (Fig.I.2.), accomplie par la protéine actA. Cela permet la propulsion aléatoire du germe à l'intérieur de la cellule (Mounier et al, 1990) et mène à la dissémination des germes aux cellules adjacentes, les microorganismes se retrouvant alors dans une vacuole cytoplasmique dotée d'une double membrane (Fig.I.2). Les bactéries peuvent alors s'échapper de cette vacuole par production d'une nouvelle phospholipase C (la phosphatidyl-choline phospholipase C, codée par le gène chromosomique *plc B*) (Geoffroy et al, 1991).

2.2. **Staphylococcus aureus**

2.2.1. Caractéristiques microbiologiques

Le staphylocoque doré est un germe apparenté au cocci Gram positif se multipliant dans des conditions de températures (15°C à 45°C), de pH, de concentrations en sels extrêmes. Il peut également exprimer des toxines (voir pour revue : Lowy, 1998) aussi diverses que la protéine A, l'exfoliatine, la leucocidine, des entérotoxines, la toxine du syndrome du choc toxique,...

Depuis quelques années, *S. aureus* est à l'origine de nombreuses préoccupations en milieu hospitalier, la majorité de ces souches cliniques étant productrices de β -lactamases. A l'heure actuelle, on considère ce germe comme intrinsèquement résistant

aux pénicillines (à l'exception de l'oxacilline et de ses dérivés) mais il reste sensibles aux associations d'aminopénicillines - inhibiteurs de β -lactamases (augmentin, ...), à de nombreuses céphalosporines (C1, C2, certaines C3) et aux carbapénèmes. Il existe néanmoins des souches de *Staphylococcus aureus* « résistantes à la méthicilline » (MRSA, pour « *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* »), caractérisées par une affinité restreinte de la majorité vis-à-vis de β -lactames (Saroglou et al., 1980). Ces souches présentent fréquemment une résistance à d'autres classes d'antibiotiques (fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides, tétracyclines, lincosamides) (Sanchez et al., 2000), les glycopeptides constituant la dernière arme des cliniciens vis-à-vis de cette souche pathogène. Malheureusement, depuis quelques années, on assiste à l'émergence de souches possédant une résistance aux glycopeptides (Hiramatsu, 1998)

2.2.2. Physiopathologie des infections à *S. aureus*

Les hommes constituent le réservoir naturel de *S. aureus* (30 à 50% d'individus sains colonisés, dont 10 à 20 % de façon persistante) (Noble et al., 1967), essentiellement au niveau du nez alors que la peau, l'oropharynx et les selles sont le siège d'une colonisation transitoire. Les contaminations (Casewell et Hill, 1986 ; Sheretz et al., 1996) sont dues à des transmissions interhumaines directes (contact de personne à personne, dissémination manuportée, matériel contaminé,...) ou indirectes (par l'intermédiaire d'aliments infectés), ce germe pénétrant de préférence l'organisme suite aux brûlures, blessures accidentelles, interventions chirurgicales ou maladie de la peau primitive. Il est, dès lors, impliqué dans des infections communautaires et nosocomiales (tableau I.3).

Tableau I.3. Tableau récapitulatif des différents types d'infections staphylococciques et leur localisation prédominante (voir pour revue : Lowy, 1998).

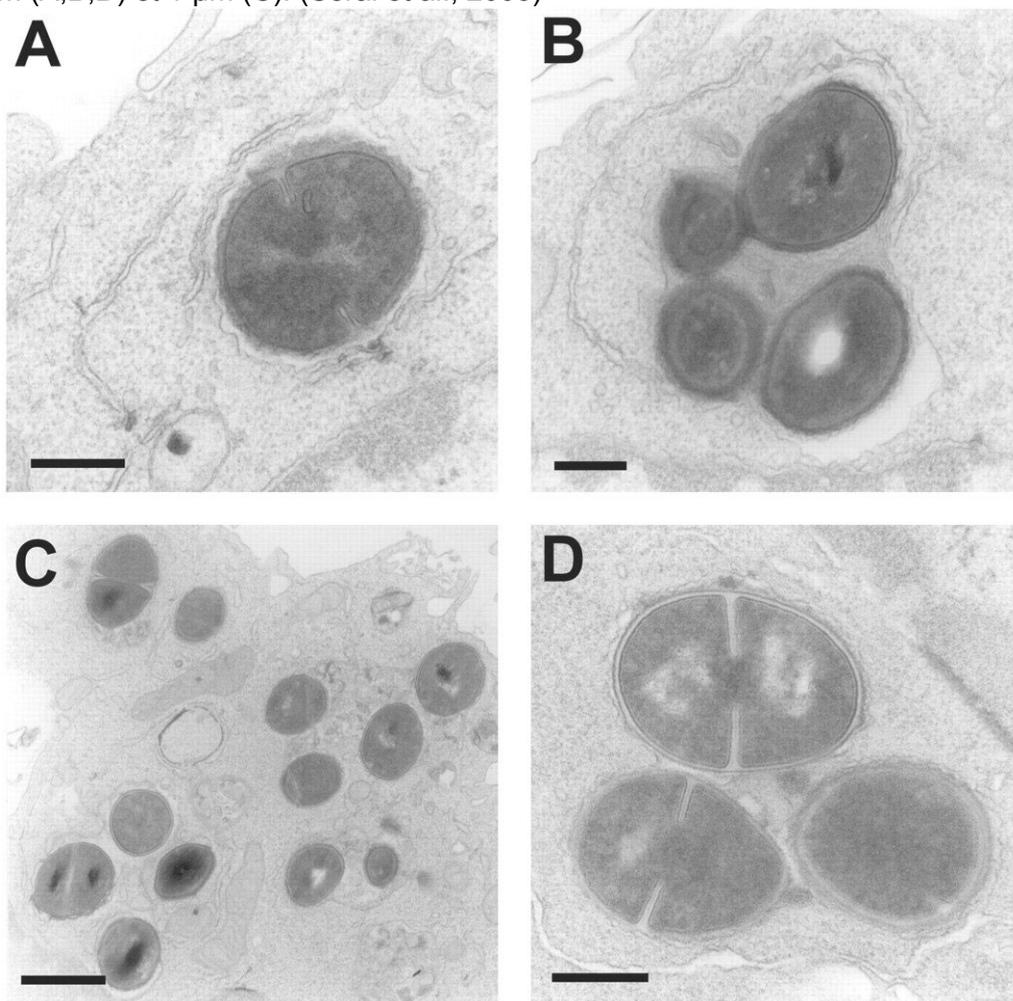
Infections	Pathologies
Communautaires	Toxi-infections alimentaires Infections cutané-muqueuses (folliculites, furoncles, anthrax, impétigo, abcès mammaires,...) Syndrome du choc toxique « Staphylococcal Scaled Skin Syndrome »
Nosocomiales	Staphylococcie maligne de la face Bactériémies, septicémies, endocardites, pneumonies, ... Arthrites, ostéomyélite, ... Infections du tractus urinaires Infections post-opératoires, infections associées au matériel contaminé (cathéters, ...)

2.2.3. Cycle intracellulaire de *S. aureus*

Le Staphylocoque doré n'est pas seulement un pathogène extracellulaire, il serait également capable de se comporter tel un pathogène intracellulaire. Des études *in vitro* (Ogawa et al., 1985; Almeida et al., 1996, Hudson et al., 1995 ; Hess et al., 2003) suggèrent qu'il infecte des cellules endothéliales, des fibroblastes, des ostéoblastes, des cellules épithéliales intestinales ainsi que des cellules de la glande mammaire. Ce germe est également impliqué dans l'infection de cellules phagocytaires (Lowy, 2000 ; Alexander et Hudson, 2001), telles que les monocytes, les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles.

Les travaux de Seral et al., réalisés sur des macrophages murins J774, suggèrent qu'après adhérence du Staphylocoque doré aux phagocytes, ce germe est localisé dans une vacuole, le phagolysosome (Fig. I.3.), où il peut proliférer.

Fig. I.4. Microscopie électronique de macrophages murins fixés 1h (A, B) et 24h (C, D) après phagocytose de *S. aureus*. A 24h, on observe que les germes sont distribués dans des structures vacuolaires, sans évidence de transfert vers le cytosol. Les barres correspondent à 0.3 μm (A,B,D) et 1 μm (C). (Seral et al., 2003)



L'infection staphylococcique est à l'origine de désordres cellulaires, menant à la lyse de la cellule infectée et à la libération subséquente de germes (Kahl et al., 2000 ; Hess et al., 2003). Des études (Proctor et al., 1994 ; Kahl et al., 1998 ; von Eiff et al. , 2000) ont montré qu'une population phénotypiquement différente de Staphylocoque doré, les SCVs (small colony variant), serait impliquée dans des infections persistantes et récurrentes. Les SCVs sont une sous-population de *S. aureus* à lente prolifération, formant de petites colonies blanchâtres non pigmentaires et non hémolytiques lors de leur culture sur gélose. Leur faible production de toxines α leur permet de persister dans les phagocytes professionnels (Vesga et al., 1996) réduisant les expositions des SCVs aux antibiotiques et aux mécanismes élaborés par les défenses immunitaires. De plus, leur lente prolifération réduit l'efficacité d'antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne (β -lactames, glycopeptides).

II. Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques

1. Généralités

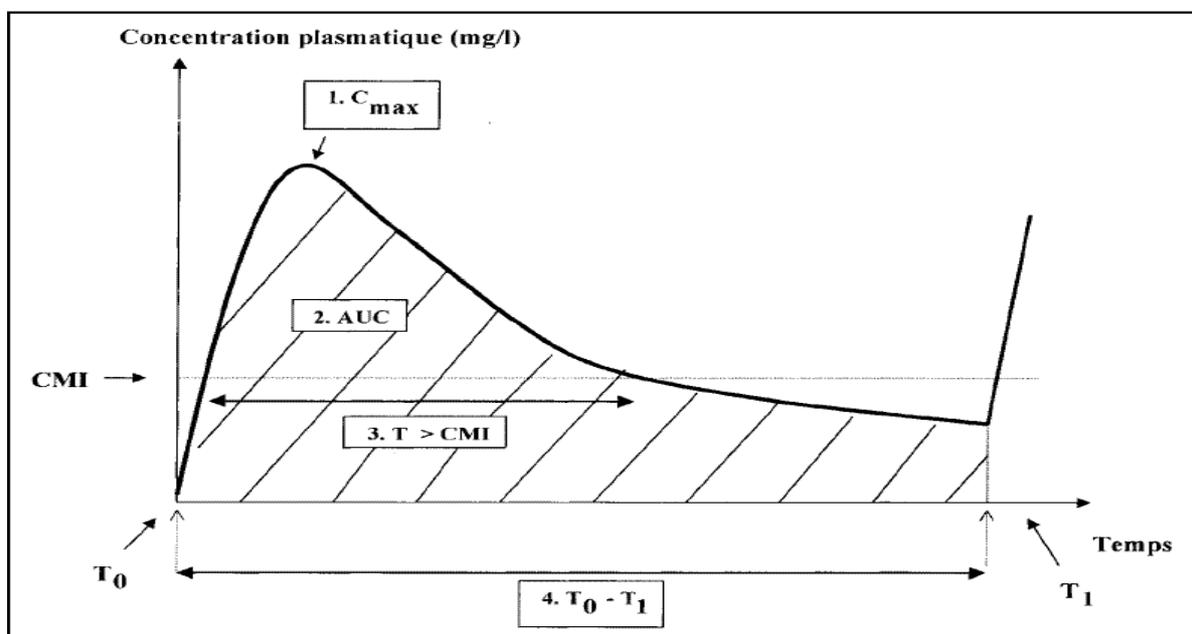
L'efficacité clinique d'un antibiotique résulte de la combinaison de ses propriétés antimicrobiennes intrinsèques (CMI, CMB) et de ses paramètres pharmacocinétiques (PC) et pharmacodynamiques (PD). La pharmacocinétique décrit le devenir du médicament dans l'organisme c'est-à-dire son absorption, sa distribution, son métabolisme et finalement, sa élimination. La pharmacodynamie établit, par contre, les relations entre les variations de concentrations en antibiotique et leur activité pharmacologique. Par ailleurs, la toxicité potentielle de certains agents anti-infectieux doit être prise en compte, afin d'orienter le choix final du clinicien. La prise en compte des propriétés PD des antibiotiques permet la distinction de différentes catégories d'agents anti-infectieux (tableau I.4.).

Tableau I.4. Paramètres d'activité, PC et PD des antibiotiques (d'après Craig et al., 2003).

Paramètre indicateur d'activité		Antibiotiques	Facteurs à prendre en compte	Paramètres PC-PD
Antibiotiques dépendants de la concentration	Effets persistants modérés à prolongés	Aminoglycosides Daptomycine Kétolides Quinolones	Favoriser la concentration	24-h AUC/CMI Cmax/CMI
Antibiotiques dépendants du temps	Effets persistants minimes ou nuls	β -lactames	Favoriser le temps d'exposition	Temps auquel la concentration d'antibiotique excède la CMI
	Effets persistants modérés à prolongés	Clindamycine Glycopeptides Linezolid Macrolides Tétracyclines	Favoriser la dose d'antibiotique	24-h AUC/CMI

Les antibiotiques temps-dépendants comprennent des molécules (tableau I.4.) dont l'activité est peu influencée par la concentration, du moins si celle-ci est supérieure à la CMI. Le schéma thérapeutique nécessite donc de fractionner la dose autant que nécessaire afin d'assurer un contact prolongé de l'antibiotique à des concentrations supérieures à la CMI (pour Concentration Minimale Inhibitrice, la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne). Les antibiotiques concentration-dépendants (tableau I.4.) comprennent des molécules dont l'activité est directement proportionnelle à la concentration d'agents anti-infectants en contact du germe. Le schéma thérapeutique optimal requiert la connaissance du rapport maximal C_{max}^1/CMI (aminoglycosides) et AUC^2/CMI (fluoroquinolones). (voir pour revue : Craig et al., 2003)

Fig.I.5. Principaux paramètres pharmacocinétiques pris en compte lors de l'évaluation de l'activité des antibiotiques (Van Bambeke et al, 1999)



2. Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'antibiothérapie intracellulaire

2.1. Propriétés pharmacocinétiques

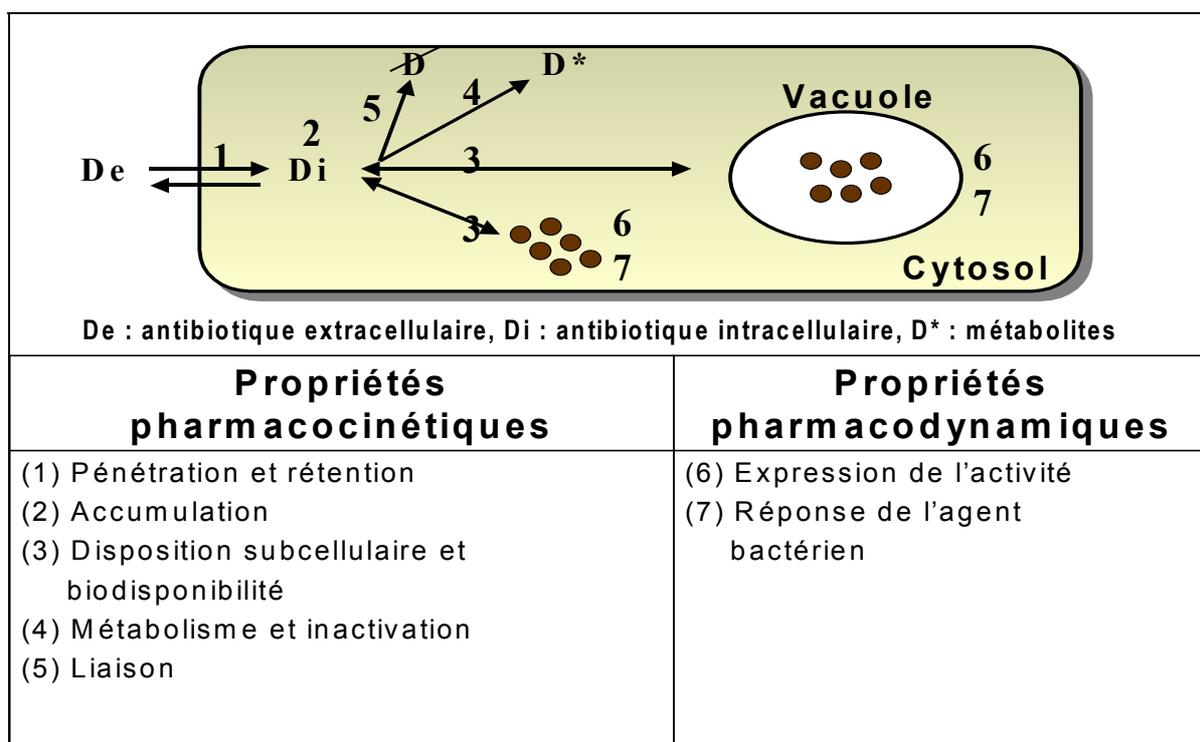
Afin d'être efficace envers des pathogènes intracellulaires, l'antibiotique doit préalablement interagir avec la cellule cible (Fig. I.5.), sa pénétration se réalisant par des mécanismes distincts, suivant la classe d'antibiotique prise en compte, c'est-à-dire par diffusion (β -lactames, macrolides), pinocytose (aminoglycosides, glycopeptides) ou transport

¹ C_{max} (pic sérique) : concentration maximale d'antibiotique atteignant le sérum après administration conventionnelle, correspondant au rapport Dose/V_d(Volume de distribution).

² AUC (Area Under Curve, ou aire sous la courbe), correspondant au rapport Dose/clairance, donne une mesure globale de la quantité totale d'antibiotique auquel l'organisme est exposé.

actif. Après ce processus, l'agent anti-microbien peut s'accumuler (Fig.I.6) dans la cellule, au niveau de la fraction soluble (β -lactames, fluoroquinolones, <30 % de la quantité intracellulaire des macrolides) ou de vacuoles, telles que les lysosomes (70 % de la quantité intracellulaire de macrolides, aminoglycosides, glycopeptides) (Tableau I.5.). Les antibiotiques peuvent également être soumis à des dégradations (chimiques ou enzymatiques) (Fig.I.6.) ou faire l'objet de pompes à efflux (Fig.I.6.), extrudant l'antibiotique de la cellule (β -lactames, macrolides, fluoroquinolones) (Tableau I.5.).

Fig. I.6. Paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques impliqués dans l'activité d'agents anti-bactériens envers des germes intracellulaires (d'après Tulkens, 1991)



2.2. Propriétés pharmacodynamiques

Pour démontrer leur efficacité, les antibiotiques doivent entrer en contact avec des germes intracellulaires (Fig. I.6.), durant un intervalle de temps raisonnable ou à une concentration excédant la concentration minimale inhibitrice (CMI, désignant la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne), suivant leur nature d'antibiotiques temps-dépendants ou concentration-dépendants. L'importance des propriétés pharmacodynamiques en milieu intracellulaire n'est, toutefois, pas totalement élucidée et elle fait l'objet de nombreuses études.

Tableau I.5. Principales propriétés des antibiotiques en relation avec leur capture cellulaire (d'après Carryn et al., 2003)

Classe d'antibiotique	Influx	Efflux	Niveau d'accumulation (à l'équilibre)	Distribution subcellulaire
β-lactames	rapide	variable	< 1	cytosol
Macrolides	rapide	variable	> 4	2/3 : lysosomes 1/3 : cytosol
Fluoroquinolones	rapide, voire très rapide	très rapide	4-10	cytosol
Aminoglycosides	très lent	très lent	2-4 (après plusieurs jours d'exposition)	lysosomes
Tétracyclines	rapide	?	1-4	?
Glycopeptides	variable	?	> 8	lysosomes

III. Les β -lactames dans le traitement des infections intracellulaires

1. Généralités (voir pour revue : Tomasz, 1986).

Les β -lactames se composent des pénames (pénicilline, ampicilline, ...), des inhibiteurs de β -lactamases, des clavames (acide clavulanique), des céphèmes, des carbapénèmes et de l'oxacéphème. Tous ces composés sont dotés d'une structure commune, le noyau β -lactame, qui interagit spécifiquement avec la D-alanyl-D-alanyl transpeptidase, une enzyme bactérienne de la classe des PBP (Penicillin Binding Protein) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne. Cette interaction est responsable de perturbations de la membrane bactérienne, inhibant, de ce fait, la croissance du germe et menant à la bactériolyse. De plus, l'activation d'enzymes lytiques, les autolysines, semble être impliquée dans l'activité bactéricide. Les β -lactames disposent d'une activité vis-à-vis de germes en division et leur activité bactéricide est relativement lente, sans effet important de la concentration ni effet post-antibiotique marqué.

2. Distribution intracellulaire des β -lactames

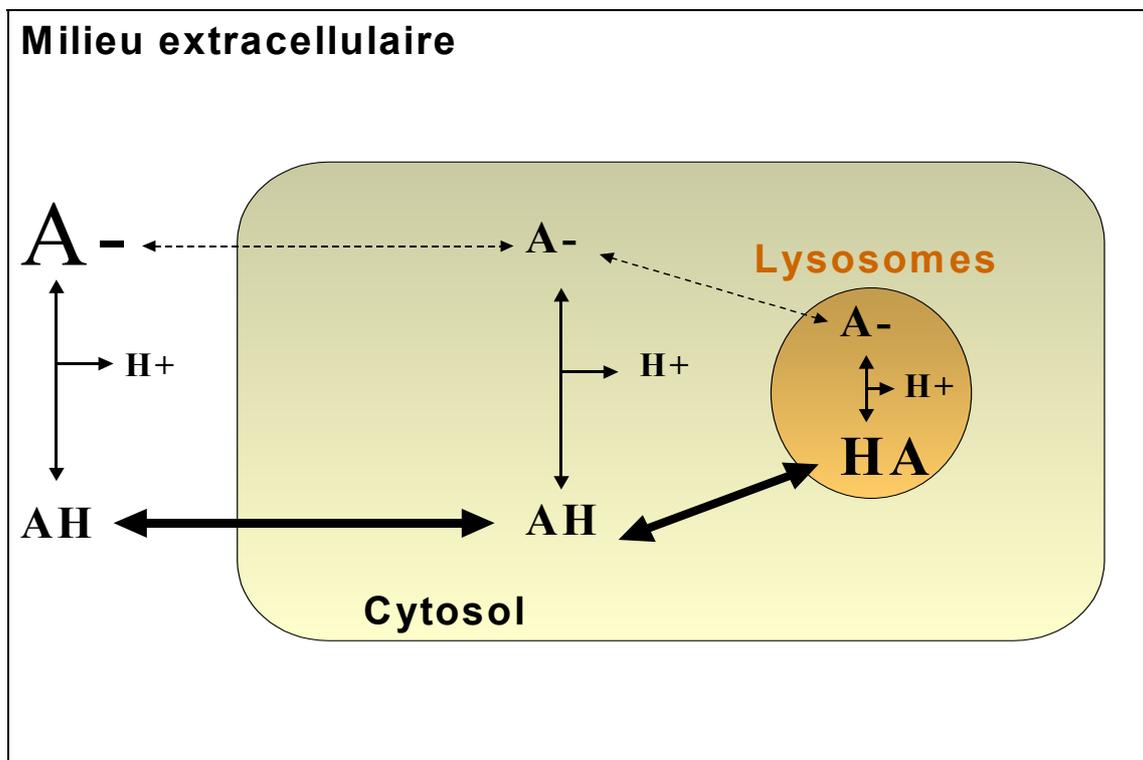
Les β -lactames ne s'accumulent pas dans les cellules, c'est-à-dire que leur concentration intracellulaire apparente (C_c) reste inférieure à leur concentration extracellulaire (C_e), même après exposition prolongée de l'antibiotique durant de nombreux jours (Brown et Percival, 1978 ; Johnson et al., 1980). Des auteurs en ont conclu, de manière erronée, que les β -lactames ne pouvaient pénétrer dans les cellules. Il semble, toutefois, que cette classe d'antibiotique fasse l'objet d'une diffusion au travers de la membrane cellulaire et la faible quantité d'antibiotique intracellulaire serait distribuée dans la fraction soluble (Trouet et al., 1981 ; Renard et al, 1987).

La majorité des β -lactames disposent d'une fonction acide libre et sont considérés, de la sorte, comme des acides organiques. Des études ont montré qu'un dérivé basique de la pénicilline G, le N-(3-diméthylaminopropyl)benzylpenicillinamide (ABP) (Renard et al., 1987), peut, contrairement à la pénicilline G, s'accumuler dans les macrophages. Le caractère acide-base semble donc être impliqué dans cette divergence d'accumulation cellulaire. Il semblerait que la forme prédominante du milieu extracellulaire des β -lactames soit la forme déprotonée (A^-) (Milne et al., 1958). Par contre, dans les compartiments acides de la cellule (tel que les lysosomes), la forme HA devient prépondérante. En raison de sa grande diffusibilité, elle a toutefois tendance à ressortir des cellules pour quitter les

compartiments acides. Or, les cellules, dont le pH varie de 4.5 à 7.4, sont plus acides que le compartiment extracellulaire et disposent, de ce fait, d'une faible quantité d'antibiotiques.

Les travaux de Renard et al. suggèrent par ailleurs que la dissimulation du groupement acide libre des β -lactames permettrait à ces antibiotiques de s'accumuler dans les cellules, par rapport à leurs dérivés correspondant. La situation semble toutefois plus complexe pour des formes zwitterion de β -lactames, telles que l'ampicilline ou des céphalosporines (C3, C4), ne semble pas s'accumuler dans les cellules la présence de pompes à efflux extrudant l'agent anti-infectieux des cellules.

Fig. I.6. Mécanisme de capture des médicaments acides par les cellules.



3. Activité intracellulaire des β -lactames en relation avec leur capture cellulaire

L'activité de β -lactames vis-à-vis de pathogènes intracellulaires a été investiguées dans de nombreuses études (voir pour revue : van den Broek, 1989), démontrant que ces antibiotiques ne peuvent contrôler la croissance de germes intracellulaires, sauf s'ils sont présents à de fortes doses et durant un intervalle de temps suffisant. S'ils sont administrés à de fortes doses, ils peuvent hypothétiquement atteindre leur cible, à une concentration supérieure à la CMI. Les travaux de Carryn et al. (2002), réalisés sur un modèle d'infection intracellulaire à *L. monocytogenes*, montrent que l'ampicilline et le méropénème (à une concentration équivalente au pic sérique après administration conventionnelle) sont

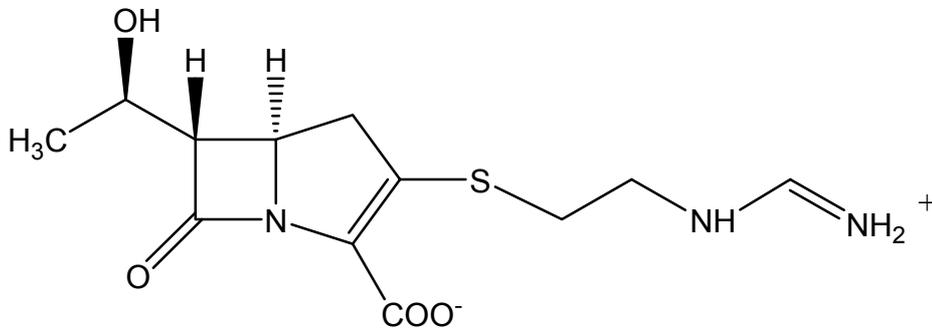
bactéricides (c'est-à-dire qu'ils sont responsables d'une réduction de la croissance bactérienne de ~ 2 log.) après 24h. Dans de telles conditions, le rapport C_c/C_e des β -lactames est inférieur à 1 mais il semblerait que les β -lactames entrent en contact direct avec le pathogène, leur concentration cellulaire excédant largement la CMI (ampicilline, $\sim 150x$; méropénème, $\sim 700x$).

IV. L'ertapénème

1. Généralités

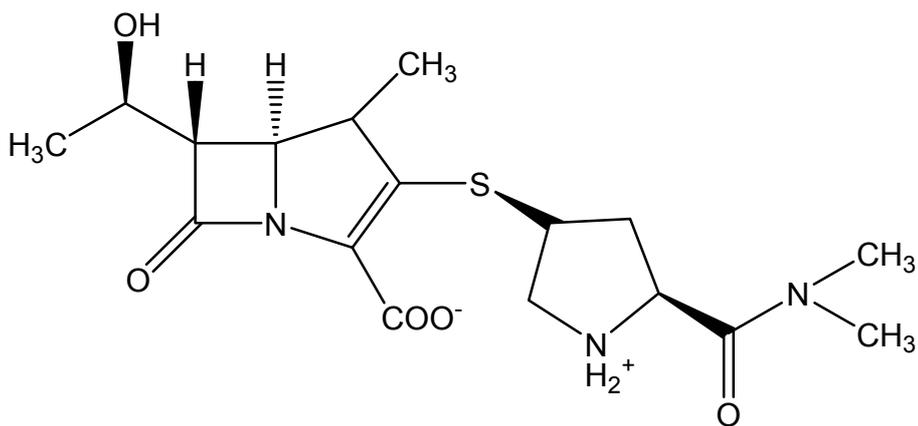
Les carbapénèmes sont des antibiotiques dérivant de la thiénamycine, à large spectre antibactérien (Gram +, Gram -, anaérobies) incluant, entre autres, les germes producteurs de β -lactamases. L'imipénème est le premier représentant de cette classe d'antibiotiques (Fig. I.7) mais son hydrolyse par une enzyme rénale, la déhydropeptidase rénale (DHP-1), est responsable (i) de l'inactivation de 60% de l'antibiotique et (ii) de la production de composés néphrotoxiques. Cela justifie donc la coadministration d'un inhibiteur de la DHP-1, tel que la cilastatine (Balfour et al., 1996).

Fig.I.7. Structure chimique de l'imipénème (P.M. : 317.37) (d'après Shah et Isaacs, 2003)



Le méropénème (Fig. I.8.), doté d'un groupement β -méthyl, n'est pas hydrolysé par la DHP-1 et ne requiert, en conséquence, pas de coadministration de cilastatine (Hurst et Lamb, 2000).

Fig.I.8. Structure chimique du méropénème (P.M. : 437.52) (d'après Shah et Isaacs, 2003)



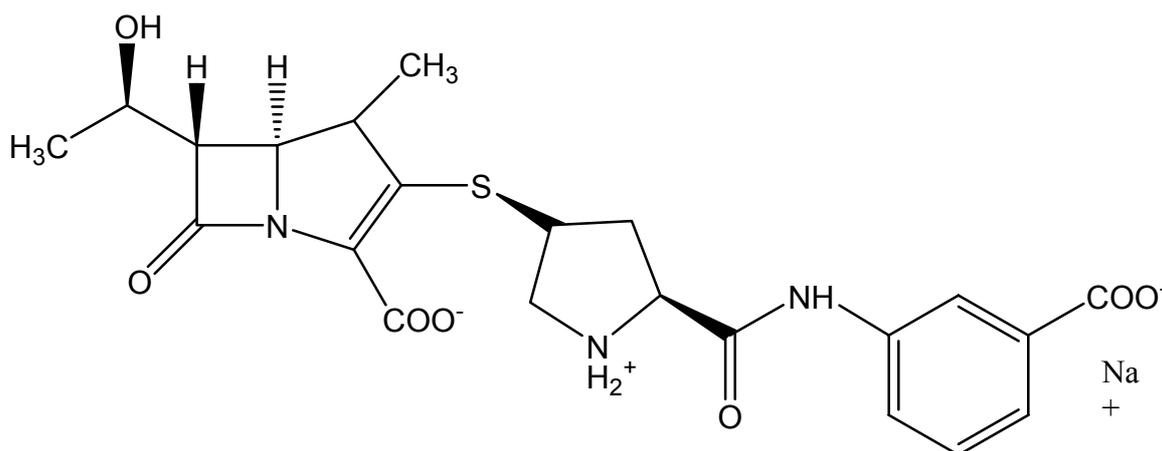
Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'ertapénème, une pénème possédant les caractéristiques structurales et fonctionnelles du méropénème, mais dont les propriétés pharmacocinétiques le distinguent largement des autres représentants des carbapénèmes.

2. L'ertapénème

2.1. Structure chimique

L'ertapénème (Fig. I.9) est un analogue du méropénème doté d'une groupement benzoate, qui augmente le pourcentage de liaison de la molécule aux protéines plasmatiques et accroît son temps de demi-vie.

Fig.I.9. Structure chimique de l'ertapénème (P.M. : 497.5) (d'après Shah et Isaacs, 2003)



2.2. Mécanisme d'action et spectre anti-bactérien

L'ertapénème, ainsi que les β -lactames en général, se lie à différents types de PBP (*Escherichia coli* : PBP 1a, 2, 3, 4 et 5, et préférentiellement aux PBP 2 et 3) (Kohler et al., 1999). Le spectre antibactérien de cet agent anti-infectieux est relativement large et comprend, entre autres, les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* producteurs de β -lactamases à spectre étendu (ESBL), tel que *E. coli*, *K. pneumoniae* (Jones, 2001). Cet agent anti-infectieux résiste également à l'hydrolyse de β -lactamases de type AmpC, de pénicillases et de céphalosporinases mais il est néanmoins hydrolysé par les métallo- β -lactamases produites par des *Enterobacteriaceae* (Livermore et al., 2001).

L'activité de l'ertapénème est toutefois restreinte envers *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Clostridium difficile*, ... et il est totalement inefficace envers les entérocoques et les Staphylocoques dorés résistants à la méticilline (MRSA) (Fuchs et al., 2001).

2.3. Propriétés pharmacocinétiques

2.3.1. Distribution

Les paramètres pharmacocinétiques de l'ertapénème ont été déterminés et révèlent que le pic sérique, après injection intraveineuse d'un bolus de trente minutes, atteint

~ 155 mg/L dès la fin de l'infusion (Musson et al., 2003), une valeur trois fois plus élevée que cette atteinte, dans les mêmes conditions, par le méropénème (~ 50 mg/L).

Le pourcentage de liaison de l'ertapénème aux protéines plasmatiques a été également estimé et il est influencé par la concentration d'antibiotique. En effet, à une concentration inférieure à 100 mg/L, il atteint 95% alors qu'à une concentration de 300 mg/L, le taux de liaison est de 82-85%. Le méropénème, par contre, n'est pas lié aux protéines plasmatiques.

2.4.2. Elimination

La majorité de l'antibiotique est éliminée par voie rénale, 38 % de la fraction urinaire sous forme inchangée et 37 % sous la forme d'un métabolite à cycle ouvert, inactif d'un point de vue bactériologique. La clairance rénale indique que le taux de demi-vie d'élimination plasmatique est équivalent à 4.6 h chez l'homme et 3.6 h chez la femme. (Hurst et Lamb, 2000 ; Odenholt et al., 2001), une valeur ~ 4 fois plus élevée que celle atteinte dans les mêmes conditions par le méropénème.

2.4. Indications

L'ertapénème a démontré une efficacité clinique et est indiqué dans le traitement d'infections intra-abdominales compliquées (Solomkin et al, 2003), d'infections de la peau et des structures cutanées (Graham et al, 2002), des pneumonies extra-hospitalières (Ortiz-Ruiz et al, 2002), des infections urinaires compliquées (Tomera et al, 2002) et des infections pelviennes aiguës (Roy et al, 2003).

2.5. Effets indésirables

Des effets défavorables, légers ou modérés, ont été recensés après injection intraveineuse d'ertapénème durant une période de 14 jours. Il s'agit de diarrhées, de nausées, de vomissements, de céphalées, d'asthénie, de fièvre,...

2.6. Contre-indications

L'ertapénème est contre-indiqué chez les patients présentant une hypersensibilité connue aux β -lactames. De plus, étant donné que cet antibiotique est reconstitué dans du chlorhydrate de lidocaïne lors d'une injection intramusculaire, toute administration I.M. d'Invanz est prohibée chez des patients présentant une hypersensibilité connue aux anesthésiques locaux (de type amide).

Objectif du mémoire

L'objectif de notre étude est de déterminer dans quelle mesure l'ertapénème peut présenter une activité significative vis-à-vis de deux types de bactéries intracellulaires se développant dans des compartiments subcellulaires distincts, à savoir (i) *L. monocytogenes*, qui envahit le cytosol, et (ii) *S. aureus*, qui reste confiné aux phagolysosomes, et ceci en comparaison avec le méropénème et l'ampicilline.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle validé de cellules phagocytaires d'origine humaine, les macrophages THP-1. Dans ce modèle, nous avons réalisé des études quantitatives et qualitatives (i) en effectuant des comptages des bactéries intracellulaires et (ii) en examinant la morphologie de ces mêmes bactéries intracellulaires.

Sur base des résultats obtenus, qui montrent une divergence d'effets entre l'ertapénème et le méropénème en ce qui concerne l'activité vis-à-vis de *L. monocytogenes*, un objectif secondaire a été de tenter de comprendre l'origine de cette divergence en déterminant la capacité de la molécule (i) à se concentrer dans la cellule, (ii) à demeurer stable dans les conditions expérimentales et (iii) à se lier aux protéines.

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Souches bactériennes, conservation et culture

- Souches bactériennes :

(a) *Listeria monocytogenes*, souche EGD, sérotype 1/2 a, isolée par l'institut Trudeau (Saranac Lake, N.Y., Etats-Unis) et pour laquelle la présence d'hémolysine est examinée par formation de plages de lyse après étalement sur gélose trypticase de soja à 5 % de sang de mouton (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Allemagne).

(b) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), dépourvus de mécanismes de résistance

En plus de ces deux souches d'intérêt, *E. coli* et *Bacillus subtilis* sont utilisés pour des dosages d'antibiotiques.

- Conservation :

Un inoculum bactérien est cultivé dans du bouillon tryptique de soja (TSB, Difco, Becton Dickinson & co., Sparks, Md) à 37°C durant une nuit. Les germes sont ensuite récupérés en phase logarithmique de croissance ($\approx 10^9$ bactéries/mL), centrifugés 20 minutes à 3184 g (5810R Centrifuge, Gerateban Eppendorf, GmbH, Engeldorf, Allemagne), aliquotés en présence de 20 % de glycérol (Sigma Chemical Co., St Louis, Etats-Unis) et, finalement, conservés à -80°C.

- Culture :

Un aliquot, conservé à -80°C, est rapidement décongelé et inoculé dans du TSB. Après 18h à 24h d'incubation à 37°C, cette suspension bactérienne est récupérée et utilisée pour des expériences ultérieures. De plus, une mesure de l'absorbance à 620 nm (Cecil CE 2040, Cecil Instruments Ltd, Cambridge, Royaume-Unis) est effectuée et permet d'estimer la quantité de germes dans l'échantillon (Ouahiri et al., 1999 ; Seral et al., 2003).

1.2. Cellules

Les expériences ont été réalisées sur des cellules de la lignée myélomonocytaire humaine (THP-1, ATCC TIB-202), dotées d'une activité phagocytaire et provenant du sang d'un garçon, âgé de 1 an, et atteint de leucémie monocyttaire aiguë (Tsuchiya et al., 1980). Ces cellules sont cultivées à 37°C, dans du milieu RPMI 1640 (Gibco Biocult, Invitrogen Corporation, Paisley, Royaume-Unis) auquel est ajouté 10 % de sérum foetal de veau (Gibco

Biocult, Invitrogen Corporation, Paisley, Royaume-Unis), et dans une atmosphère composée de 5% de CO₂.

1.3. Antibiotiques

Le sel sodique d'ampicilline (Sigma –Aldrich CO., St Louis, Missouri, Etats-Unis), l'ertapénème (Invanz®, Merck Sharp & Dohme, Haarlem, Pays-Bas) et le méropénème (Meronem®, Astra–Zeneca, Astra pharmaceuticals, Bruxelles, Belgique) sont des poudres doté d'une pureté de, respectivement, de 100 %, 73 % et 76 %. La gentamicine (Geomycine®, Shering–Plough Belgium, Bruxelles, Belgique) est également employée lors d'expériences in vitro.

2. Méthodes

2.1. Dosages

2.1.1. Dosage de protéines

Principe : La quantification des protéines totales d'un échantillon est réalisée, suivant le protocole de Lowry (Lowry et al., 1951), afin d'effectuer des comparaisons entre échantillons. Cette réaction se base sur la capacité des protéines à former des complexes avec les ions cuivriques du réactif de Biuret. La coloration est d'ailleurs amplifiée par le phénol de Folin (mélange d'acide phosphomolybdique et phosphotungstique), qui varie l'intensité de la coloration des échantillons en fonction du contenu de protéines cellulaires. La concentration en protéines totales est déterminée par rapport à un étalon d'albumine bovine de concentration connue (BSA, 100 mg/L) et la lecture de la densité optique est réalisée à 660 nm, au moyen d'un photomètre (Vitatron MCP, Vital Scientific, France).

Protocole : Après sonication des lysats cellulaires (Labsonic – L sonotrode 50 watts, 15 sec), 300 µL d'échantillons sont additionnés, durant 30 minutes, à l'hydroxyde de sodium 2 N (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Ensuite, l'addition de 2 ml de réactif de Biuret (carbonate de sodium 2%, tartrate sodico-potassique 2% et sulfate de cuivre pentahydraté 1% ; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) (10 à 20 minutes d'incubation) et de 200 µL du réactif de Folin-Ciocalteu du phénol (dilution ½, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) (30 minutes) est effectuée et la densité optique est finalement mesurée à 620 nm.

2.1.2. Dosage de l'ertapénème et du méropénème

Le dosage de l'ertapénème et du méropénème est réalisé de deux manières distinctes, à savoir par dosage microbiologique (détermination du facteur d'accumulation, dosage des échantillons soumis à l'équilibre de dialyse) et par Chromatographie Liquidienne

à Haute Performance (HPLC) (stabilité, dosage des échantillons soumis à l'équilibre de dialyse).

2.1.2.1. Dosage microbiologique

La concentration d'antibiotique est évaluée par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance d'*E. coli* en gélose (Antibiotic Medium 2, Difco, Becton Dickinson & co., Sparks, Md). Pour ce faire, 20 µL d'échantillons sont injectés sur des disques de papier (Becton Dickinson and Company, Sparks, Etats-Unis), déposés au préalable sur la géloseensemencée d'*E.coli* (à une concentration équivalente à 5.10^5 germes/mL). Après 18h d'incubation à 37°C, les diamètres d'inhibition peuvent être mesurés et la concentration d'antibiotique évaluée, par comparaison à une droite d'étalonnage de concentration d'antibiotique connue (gamme de linéarité : 0.25 mg/L à 70 mg/L [$r^2 = 0.9979$] pour l'ertapénème ; 1mg/L à 60 mg/L [$r^2 = 0.9875$] pour le méropénème).

2.1.2.2. Dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Le dosage de l'ertapénème et du méropénème est évalué après séparation par HPLC, au moyen des conditions suivantes : colonne Lichrospher 100 RP-18, 25 x 4 cm, 5 µM (Merck, Allemagne) ; phase mobile : acétonitrile – tampon phosphate 25 mM pH 6.5 (vol/vol : 7-93) filtré (0.45 µM Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, Etats-Unis) ; volume d'injection : 50 µL ; flux : 1 mL/min. ; détecteur UV : 300 nm ; gamme de linéarité : 0.09 mg/L à 200 mg/L ($r^2 = 0.9999$) pour l'ertapénème et 0.19 mg/L à 200 mg.L ($r^2=0.9999$) pour le méropénème. La quantification de la concentration d'antibiotique est effectuée au moyen du module de séparation Waters 2690 (Waters Corporation, Milford, USA).

2.1.3. Dosage de la lactate déshydrogénase

Principe : La lactate déshydrogénase (LDH) est un enzyme cytosolique catalysant l'inter-conversion du pyruvate et du lactate suivant la réaction suivante :



Le dosage de cette enzyme permet l'évaluation de l'intégrité membranaire car le relargage de LDH dans le milieu extracellulaire est synonyme de souffrance cellulaire. Dès lors, on peut estimer la viabilité cellulaire dans le lysat cellulaire et le surnageant, en tenant compte de la décroissance du NADH absorbant à 339 nm (contrairement à sa forme oxydée).

Protocole : les cellules sont récupérées, centrifugées (8 minutes, 4°C, 327g), décantées, resuspendues dans 1 mL d'eau millipore-Q et finalement soumises à une

sonication de 15 secondes. Ensuite, 50 µL d'échantillon (lysate cellulaire ou surnageant) sont mis en présence de NADH 0.244 mM et de pyruvate 9.76 mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Allemagne), la décroissance du NADH étant examinée, après 5 minutes, au moyen d'un spectrophotomètre à 339 nm (CECIL 2040, CECIL instruments limited, Cambridge, Royaume-Uni).

2.2. Dénombrement des bactéries

Le nombre de bactéries viables (CFU, Colony Forming Unit) est déterminé après étalement de 50 µL d'échantillon sur TSA (Tryptic Soy Agar Difco, Benton Dickinson & Co, Sparks, Md, Etats-Unis) et incubation de 24h à 37°C, au moyen du logiciel Quantity One et du dispositif Gel-Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, Etats-Unis).

2.3. Détermination de l'activité intrinsèque de β-lactames : CMI et CMB

La CMI a été déterminée dans du TSB, en présence d'un inoculum bactérien constant (10^6 bactéries/mL) et de concentrations variables d'antibiotiques, obtenues par dilutions géométriques ou arithmétiques (0.1 mg/L d'incrément). Après incubation de 24 h à 37°C, la CMI est déterminée comme étant la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber, à l'œil nu, la croissance bactérienne. La CMB a été ultérieurement déterminée, après étalement sur TSA et incubation de 24 h à 37°C, comme étant la plus petite concentration d'antibiotique où aucune colonie n'est visible sur gélose (Carryn et al., 2002).

2.4. Cinétique d'activité en bouillon

L'activité de l'antibiotique est estimée dans un système acellulaire, en mettant en présence cet antibiotique, dilué dans le TSB, avec un inoculum bactérien de 10^6 bactéries/mL. Après incubation de 5h et 24h, à 37°C, l'étalement sur TSA est effectué et le dénombrement du nombre de CFU permet d'estimer l'activité de l'antibiotique (Carryn et al., 2002).

2.5. Détermination de l'activité intracellulaires d'antibiotiques

2.5.1. Infection intracellulaire de macrophages THP-1 par *L. monocytogenes*

Afin de déterminer l'activité intracellulaire d'antibiotique, les cellules sont mises en contact de *L. monocytogenes* (5 bactéries/cellule) durant 1 heure, à 37°C et en présence de 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite récupérées et l'élimination des germes extracellulaires est effectuée par quatre lavages (PBS stérile, 37°C), en alternance avec des centrifugations (8 minutes, 20°C, 327 g) et des resuspensions. L'éradication des germes extracellulaires est vérifiée, dans le surnageant, après étalement sur TSA.

L'antibiotique, dissous dans le milieu RPMI 1640 enrichi par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (DFCS), est ensuite ajouté aux cellules. Chaque expérience comporte également un contrôle auquel est additionné 1mg/L de gentamicine (concentration équivalente à la CMI du germe) pour des expériences s'étalant au-delà de 5h. Les germes ne sont donc plus capables de réinfecter de nouvelles cellules après la lyse cellulaire et la libération subséquente de germes dans le milieu extracellulaire.

Après différents intervalles de temps d'exposition à l'antibiotique (5h, 24h), les cellules sont récupérées, centrifugées (8 minutes, 4°C, 327 g), lavées (PBS stérile, 4°C), centrifugées et finalement lysées (eau stérile). Les échantillons résultants sont utilisés afin de déterminer (i) le nombre de bactéries viables après étalement sur TSA, (ii) le contenu en protéines cellulaires, et finalement, (iii) la concentration cellulaire apparente de l'antibiotique dans les cellules infectées. (Ouadrhiri et al., 1999 ; Carryn et al., 2002)

2.5.2. Infection intracellulaire de macrophages THP-1 par *S.aureus*

Un mL de culture bactérienne en phase logarithmique de croissance est centrifugé (8 minutes, 20 °C, 3190g) et après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10 % de sérum humain frais afin de permettre l'opsonisation des germes (30 minutes à 37°C).

Après l'opsonisation, les phagocytes sont mis en présence de *Staphylococcus aureus* (4 bactéries/cellule), durant une heure à 37°C. Les cellules sont ensuite récupérées, centrifugées (8 min., 20°C, 327 g) et un premier lavage au PBS stérile (en présence de 50 mg/L de gentamicine) est effectué, durant 45 minutes à 37°C afin d'éradiquer les germes extracellulaires. Ultérieurement, trois lavages sont effectués (PBS stérile, 37°C) et les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture frais contenant l'antibiotique. Toute expérience s'étalant au-delà de 5h comporte des contrôles auxquels la gentamicine, à une concentration correspondant à la CMI du germe (0.5 mg/L), est additionnée. Les travaux de Seral et al. ont, en effet, montré qu'après 5h, sans exposition à la gentamicine, les germes sont capables de s'échapper des cellules infectées et de contaminer le milieu extracellulaire. Il s'ensuit, dès lors, une acidification du milieu, menant à la mort des cellules.

Après différents intervalles de temps d'exposition aux antibiotiques (5h, 24h), les cellules sont récupérées, centrifugées (8 min., 4°C, 327 g), lavées (PBS, 4°C) et finalement lysées à l'eau Milli-Q. Les échantillons résultants permettent la quantification des CFU et des protéines cellulaires. (Barcia-Macay et al., en préparation).

2.6. Etude de morphologie bactérienne

2.6.1. Microscopie optique

La morphologie des macrophages infectés par des germes intracellulaires (*L. monocytogenes* et *S. aureus*) est examinée au moyen d'un microscope optique. Ainsi, 200 µL de cellules, exposées durant 1 heure à *L. monocytogenes*, sont injectées dans une cytocentrifugeuse (Cytospin, Shandon Elliot, Pittsburgh, USA), la force centripète (800 rpm, 3 minutes) permettant la propulsion des cellules en suspension, au travers d'un filtre ((Shandon Elliot, Pittsburgh, Etats-Unis), sur une lame de verre (Super Frost, Menzel-Glasser, Allemagne).

Ces lames sont ensuite récupérées, séchées à l'air et fixées à la chaleur. Différents protocoles de coloration ont été employés, tel que la coloration de Gram (Color Gram 2 ;Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France), la coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) (FLUKA Chemie AG, Suisse), le bleu de méthylène (Janssen Chimica, Beerse, Belgique). Après coloration, les lames sont séchées à température ambiante et examinées au moyen de l'objectif à immersion 100x (microscope Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Toutefois, aucune des colorations employées ne nous a permis de colorer adéquatement les bactéries et les cellules simultanément.

2.6.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

But : Cette technique est utilisée pour déterminer (i) la localisation de germes intracellulaires dans les macrophages infectés et (ii) la morphologie des germes après exposition prolongée à une concentration de 155 mg/L d'ertapénème.

Principe : Avant d'être observé au microscope, l'échantillon est soumis à différents processus, à savoir la fixation, la déshydratation et, finalement, l'inclusion. Ensuite, des coupes ultra-fines des échantillons sont réalisées et le contraste des structures est renforcé par l'utilisation de sels de métaux lourds. L'échantillon est ensuite placé dans une enceinte sous vide, où les électrons sont arrachés d'un filament métallique et focalisés par des lentilles électromagnétiques sur les structures à analyser.

Protocole : Les macrophages sont infectés par *L. monocytogenes* ou *S. aureus* ($0.5 \cdot 10^6$ ou $1 \cdot 10^7$ germes/mL), comme cela a été décrit précédemment. Après 24h d'incubation, les cellules sont récupérées et soumises à quatre rinçages (5 min., PBS contenant 3,6 mM de Ca^{++} et 3 mM de Mg^{++}), en alternance avec des centrifugations (5 min., 20°C, 193 g) et des resuspensions. Les cellules sont ensuite fixées pendant 30 minutes à 4°C, au moyen d'une solution fraîchement préparée de glutaraldéhyde 2%, dilué dans 0.1 M de tampon cacodylate de sodium (pH 6.4).

Après fixation, les cellules sont lavées à trois reprises (5 min.) au moyen d'un tampon cacodylate 0.1 M (pH 7.4). Ensuite la post-fixation peut avoir lieu, par utilisation de tétra oxyde d'osmium 1 % dilué dans le tampon cacodylate (1h, dans l'obscurité). Les cellules sont alors lavées trois fois (5 min., 20 °C) au tampon cacodylate, suivi d'un lavage à l'eau bidistillée et finalement, au moyen d'un tampon d'acétate véronal (pH 7). Les cellules sont enfin colorées en bloc à l'acétate d'uranyle 0.5% (2h, dans l'obscurité, 20°C).

Les étapes suivantes consistent en quatre lavages dans le tampon d'acétate véronal (pH 7), en une immersion dans 2% d'agar (Bacto agar, Difco, Michigan, Etats-Unis), en une déshydratation à l'alcool et finalement, en un enrobage dans la résine Spur. Le contraste des structures est ensuite renforcé par l'utilisation de sels de métaux lourds (acétate d'uranyle). Des sections fines seront ultérieurement coupées et examinées à l'aide d'un microscope Philips CM12. (Ouahiri et al., 1999 ; Seral et al., 2003).

2.7. Etude de stabilité

Principe : La stabilité de l'ertapénème et du méropénème a été évaluée en solution aqueuse (eau milli-Q, milieu RPMI 1640 ou PBS \pm 10 % FCS) et à des températures distinctes (4°C, 37 °C). Après différents intervalles de temps (5h, 24h, 32h), la concentration résiduelle d'antibiotique est déterminée par HPLC. Les échantillons dilués dans le milieu contenant le sérum de veau fœtal sont soumis préalablement à des extractions liquide-liquide successives, et ceci afin de séparer le sérum de l'antibiotique. Ensuite, les mesures sont effectuées, par comparaison aux standards conservés à -80°C, au moyen du module de séparation Waters 2690 (Waters Corporation, Milford, Etats-Unis) et du logiciel Millennium 32 (Waters corporation, Milford, Etats-Unis).

Protocole : Les extractions liquide-liquide consistent en trois déprotéinisations successives, par ajout de 800 μ L d'acétonitrile (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Allemagne) aux 200 μ L d'échantillons. Il s'ensuit trois cycles de centrifugations et resuspensions (20 min., 4°C, 3095 g), le surnageant étant récupéré à chaque étape et

adjoint à 6 mL de dichlorométhane (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Allemagne). Finalement, une dernière centrifugation (20 min., 4°C, 2500 g) est effectuée, permettant la récupération d'une gouttelette de 200 µL contenant l'échantillon

Validation de la méthode : Les extractions liquide-liquide ont été réalisées sur des échantillons contenant des concentrations connues d'antibiotique. La récupération de l'agent anti-infectieux est dépendante de son pourcentage de liaison aux protéines sériques. Ainsi, les extractions liquide-liquide permettent de récupérer l'entièreté du méropénème et 82.19 % (± 0.49) d'ertapénème. Les droites d'étalonnage réalisées avec des concentrations connues de méropénème et d'ertapénème, en présence de protéines sériques, sont caractérisées par des gammes de linéarité évaluée de 200 mg/L à 6.25 mg/L ($r^2 = 0,9996$) pour le méropénème et 200 mg/L à 10 mg/L ($r^2 = 0,9861$) pour l'ertapénème..

2.8. Mesure de l'accumulation cellulaire des carbapénèmes

Les cellules sont exposées à l'antibiotique (C_e , concentration extracellulaire de l'antibiotique) à 37°C et sous 5% de CO₂. Après différents intervalles de temps, les cellules sont récupérées, lavées trois fois (PBS, 4°C) en alternance avec des centrifugations (8 min., 20°C, 327 g) et décantations. Elles sont finalement lysées (eau milli-Q, 4°C) et soumises à une sonication de 15 secondes. La concentration cellulaire d'antibiotiques (C_c), déterminée après dosage microbiologique, est systématiquement exprimée par référence au contenu de protéines cellulaires et en utilisant un facteur de conversion approprié (5µL de volume cellulaire/mg de protéines cellulaires). Cela permet la détermination d'un facteur d'accumulation (C_c/C_e) relatif à chaque échantillon.

2.9. Mesure du pourcentage de liaison de l'ertapénème et du méropénème aux protéines sériques

Principe : Afin de déterminer la fraction libre de l'antibiotique dans le milieu de culture cellulaire, nous avons employé la technique d'équilibre de dialyse. Deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable, dont le diamètre des pores est choisi de telle sorte que des molécules de taille supérieure (protéines sériques, ...) à ce diamètre ne peuvent franchir la membrane. Par contre, des molécules de taille inférieure, telle que l'agent anti-infectieux, peuvent diffuser librement au travers de la membrane. L'équilibre de dialyse est ainsi atteint lorsque la concentration d'antibiotique est identique dans les deux compartiments.

Protocole : En premier lieu, les membranes semi-perméables (limite : 6000-8000 m.w., Spectra/Por® molecularporous membrane, Spectrum Medical Industries, Houston, USA) sont soumises à trois bains successifs dans de l'eau milli-Q et ensuite, dans du PBS

(Phosphate Buffer Saline). Elles sont ensuite placées dans les demi-cellules de l'appareillage d'équilibre de dialyse (20-CELL Equilibrium Dialyzer). En absence de sérum, l'équilibre est atteint dans les deux compartiments après 32h, que ce soit à 4°C ou 37°C. Les manipulations ultérieures, où l'antibiotique entre en contact du tampon PBS additionné d'un pourcentage croissant de FCS, sont réalisées durant 32 h, à 4°C ou 37°C, et sous rotation constante (8 rpm). Après cela, les échantillons sont récupérés et la concentration d'antibiotique est mesurée.

2.10. Tests statistiques

Les tests statistiques sont effectués sur des échantillons indépendants de données quantitatives continues, par application d'un test t de Student. Le seuil de décision est fixé à 0.05 et le test est bilatéral.

Résultats

1. Activité intrinsèque de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes* et *S. aureus* : détermination de la CMI et CMB

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) permet la caractérisation, en bouillon, de l'activité intrinsèque de ces β -lactames.

Les résultats sont présentés dans le tableau R.1. et il apparaît que les CMI sont inférieures à 0.5 mg/L, que ce soit dans le TSB ou le milieu de culture cellulaire, *L. monocytogenes* et *S. aureus* peuvent donc être qualifiés de sensibles vis-à-vis des beta-lactames considérés. Vis-à-vis de *L. monocytogenes*, on notera que le méropénème est plus actif que l'ampicilline et l'ertapénème (CMI \sim 0.05 mg/L vs \sim 0.3 et 0.5 mg/L) La CMB de ces trois antibiotiques est élevée ($>$ 64 mg/L), suggérant que les β -lactames sont bactériostatiques vis-à-vis de *L. monocytogenes*.

Vis-à-vis de *S. aureus*, l'ampicilline présente une CMI deux fois plus faible que les deux pénèmes. Par ailleurs, la CMB (tableau R.1.) des β -lactames équivaut à 2x la CMI. Ces antibiotiques présentent, dès lors, une activité bactéricide vis-à-vis de ce germe.

Activité intrinsèque					
β-lactames	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923		
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMB (mg/L)
	TSB Milieu de culture cellulaire pH 7.4.	TSB	TSB pH 7.4 pH ajusté à 5.5	Milieu de culture cellulaire	TSB
ampicilline	0.32 ± 0.10 (10)	> 64 (6)	0.065 ± 0.006 (4)	0.04 ± 0.006 (4)	0.125 (6)
méropénème	0.05 ± 0.00 (4)	> 64 (6)	0.15 ± 0.005 (4)	0.09 ± 0.01 (6)	0.25 (6)
ertapénème	0.48 ± 0.03 (6)	> 64 (6)	0.11 ± 0.01 (9)	0.13 ± 0.02 (6)	0.25 (6)

Tableau R.1. Activité intrinsèque de β-lactames, envers *L. monocytogenes* et *S. aureus*. Les CMI (dilutions arithmétiques) et CMB (dilutions géométriques) sont exprimées en mg/L, le nombre de déterminations indépendantes étant indiqué entre parenthèses.

2. Activité de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes*

2.1. Activité en bouillon

2.1.1. Influence du temps sur l'activité des β -lactames

Afin de caractériser l'activité de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème envers *L. monocytogenes*, une cinétique d'activité de ces trois antibiotiques est effectuée, à une concentration équivalente au pic sérique (ou C_{max}). Ce pic correspond à la concentration maximale sérique retrouvée dans le sérum de patients après administration conventionnelle.

La détermination de la cinétique d'activité s'effectue dans un bouillon (TSB) et l'inoculum initial est de l'ordre de 10⁶ bactéries/ml. En absence d'antibiotiques, la croissance bactérienne se poursuit et atteint, après 5h et 24h, 1.43 ± 0.2 log et 2.58 ± 0.1 log (Fig.R.1.). L'ampicilline, le méropénème et l'ertapénème (C_{max}) limitent la croissance intracellulaire du germe et entraînent une réduction similaire des CFUs/mL à 24h (de l'ordre de 0.5 log).

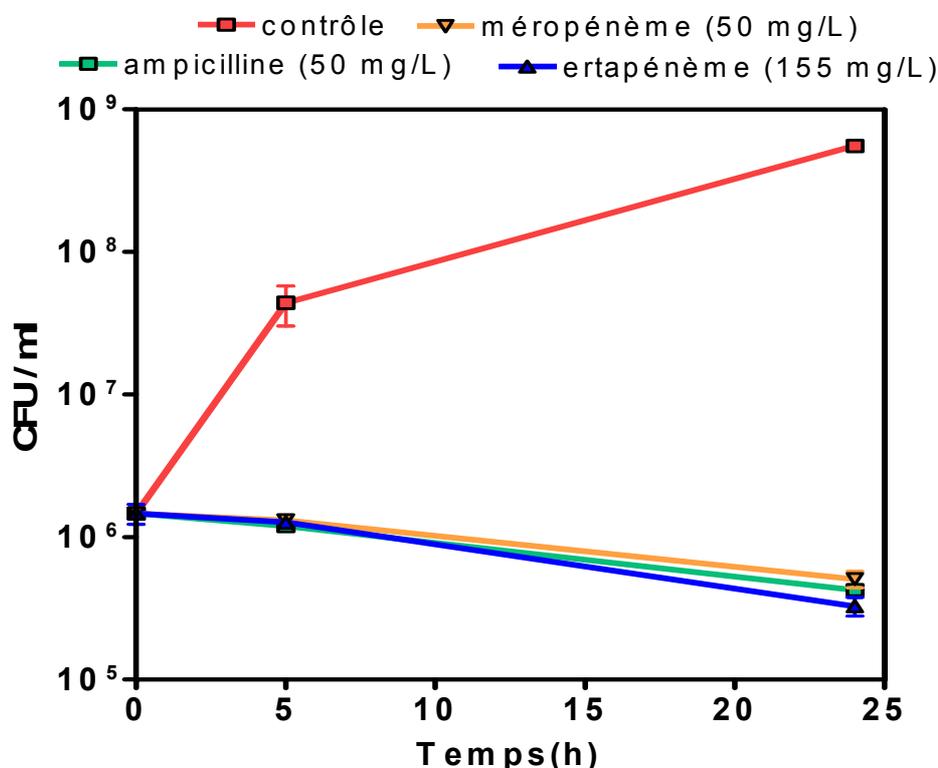


Fig. R.1. Cinétique de l'activité de β -lactames sur la croissance en bouillon de *L. monocytogenes*. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes (N=3 manipulations). Un test statistique (ANOVA) a été réalisé à 24h, et montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents antibiotiques ($p > 0.05$).

2.1.2. Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames

Après avoir caractérisé la cinétique d'activité des β -lactames, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration des antibiotiques vis-à-vis de *L. monocytogenes*.

Cette détermination est réalisée après 24h d'exposition à des concentrations variables d'antibiotiques, s'étalant de la CMI au pic sérique, et l'inoculum bactérien initial est de 10^6 bactéries/ml. Les résultats, exposés dans la figure R.2. (page 52), sont exprimés en variation logarithmique du nombre de CFU/ml en fonction du logarithme de la concentration d'antibiotique (elle-même exprimée en pourcentage de C_{max}).

On observe que l'activité des β -lactames se développe d'une façon concentration-dépendante. Un effet bactériostatique est obtenu lorsque la concentration en antibiotique atteint 10x la CMI pour le méropénème (0.5 mg/L) et l'ampicilline (3.2 mg/L) et 30x la CMI pour l'ertapénème (14.4 mg/L) . Pour des concentrations supérieures, l'activité augmente faiblement pour atteindre une réduction maximale de l'inoculum de l'ordre de 0.5 log (ampicilline, méropénème) et 1 log pour l'ertapénème.

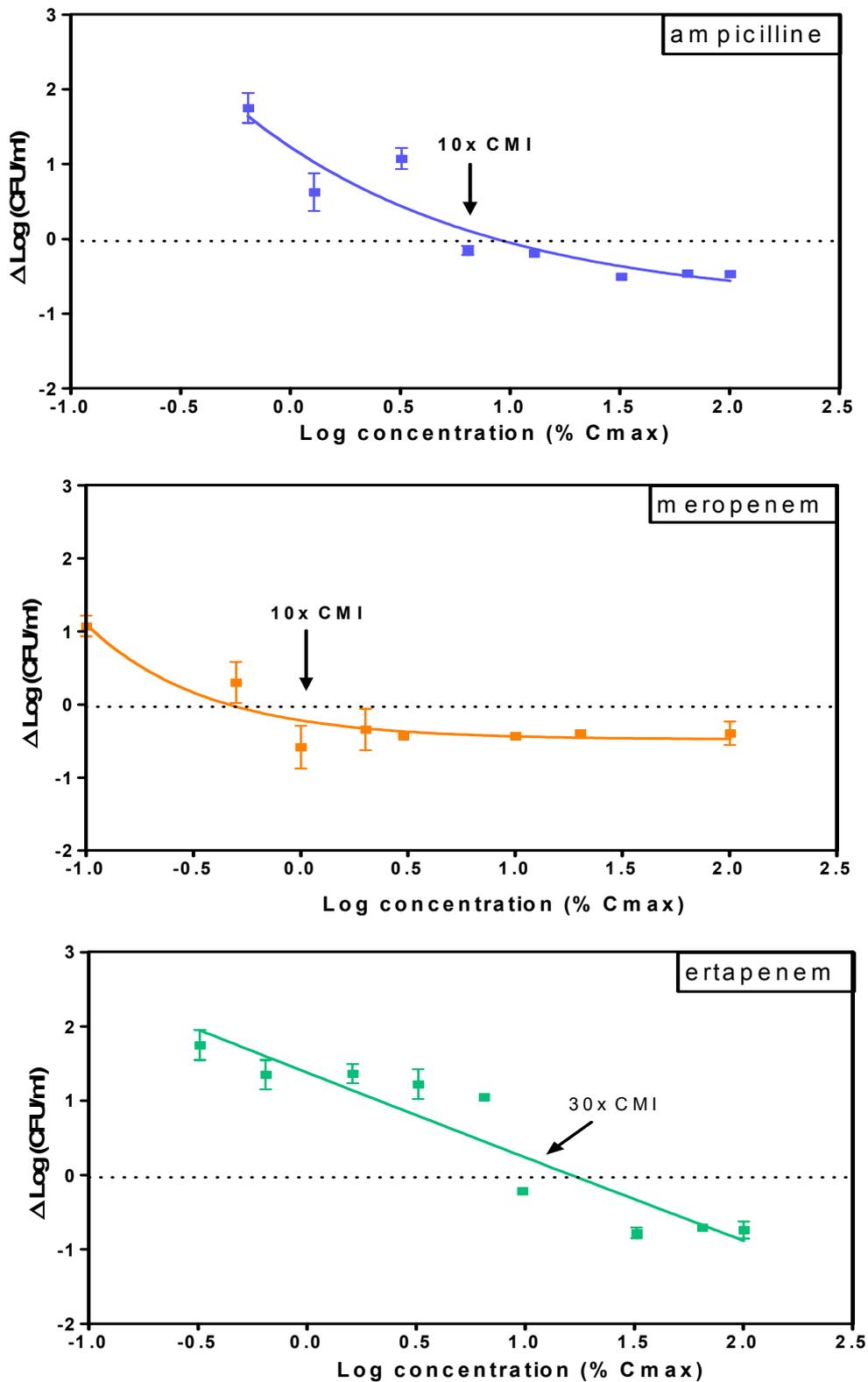


Fig. R.2. Influence de la concentration d'ampicilline, de méropénème et d'ertapénème sur la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon, après 24h d'exposition à des concentrations d'antibiotique s'étalant de la CMI à la Cmax. Les résultats correspondent à une moyenne \pm SD pour l'ampicilline et méropénème, et à une moyenne \pm SEM pour l'ertapénème (N = 2 manipulations).

2.2. Activité dans un modèle cellulaire (macrophages THP-1)

2.1.1. Influence du temps sur l'activité des β -lactames

L'activité de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème a été caractérisée dans un modèle de macrophages humains (THP-1) infectés par *L. monocytogenes*. Cette détermination est réalisée après 5h et 24h d'exposition des cellules infectées à une concentration d'antibiotique équivalente au pic sérique. Les résultats sont présentés dans la figure R.3. et montrent que la croissance des germes atteint 0.96 log (\pm 0.02) après 5 h et 2.19 log (\pm 0.06) après 24h. L'ampicilline et le méropénème sont responsables d'une réduction de la croissance bactérienne de 0.5 log (\pm 0.05) après 5h et 1.9 log (\pm 0.06) après 24h. Au contraire, l'ertapénème réduit à peine pas la croissance bactérienne, même après 24h d'exposition. On constate, en effet, une augmentation de l'inoculum intracellulaire de 0.5 log (\pm 0.02) après 5h et 1.16 log (\pm 0.08) après 24h.

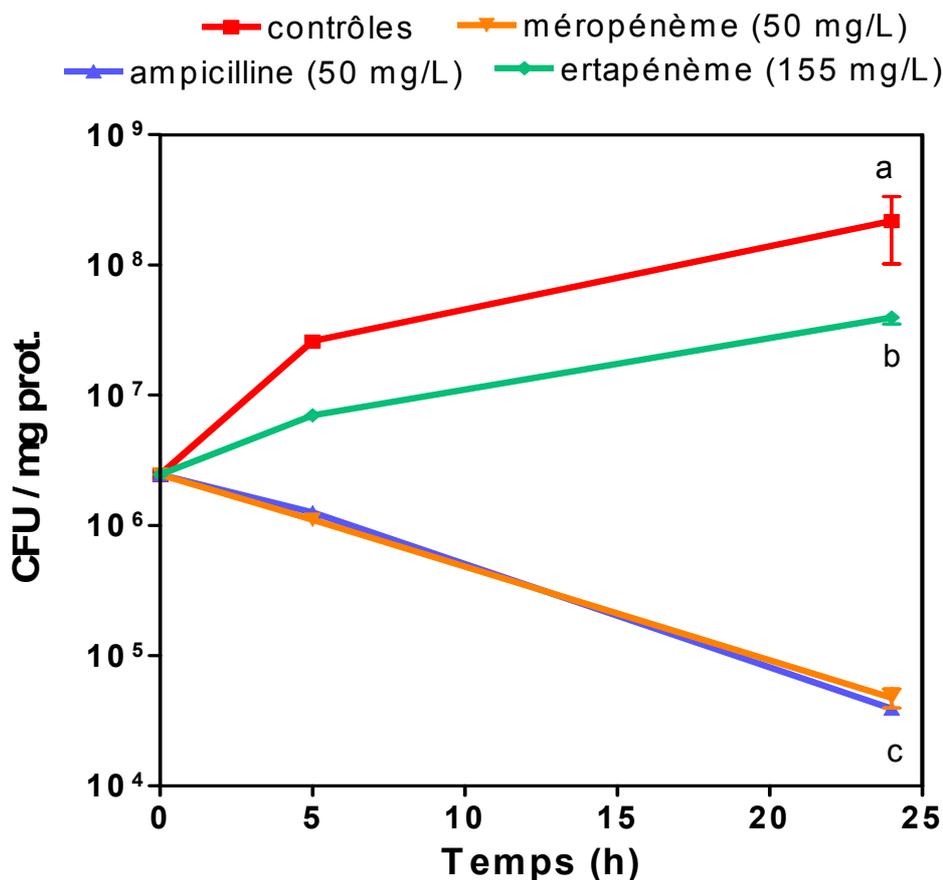


Fig. R.3. Cinétique de l'activité de β -lactames sur la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes* dans un modèle de macrophages humains infectés. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM de trois échantillons indépendants (N = 3 manipulations). Un test statistique (ANOVA) est réalisé à 24h (des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes où $p < 0.001$).

2.1.2. Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames

Après détermination de la cinétique d'activité, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration de β -lactames (méro pénème, ertapénème) sur la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes* dans un modèle cellulaire (THP-1).

Cette détermination est réalisée après 5h et 24h d'exposition à des concentrations variables d'antibiotique et les résultats sont exprimés en variation logarithmique du nombre de CFUs/ml en fonction du logarithme de la concentration d'antibiotiques (exprimée en % de Cmax).

On observe que l'activité intracellulaire du méro pénème est clairement influencée par la concentration en antibiotique en contact du germe, que ce soit à 5h ou 24h (Fig.R.4., exposée à la page suivante).

Par contre, l'ertapénème (Fig.R.4.), quelle que soit la concentration d'antibiotique employée (20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 155 mg/L) ou le temps d'exposition considéré (5h, 24h), ne prévient pas la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes*.

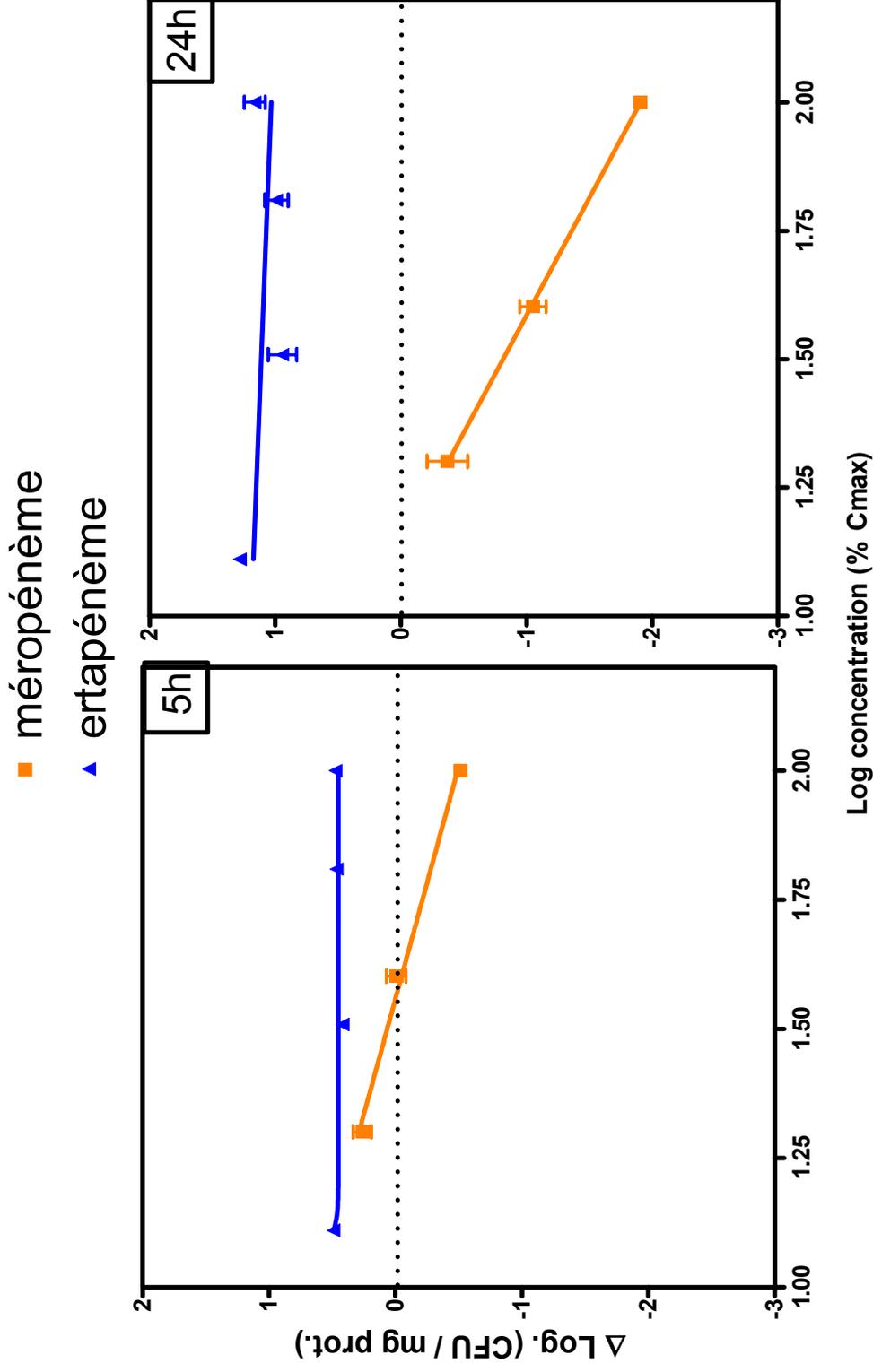


Fig.R.4. Influence de la concentration d'ertapépénème (courbes bleues) et de méropepénème (courbes oranges) sur la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes* après 5h et 24h. La ligne en pointillée correspond à une activité bactériostatique (moyennes ± SEM de trois déterminations indépendantes ; N = 2 manipulations.)

2.3. Morphologie bactérienne

2.3.1. Macrophages infectés par *L. monocytogenes*

La morphologie des germes intracellulaires a été observée au moyen d'un microscope électronique à transmission, dans un modèle d'infection cellulaire de 24h.

(a) Fig.R.5.A. : On constate que les germes sont, suivant l'incidence de coupe, sous forme de bacilles allongés et que le modèle d'infection à *L. monocytogenes* correspond bien à une infection cytosolique, les germes étant largement distribués dans le cytosol des macrophages infectés. Dans ce compartiment, les germes prolifèrent. On observe également quelques bactéries dans des vacuoles (flèche) et qui semblent s'en échapper.

(b) Fig.R.5.B. : Cette figure met en évidence des germes intravacuolaires.

(c) Fig.R.5.C. : Cette figure montre que un bacille cytosolique entouré d'une structure granulaire, correspondant à l'actine cellulaire (Ouahiri et al., 1999).

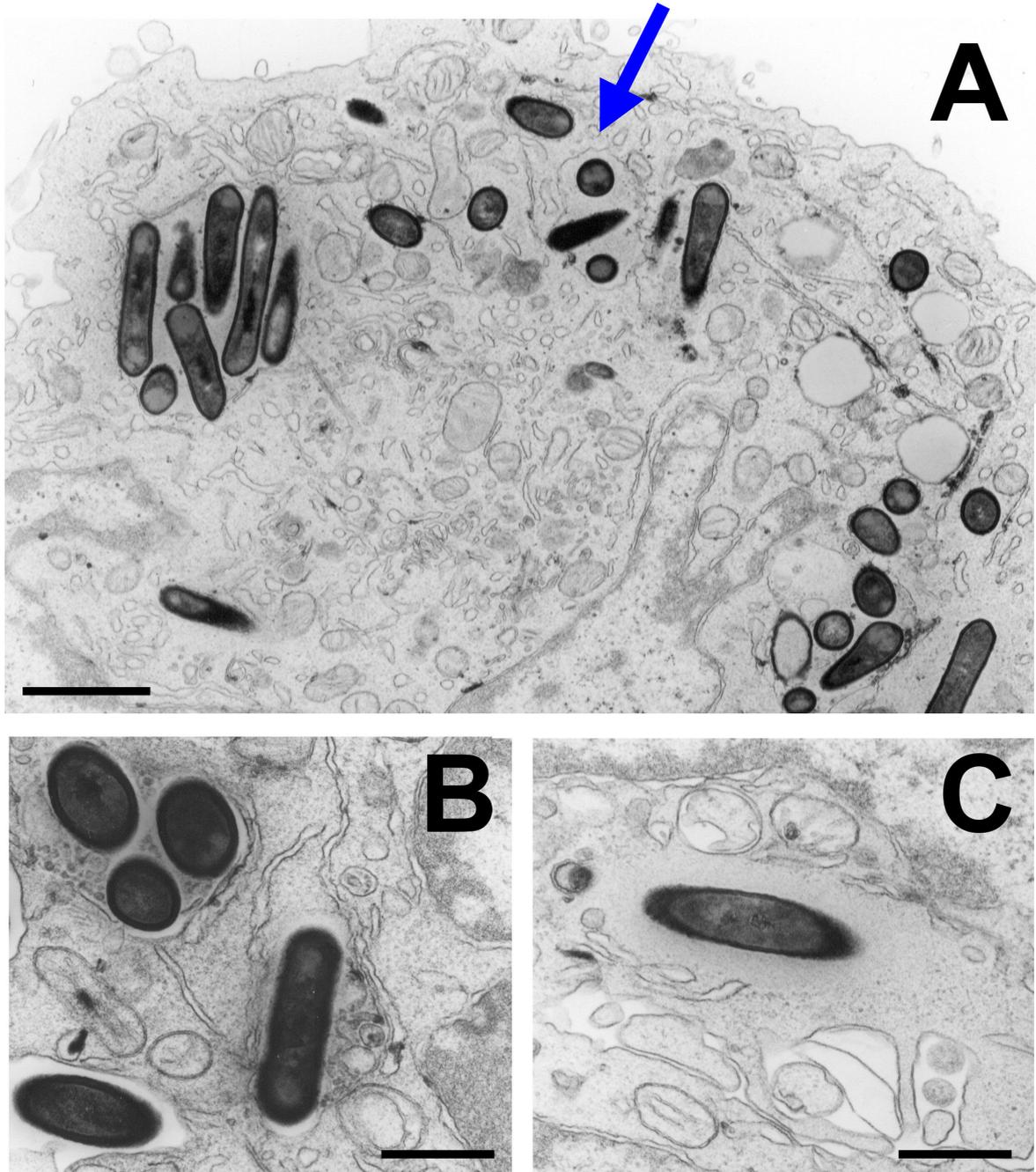
2.3.2. Macrophages infectés par *L. monocytogenes* et traités durant 24h au moyen d'ertapénème (Cmax).

Les macrophages infectés par *L. monocytogenes* et exposés, durant 24h, à une concentration d'ertapénème équivalente au pic sérique, ont été observés au moyen d'un microscope électronique à transmission.

(a) Fig.R.6.A. : On observe que la prolifération intracellulaire de *L. monocytogenes* est importante et mène à des désordres cellulaires responsables de la désorganisation de la structure cytoplasmique du macrophage. Ces données corroborent les résultats quantitatifs, révélant l'incapacité de l'antibiotique à réduire la croissance bactérienne. Cette figure montre également un germe intravacuolaire s'échappant de la vacuole et atteignant le cytosol (flèche).

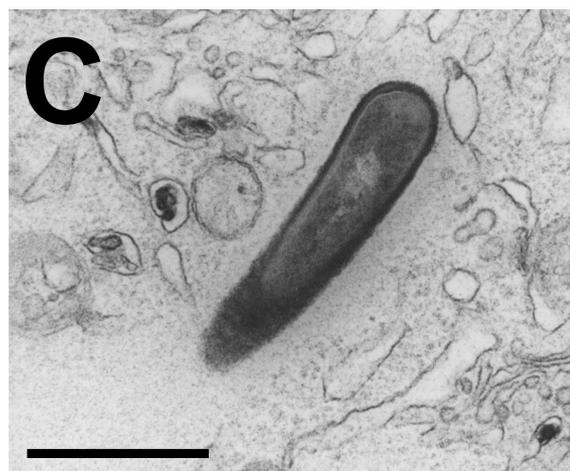
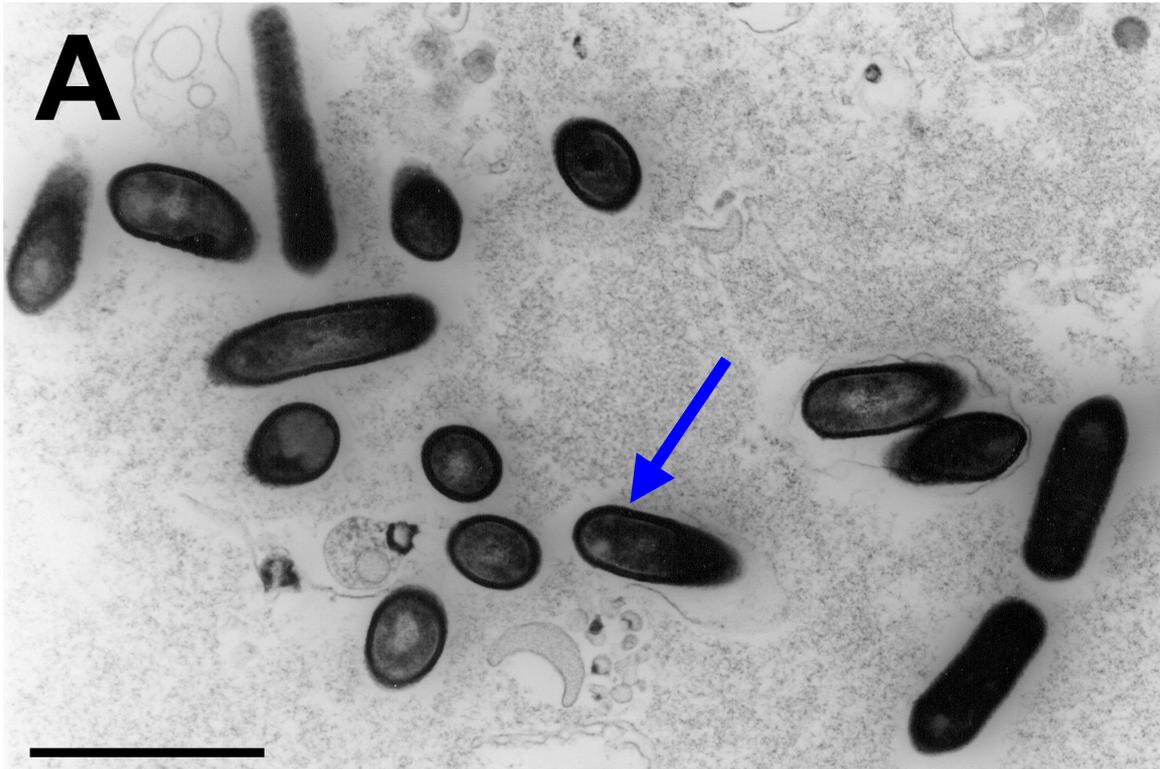
(b) Fig.R.6.B. : les germes sont localisés dans le compartiment cytosolique, où ils prolifèrent et s'entourent d'une structure granulaire correspondant à l'actine cellulaire.

(c) Fig.R.6.C. : cette figure met en évidence un bacille allongé localisé dans le compartiment cytosolique et entouré d'une structure granulaire correspondant à l'actine cellulaire.



barres: 1 μm (A); 0.5 μm (B,C)

Fig. R.5. Microscopie électronique de macrophages humains THP-1 infectés par *L. monocytogenes* et fixés après 24h.



barres: 1 μm (A); 0.5 μm (B,C)

Fig.R.6. Microscopie électronique de macrophages humains (THP-1) infectés par *L. monocytogenes* et exposés, durant 24h, à une concentration d'ertapénème équivalente au pic sérique.

3. Activités de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème vis-à-vis de *S. aureus*

3.1. Activité en bouillon

3.1.1. Influence du temps sur l'activité des β -lactames

La caractérisation de l'activité de β -lactames, à une concentration équivalente au Cmax, a été évaluée en fonction du temps vis-à-vis de *S. aureus*. Les résultats sont présentés dans la figure R.8. et montrent que la croissance bactérienne, en absence d'antibiotiques, se poursuit et atteint un accroissement de 1.5 log (± 0.05) après 5h et 2.11 log (± 0.06) après 24h. L'ampicilline, le méropénème et l'ertapénème (Fig. R.7.), contrairement au modèle d'infection extracellulaire à *L. monocytogenes*, montrent une importante activité bactéricide, puisque la réduction du nombre de bactéries viables par mL est de l'ordre de 3 log. après 5h et 5 log. après 24h.

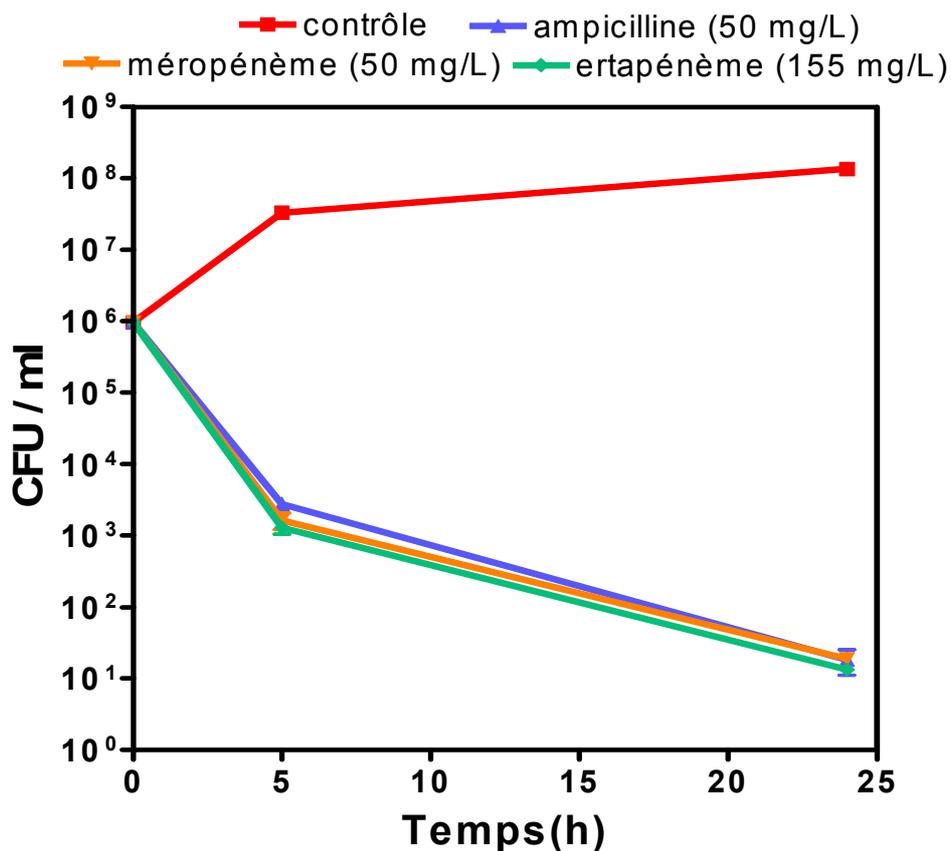


Fig.R.7. Cinétique d'activité de β -lactames (Cmax) vis-à-vis de *S. aureus* en bouillon. Les valeurs correspondent à des moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes (n=3). Un test statistique (ANOVA) a été réalisé à 24h et montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les antibiotiques ($p > 0.05$).

3.1.2. Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames

Après détermination de la cinétique d'activité vis-à-vis de *S. aureus*, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration de β -lactames sur la croissance en bouillon de *S. aureus*. Cette détermination est réalisée après 24h d'exposition à des concentrations d'antibiotiques s'étalant de la CMI au Cmax. Les résultats (Fig. R.8. , page 61) sont exprimés en variation logarithmique du nombre de CFU/ml en fonction du logarithme de la concentration d'antibiotique (exprimée en % de Cmax).

L'ampicilline, le méropénème et l'ertapénème sont caractérisés par des courbes de bactéricidie similaires, c'est-à-dire qu'ils exercent leur activité bactéricide à partir de concentrations équivalentes à 5x leur CMI (ampicilline : 0,32 mg/L ; méropénème : 0.75 mg/L ; ertapénème : 0.55 mg/L) entraînant une réduction de la croissance bactérienne de l'ordre de 3 log. On observe également que l'effet bactéricide s'accroît en fonction de la concentration d'antibiotique et atteint de l'ordre de 5 log. pour des concentrations d'antibiotiques équivalentes au Cmax.

3.1.3. Influence du pH sur l'activité des β -lactames

Nous avons ensuite réalisé ce même type d'expérience mais dans un bouillon ajusté à pH 5 de façon à mimer les conditions du pH phagolysosomal (compartiment où séjourne *S. aureus* intracellulaire).

Cette détermination est réalisée vis-à-vis de *S. aureus* exposés durant 24h aux antibiotiques et les résultats sont exposés dans la figure R.9. (page 62).

On constate que l'activité des β -lactames est bactéricide à partir de concentration d'antibiotique faible (ampicilline : 0,32 mg/L ; méropénème : 0.75 mg/L ; ertapénème : 0.55 mg/L), pareillement aux expériences réalisées précédemment dans un bouillon à pH 7.4. L'effet bactéricide est accru en fonction de la concentration d'antibiotique et atteint ~ 5 log. Globalement, l'activité des β -lactames n'est pas modifiée à pH acide.

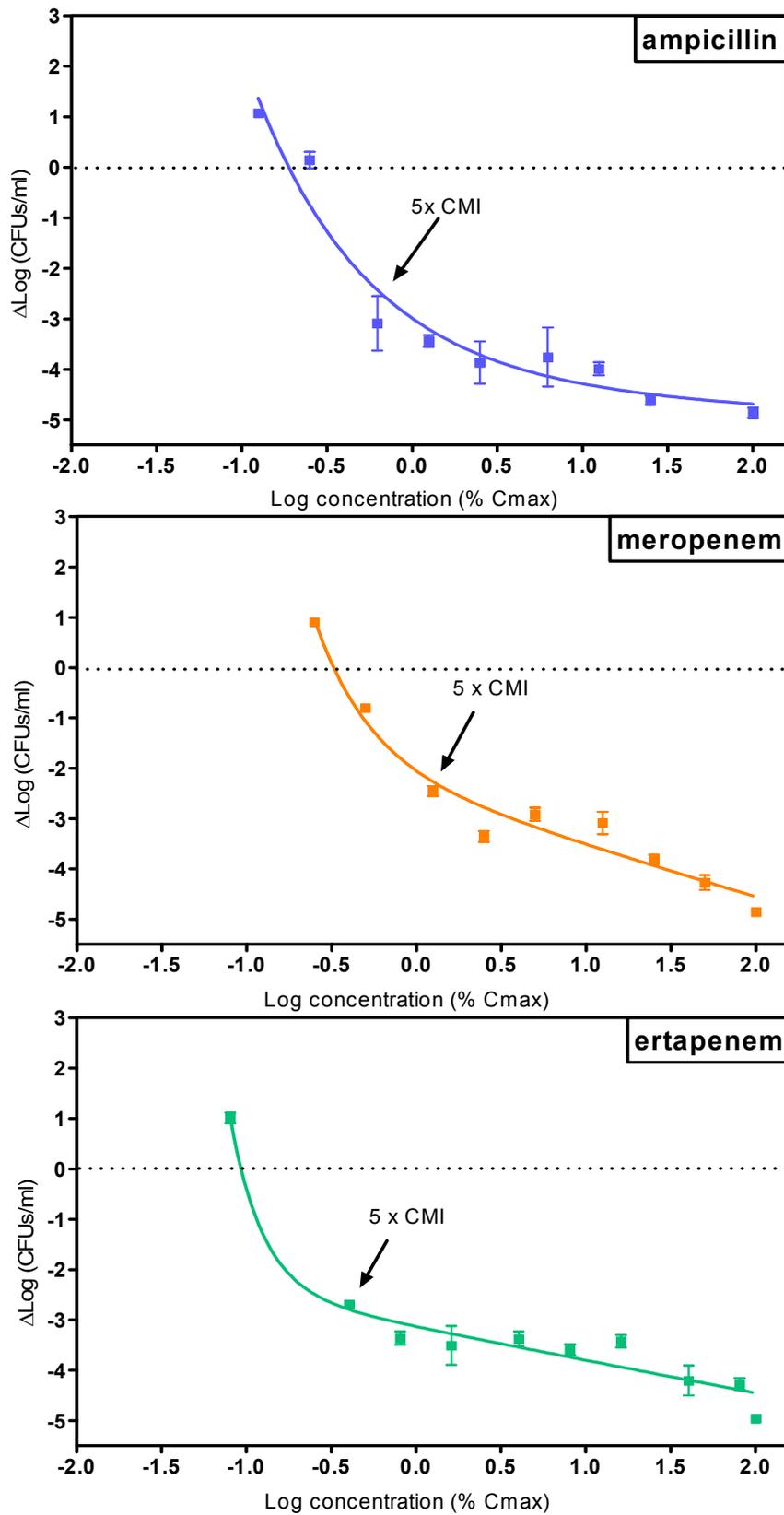


Fig. R.8. Activité de l'ampicilline, du méropénème et de l'ertapénème, à des concentrations s'étalant de la CMI au pic sérique, envers *S. aureus* en bouillon, après exposition prolongée à 37°C. Les résultats sont des moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes (n=2).

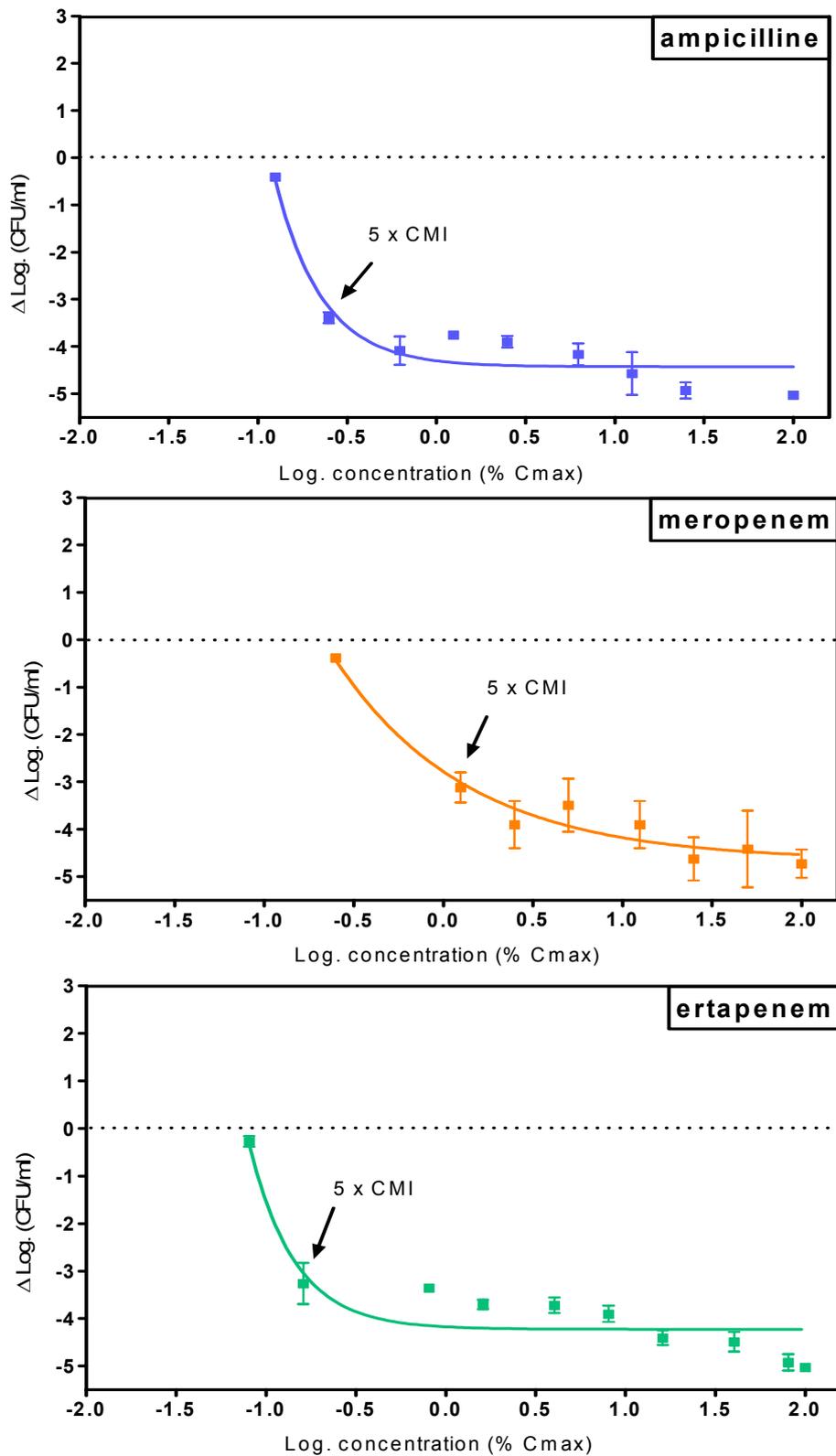


Fig. R.9. Influence de la concentration d'ampicilline, de méropénème et d'ertapénème, à des concentrations s'étalant de la CMI au pic sérique, après exposition prolongée vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*, dans des conditions mimant le pH phagolysosomal (pH 5.5). Les résultats sont une moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes.

3.2. Activité dans un modèle cellulaire (macrophages THP-1)

3.2.1. Influence du temps sur l'activité des β -lactames

La cinétique d'activité intracellulaire des β -lactames (C_{max}) a été évaluée dans un modèle de macrophages humains infectés par *S. aureus* (Fig.R.10). On constate qu'en absence d'antibiotique (contrôles), la croissance bactérienne se poursuit et elle atteint $0.28 \log (\pm 0.04)$ après 5h et $0.74 \log (\pm 0,1)$ après 24h. Cette croissance bactérienne se révèle inférieure à celle rencontrée dans un modèle d'infection intracellulaire à *L. monocytogenes*. Les β -lactames montrent une réduction de la croissance bactérienne de l'ordre de 1 log après 24h (Fig.R.10). Cette activité bactéricide est observée également avec l'ertapénème, ce qui contraste dès lors avec le modèle d'infection à *L. monocytogenes* où cet antibiotique se montrait inactif.

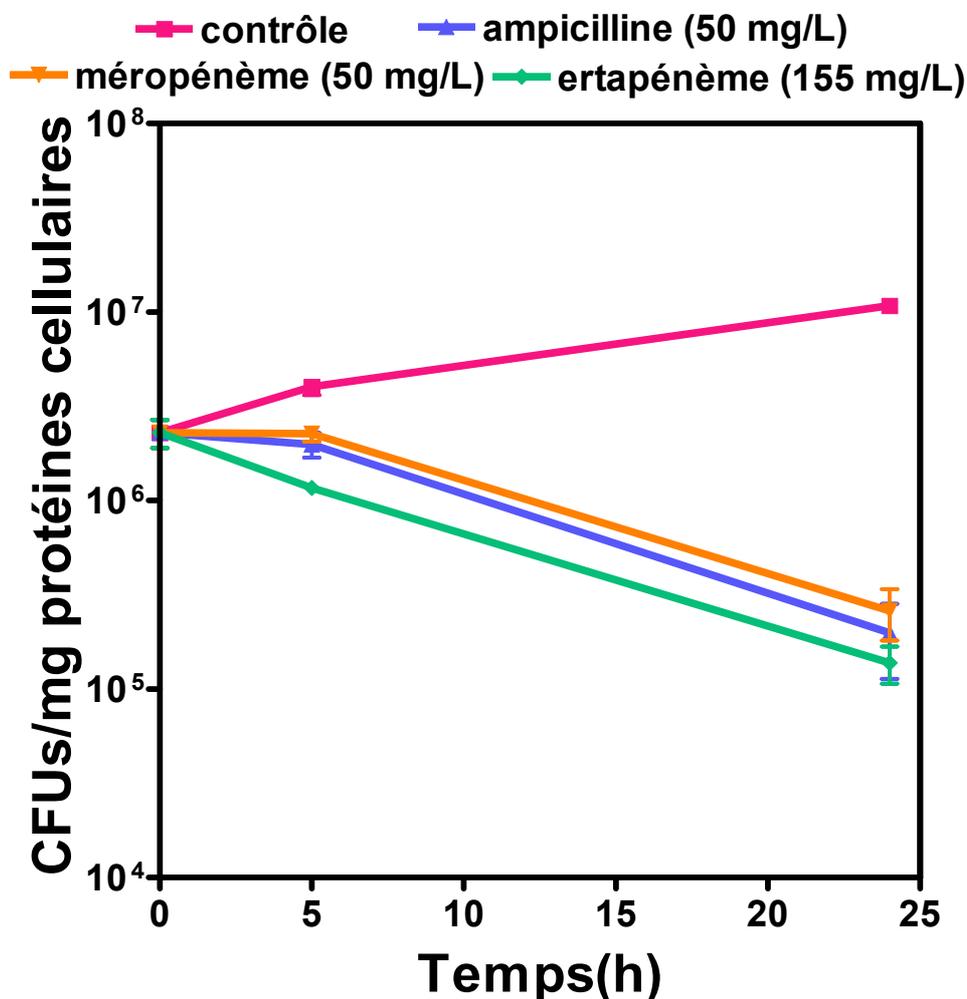


Fig. R.10. Cinétique d'activité de β -lactames (C_{max}) dans un modèle de macrophages humains infectés par *S. aureus*. Les valeurs correspondent à des moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n=2$). Les erreurs correspondantes sont représentées mais elles sont, dans la plupart des cas, de taille inférieure aux symboles. Les tests statistiques (ANOVA) ont été effectués à 24 h et ne montrent pas de différences significatives des antibiotiques ($p > 0.05$).

3.2.2. Influence de la concentration sur l'activité des β -lactames

Après détermination de la cinétique d'activité de β -lactames vis-à-vis de *S. aureus* intracellulaire, nous avons considéré l'influence de la concentration de β -lactames (ertapénème, méropénème) sur leur activité intracellulaire après 24h d'exposition.

On constate que l'ertapénème et le méropénème (Fig.R.11.) présente une activité bactériostatique lorsque leur concentration extracellulaire équivaut à 0.65 mg/L pour l'ertapénème et 0.45 mg/L pour le méropénème, soit 5x leur CMI.

Pour des concentrations supérieures, s'étalant de 5x la CMI jusqu'au pic sérique, l'ertapénème réduit de l'ordre de 1 log l'inoculum bactérien, sans effet de la concentration. Par contre, l'activité du méropénème augmente progressivement pour atteindre également une réduction de 1 log à des concentrations extracellulaires proches du pic sérique.

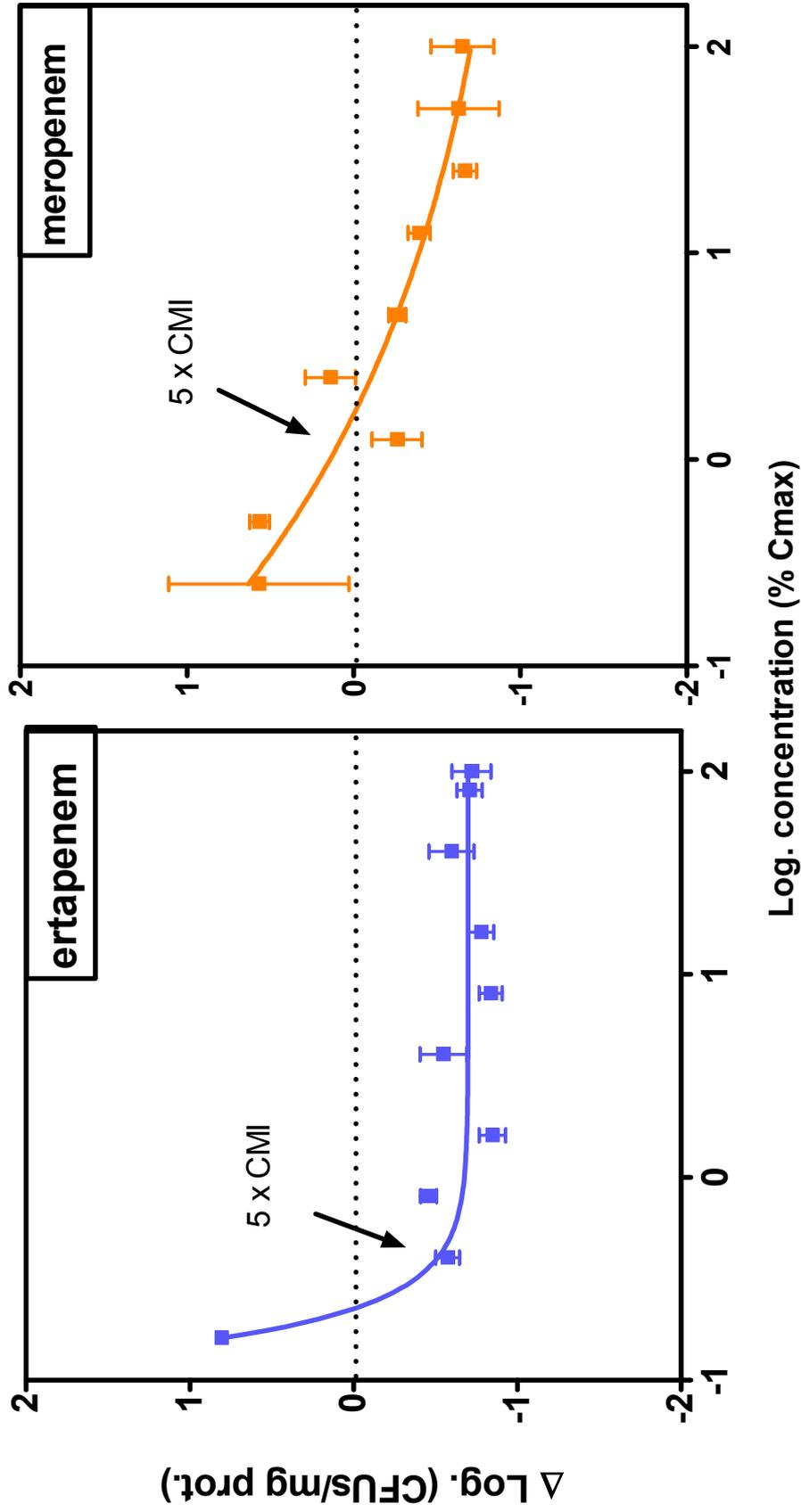


Fig.R.11. Influence de la concentration d'ertapénème et de méropénème sur la croissance intracellulaire de *S. aureus* après 24h d'exposition à l'antibiotique. Les résultats correspondent à une moyenne \pm S.D. de trois déterminations indépendantes.

3.3. Morphologie bactérienne

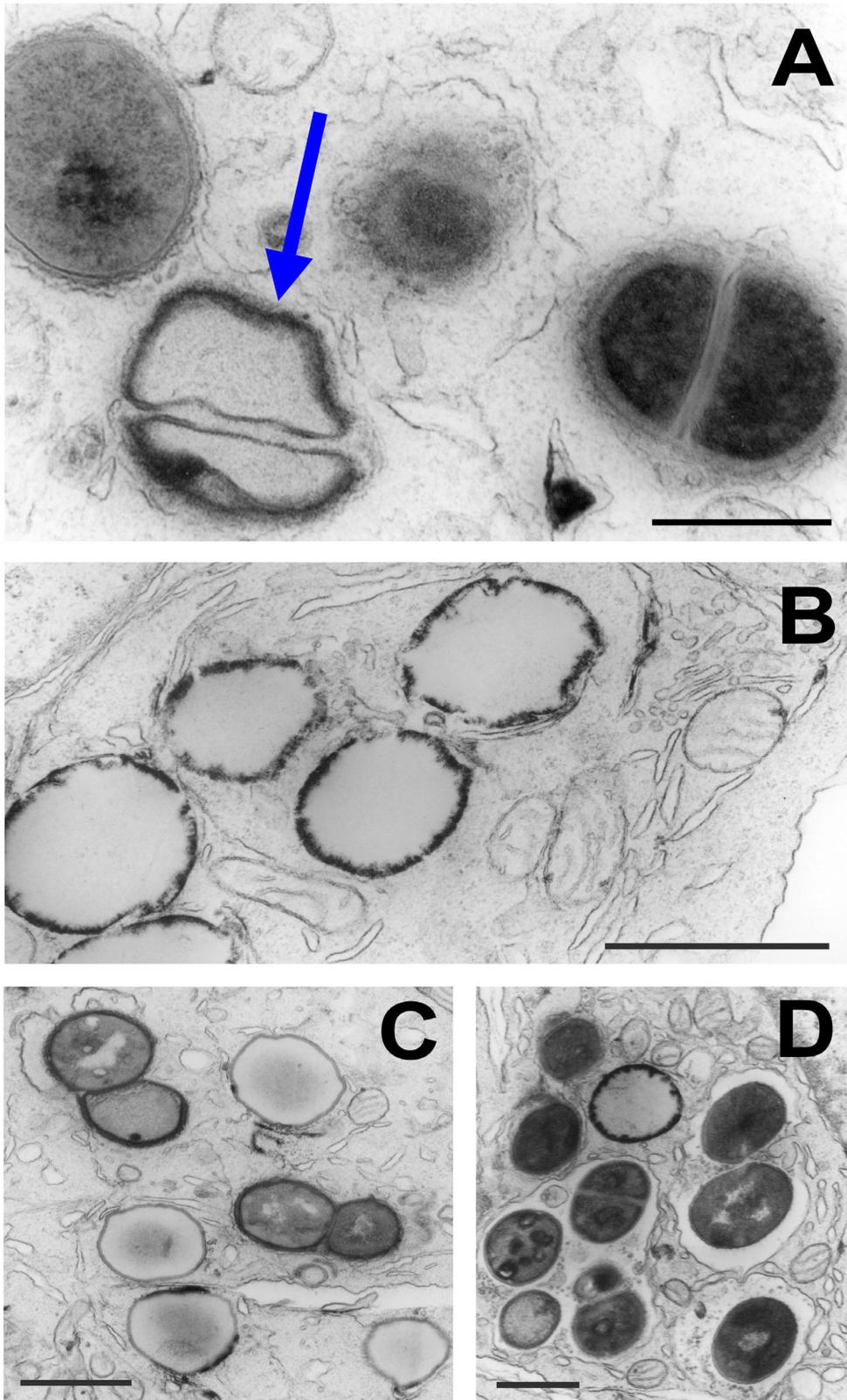
Des études de morphologie bactérienne ont été réalisées sur des macrophages THP-1 infectés par *S. aureus* et exposés, durant 24h, à une concentration d'ertapénème équivalente au pic sérique.

(a) Fig.R.12.A. : Cette figure montre que les germes sont sous forme de coques et que le modèle d'infection cellulaire employé correspond à une infection staphylococcique phagolysosomiale. Dans ce compartiment vacuolaire, le germe peut se multiplier.

On observe également deux bactéries lysées (indiquées par une flèche). Ces germes ne semblent pas, par contre, être entourés d'une membrane vacuolaire mais libres dans le cytosol.

(b) Fig.R.12.B et Fig.R.12.C. Ces micrographies électroniques mettent en évidence, dans le compartiment cytosolique, de nombreux germes dont la morphologie est altérée, avec un dépôt plus dense d'agents de contraste à la périphérie et un centre opaque mais non contrasté.

(c) Fig.R.12.D. Cette micrographie montre que (i) certaines bactéries apparaissent normales et confinées dans des vacuoles, (ii) d'autres présentent un contenu inhomogène, et (iii) d'autres, enfin, apparemment cytosolique, présentent un aspect similaire à celui observé au panneau B.



barres: 0.5 μm (A); 1 μm (B,C,D)

Fig.R.12. Microscopie électronique de macrophages infectés par *S. aureus* et fixés après 24 h d'exposition à l'ertapénème (Cmax).

4. Etudes mécanistiques visant à expliquer les divergences d'activité de l'ertapénème dans les deux modèles cellulaires ?

Pour tenter d'expliquer la divergence d'activité de l'ertapénème dans les deux modèles d'infection considérés, nous avons étudié la capacité de l'ertapénème (i) à se concentrer dans les cellules, (ii) à demeurer stable dans les conditions expérimentales et finalement, (iii) à se lier aux protéines sériques.

4.1. La concentration cellulaire d'antibiotique excède-t-elle la CMI ?

Les β -lactames sont des antibiotiques temps-dépendants, c'est-à-dire que leur principal facteur d'efficacité est le temps au-delà duquel la concentration d'antibiotique excède la CMI. Pour être efficace vis-à-vis d'un germe intracellulaire, il est nécessaire que la concentration cellulaire d'antibiotique excède, durant un intervalle de temps prolongé, la CMI du germe considéré.

Nous avons donc déterminé la concentration cellulaire d'ertapénème dans le modèle de macrophage considéré. Cette concentration atteint 66.6 mg/L et 27.9 mg/L après 5h et 24h d'exposition à l'antibiotique (cellules non infectées). Dans des cellules infectées par *L. monocytogenes*, ces valeurs atteignent 83.1 et 37.1 mg/L et elles restent donc suffisantes pour être actives.

Sur base de ces valeurs de concentration cellulaire, nous avons calculé le rapport C_c/C_e (rapport de la concentration cellulaire sur la concentration extracellulaire). Les résultats sont présentés dans le tableau R.2. et il apparaît que le rapport C_c/C_e de l'ertapénème, après exposition à une concentration extracellulaire équivalente au pic sérique, est inférieur à 1, que ce soit dans le modèle de macrophages infectés ou non infectés. De plus, ce rapport décroît en fonction du temps. L'accumulation des β -lactames est donc faible dans ce modèle cellulaire et les taux cellulaires s'avèrent donc suffisants grâce aux concentrations extracellulaires (correspondant aux C_{max}) élevées.

Ertapénème (C _{max})	Cellules infectées par <i>L. monocytogenes</i>		Cellules non infectées	
	Concentration cellulaire (mg/L)	Cc/Ce	Concentration cellulaire (mg/L)	Cc/Ce
	5h d'exposition	83.1 (±7,2)	0.54 (± 0.05)	66.6 (±0.22)
24 h d'exposition	37.1 (±12)	0.24 (± 0.08)	27.9 (±7.9)	0.18 (± 0.06)

Tableau R.2. Rapport Cc/Ce et concentration cellulaire de l'ertapénème, à partir d'une concentration extracellulaire de 155 mg/L, dans un modèle de macrophages humains infectés ou non infectés par *L. monocytogenes*.

Nous avons également réalisé ce même type d'expérience avec le méropénème (Ce équivalant au pic sérique) mais faute d'un dosage microbiologique suffisamment sensible (limite de détection : 1 mg/L), nous ne sommes pas parvenus à déterminer le rapport Cc/Ce. Toutefois, en déterminant la quantité de protéines contenues dans les lysats cellulaires exposés à 50 mg/L de méropénème durant 5h, nous avons estimé que la concentration cellulaire en méropénème devrait être inférieure à la limite de détection du dosage microbiologique employé, c'est-à-dire inférieure à 68 mg/L de volume cellulaire. Cela correspond à un facteur d'accumulation < à 1.37.

4.2. Les β-lactames sont-elles instables ?

Les travaux de Viaene et al. (2002) ont montré que les β-lactames sont des antibiotiques intrinsèquement instables en milieu aqueux, particulièrement lorsque l'antibiotique est maintenu à des températures trop élevées (37°C). La stabilité de l'ertapénème et du méropénème (C_{max}) a donc été évaluée en solution aqueuse (eau Milli-Q, RPMI 1640 ou PBS ± 10 % FCS) en fonction des conditions expérimentales.

4.2.1. Etude de stabilité en solution aqueuse

4.2.1.1. Stabilité dans l'eau milli-Q

La stabilité de l'ertapénème et du méropénème a été déterminée dans de l'eau Milli-Q. Cette mesure est réalisée après différents intervalles de temps (5h, 24h), à différentes températures (4°C, 37°C) et à une concentration équivalente au pic sérique (Fig.R.13. et Fig.R.14.). Il apparaît que ces deux pénèmes sont stables à 4°C, quelle que soit le temps d'incubation considéré (5h, 24h). A 37°C, on observe que ces pénèmes sont stables endéans 5h d'incubation alors qu'à 24h, leur concentration résiduelle devient inférieure à 90 % de la concentration initiale (ertapénème : 87.25 % ± 0.29 ; méropénème : 76.97 % ± 1.55).

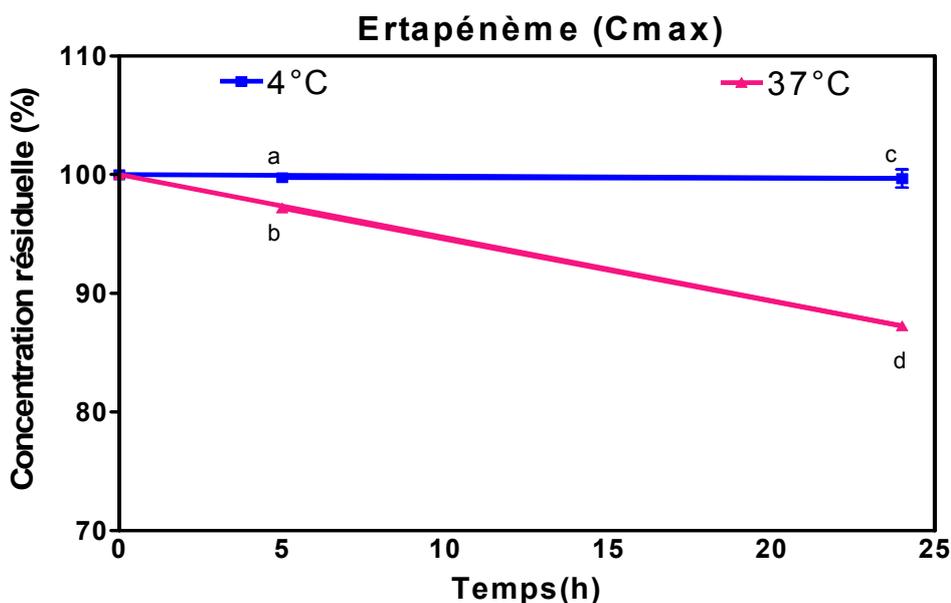


Fig. R.13. Etude de stabilité de l'ertapénème (155 mg/L) dans l'eau Milli-Q, à deux températures distinctes (4°C, 37°C). Chaque valeur correspond à la moyenne \pm SEM de trois déterminations indépendantes (N = 3 manipulations), les erreurs correspondantes étant, dans la plupart des cas, inférieures aux symboles. Des tests statistiques (ANOVA) ont été effectués aux différents intervalles de temps et des lettres différentes représentent une différence statistiquement significatives de la stabilité de l'antibiotique ($p < 0.05$).

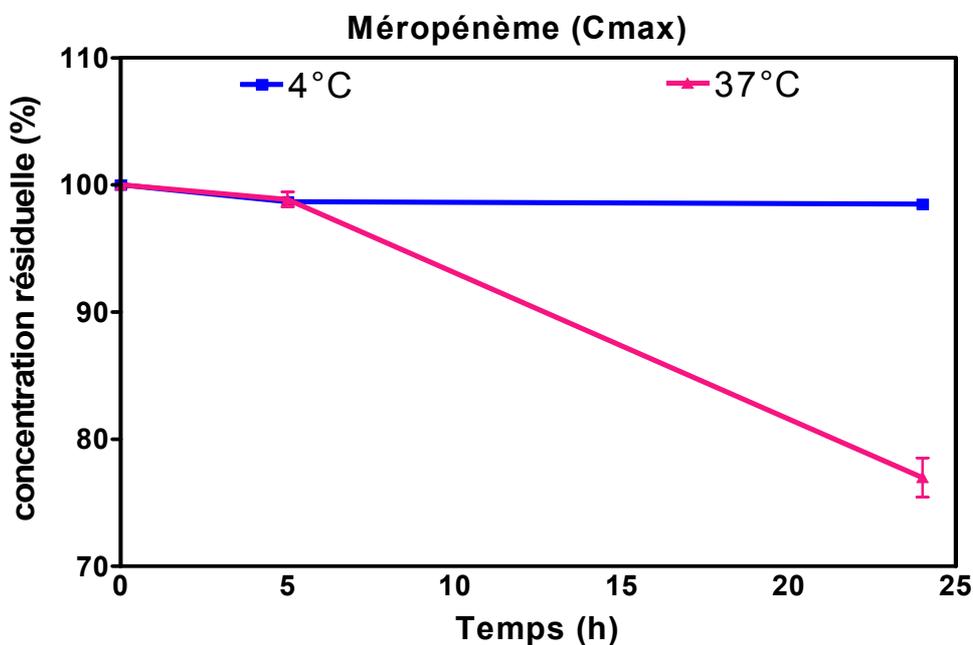


Fig. R.14. Etude de stabilité de l'ertapénème (155 mg/L) dans l'eau Milli-Q, à deux températures distinctes (4°C, 37°C). Chaque valeur correspond à la moyenne \pm SEM de trois déterminations indépendantes (N = 2 manipulations), les erreurs correspondantes étant, dans la plupart des cas, inférieures aux symboles. Des tests statistiques ont été effectués à 24h et on observe une différence significative de stabilité de l'antibiotique ($p < 0.05$).

La stabilité de l'ertapénème et du méropénème a également été déterminée dans l'eau milli-Q à pH 5.5 (pH mimant les conditions phagolysosomiales où *S. aureus* survit). Cette détermination est réalisée dans les conditions d'expérimentation de l'activité en bouillon des deux pénèmes (après incubation de 24h à 37°C et à pH de 5.5). Les résultats sont présentés dans la figure R.15. et montrent que les deux antibiotiques sont plus dégradés à pH 5.5. Dans les conditions mimant le pH phagolysosomal, la concentration résiduelle des β -lactames atteint, après 24h d'incubation, 57.95 % (\pm 2.72) pour l'ertapénème et 50.61 % (\pm 0.95) pour le méropénème.

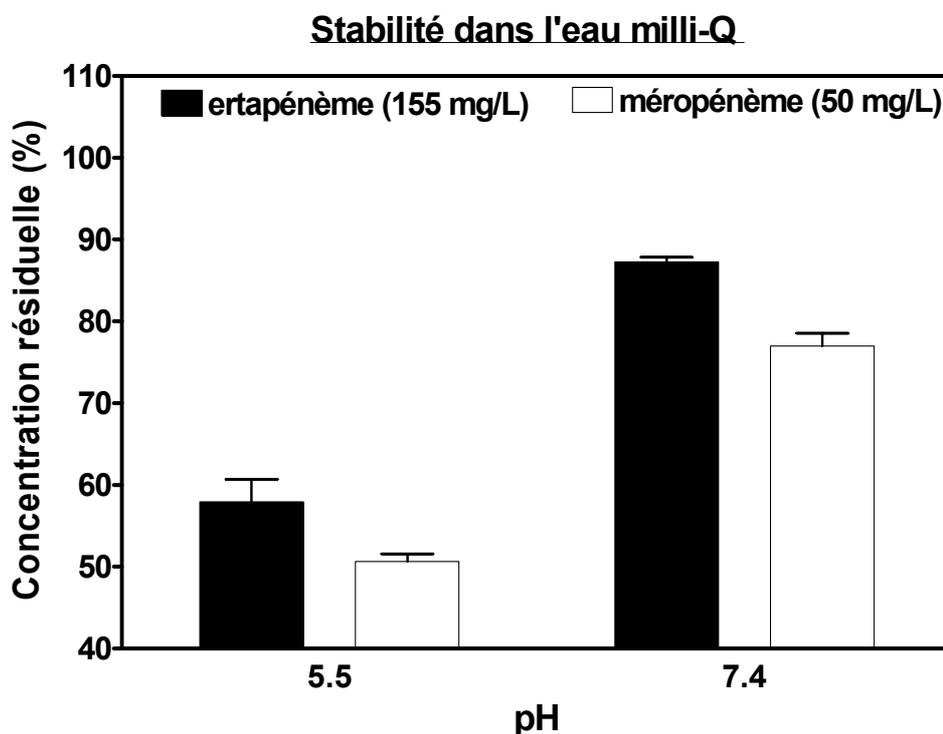


Fig. R.15. Etude de stabilité de l'ertapénème (155 mg/L) et du méropénème dans l'eau Milli-Q, à pH 7.4. et ajusté à pH 5.5 (le pH ayant été vérifié à la fin de l'incubation), après 24h d'incubation à 37°C. (pH 5.5. : moyenne \pm S.D. ; pH 7.4. : moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes).

4.2.1.2. Stabilité dans le milieu RPMI \pm 10 % de sérum foetal

La stabilité de l'ertapénème et du méropénème a été déterminée dans le milieu de culture cellulaire \pm 10% de sérum foetal. Cette détermination est réalisée dans les conditions de détermination de l'activité intrinsèque (24h d'incubation, 37°C), de l'activité intracellulaire (5h/24h d'incubation, 37°C) et du facteur Cc/Ce (5h/24h d'incubation, 37°C). Les résultats, présentés dans les figures R.16., montrent que, dans le milieu de culture cellulaire sans sérum, les antibiotiques sont largement dégradés après 24h d'incubation, les

concentrations résiduelles étant respectivement, de 48.55 % (± 1.19) pour l'ertapénème et 51.66 % (± 0.43) pour le méropénème. Dans le milieu de culture cellulaire enrichi de 10% de sérum foetal (Fig.R.17.), on observe une dégradation similaire du méropénème après 24h d'incubation alors que l'ertapénème est plus stable en présence de sérum, sa concentration résiduelle atteignant 62.66 % ($\pm 0,85$) après 24h d'incubation.

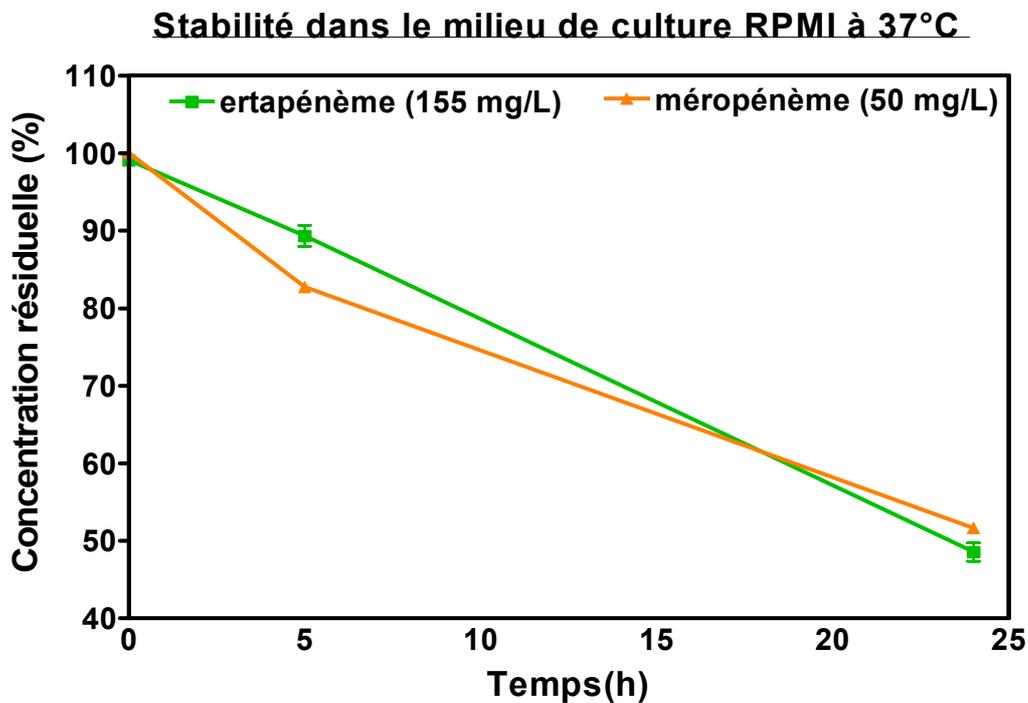


Fig. R.16. Stabilité de l'ertapénème et du méropénème (C_{max}) dans le milieu de culture cellulaire, à 37°C. (Moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n=2$), les erreurs correspondantes étant souvent de taille inférieure aux symboles).

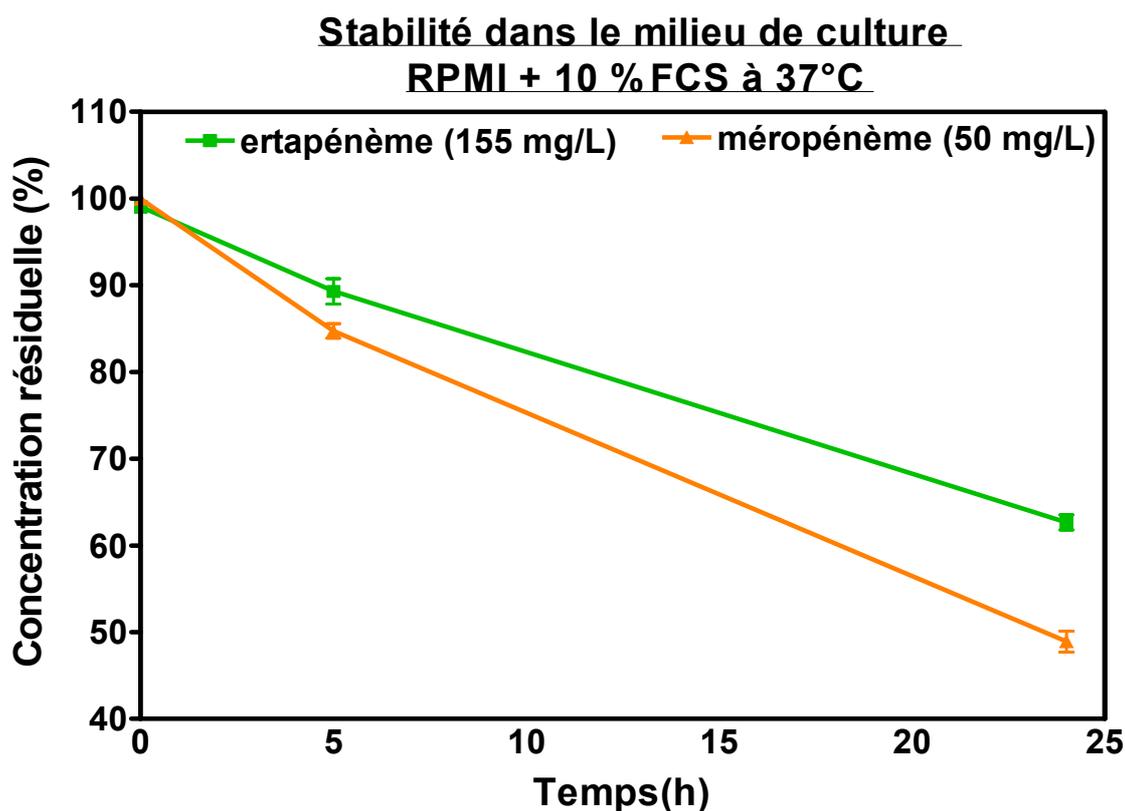


Fig. R.17. Stabilité de l'ertapénème et du méropénème (C_{max}) dans le milieu de culture cellulaire additionné de 10 % de FCS, à 37°C. (moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes (n=2manipulations)).

4.2.1.3. Stabilité dans le PBS doté de 10 % de sérum foetal

La stabilité de l'ertapénème et du méropénème a également été déterminée dans les conditions expérimentales de l'équilibre de dialyse (voir plus loin), c'est-à-dire après 32h d'incubation à 4°C ou 37°C. Pour ces expériences, les antibiotiques sont en contact avec du tampon PBS additionné de 10% de sérum de veau.

Les résultats sont présentés dans la figure R.18. et montrent, qu'à 4°C, les antibiotiques ne se dégradent pas. Par contre, à 37°C, on observe que la concentration résiduelle en antibiotique est de 60,38 % (± 5,98) pour l'ertapénème et 62.39 % (± 3.62).

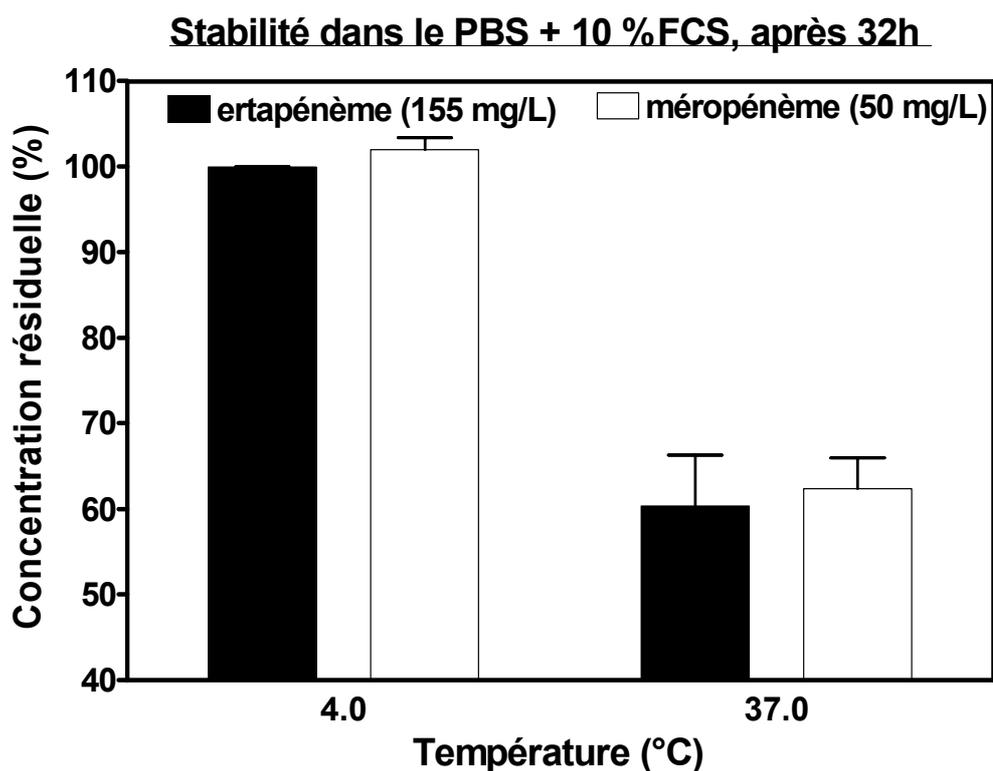


Fig.R.18. Stabilité de l'ertapénème et du méropénème (Cmax) dans le PBS enrichi de 10 % de FCS, à 37°C (moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes).

4.2.2. Les produits de dégradation jouent-ils un rôle dans l'activité vis-à-vis de *L. monocytogenes* ou *S. aureus* ?

Sur base des résultats observés dans les études de stabilité, nous nous sommes demandés si la dégradation partielle de l'ertapénème n'affectait pas son activité vis-à-vis de *S. aureus* et de *L. monocytogenes*. Nous avons donc déterminé l'activité intrinsèque de cet antibiotique (CMI) dans le milieu de culture cellulaire enrichi de 10 % de sérum mais en utilisant de l'ertapénème préalablement dégradé. Pour ce faire, l'ertapénème a été dilué dans le milieu de culture cellulaire (enrichi de 10 % de sérum) et soumis à une pré-incubation de 24h à 37°C. Après cela, il a été mis en contact avec les germes afin de déterminer la CMI.

Les résultats sont exposés dans le tableau R.3. et révèlent que les CMI sont relativement élevées (*L. monocytogenes* : ... mg/L ; *S. aureus* : 8 mg/L), suggérant que les produits de dégradation de l'ertapénème induit une perte d'activité.

Ertapénème	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Solution fraîchement préparée		0.25 mg/L (4)
Solution pré-incubée durant 24h à 37°C, dans le milieu de culture cellulaire		8 mg/L (8)

Tableau R.3. Activité intrinsèque de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes* et *S. aureus*.

4.3. La liaison de l'antibiotique au sérum exerce-t-elle une influence sur l'activité ?

4.3.1. Détermination de la fraction libre d'ertapénème et de méropénème

Seule la fraction libre d'un antibiotique est susceptible d'exercer son activité vis-à-vis des germes pathogènes. Sachant que l'ertapénème est fortement lié aux protéines sériques chez l'homme (Majumdar et al.,2002) Nous avons voulu évaluer la fraction libre d'ertapénème (155 mg/L), en comparaison du méropénème (50 mg/L), dans le milieu de culture cellulaire (enrichi de 10% de sérum de veau).

Cette détermination est réalisée par équilibre de dialyse et à deux températures distinctes (4°C et 37°C), l'expérience à 4°C étant réalisée pour éviter la dégradation de la molécule observée à une température élevée.

Il apparaît (Fig.R.19.) que l'ertapénème est plus fortement lié aux protéines sériques que le méropénème. De plus, la concentration d'ertapénème et de méropénème libres est clairement supérieure à 4°C, par rapport à 37°C (ertapénème, 62.54 ± 0.46 vs 23.93 ± 0.46 ; méropénème, 99.8 ± 0.28 vs $73,44 \pm 2.25$).

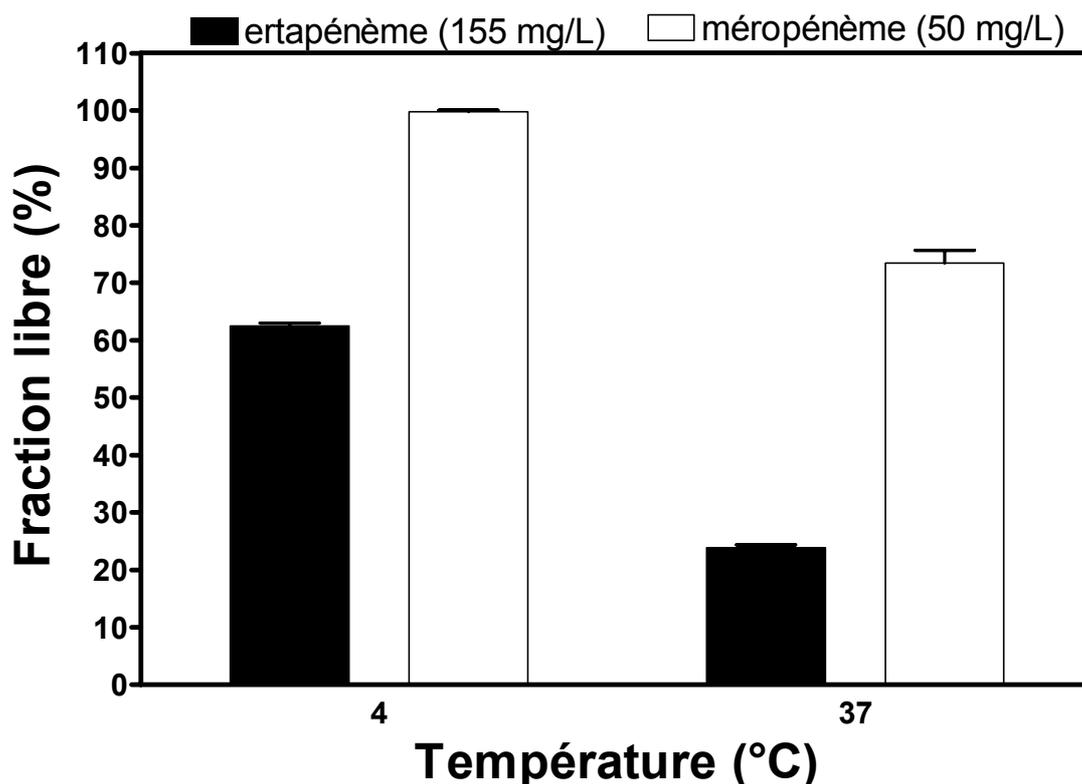


Fig.R.19. Pourcentage d'ertapénème et de méropénème libre après 32h d'équilibre de dialyse à 4°C et 37°C. Les résultats sont des moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes (n = 3).

4.3.2. Influence de la quantité de sérum dans le milieu sur la fraction libre d'ertapénème

Après détermination de la fraction libre d'ertapénème dans le milieu de culture cellulaire (doté de 10% de sérum), nous nous sommes demandé si la réduction de sérum dans le milieu pouvait augmenter la fraction libre d'antibiotique. L'équilibre de dialyse a donc été réalisé, à 4°C et 37°C et en présence de quantités décroissantes de sérum foetal (10%, 5%, 2%).

Il apparaît une légère augmentation de la fraction libre d'ertapénème (Fig.R.20.), quelle que soit la température considérée, lorsque le pénème est en contact d'un milieu doté de 2% de sérum foetal (4°C, 74.01 ± 2.26 ; 37°C, 31.73 ± 1.87), et ceci par comparaison aux milieux enrichis de 5% (4°C, 60.60 ± 1.85 ; 37°C, 27.92 ± 0.54) et 10% de sérum foetal (4°C, 62.54 ± 0.46 ; 37°C, 23.93 ± 0.46).

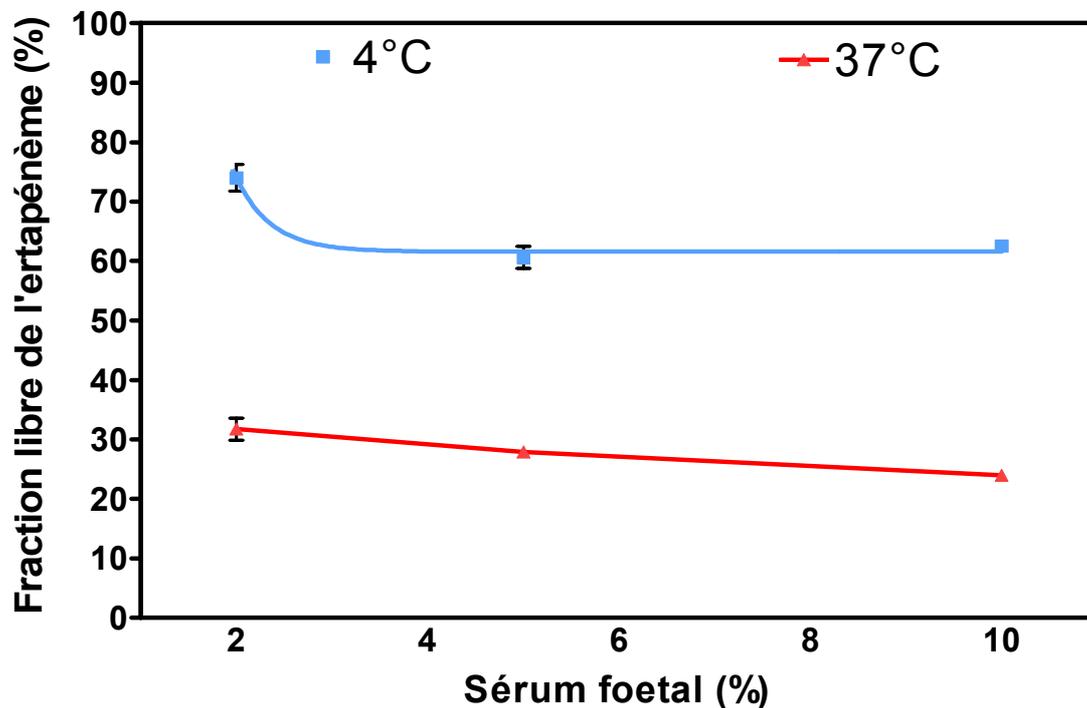


Fig.R.20. Fraction libre d'ertapénème après 32h d'équilibre, à 4°C et 37°C, en présence de quantités croissantes de sérum de veau foetal (2 %, 5%, 10%). Les résultats sont des moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes (N =3 manipulations).

4.3.3. Influence du sérum sur l'activité intracellulaire de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes*

En raison des résultats indiquant que la fraction libre d'ertapénème s'accroît lorsque la concentration en sérum diminue dans le milieu de culture (Fig.R.21., R.22.), nous avons évalué l'efficacité de l'ertapénème vis-à-vis de *L. monocytogenes* en présence de concentrations variables de sérum dans le milieu.

On constate (Fig.R.23., R.24.) que, l'activité de l'ertapénème est similaire, quelle que soit le temps considéré (5h, 24h) ou le contenu en sérum.

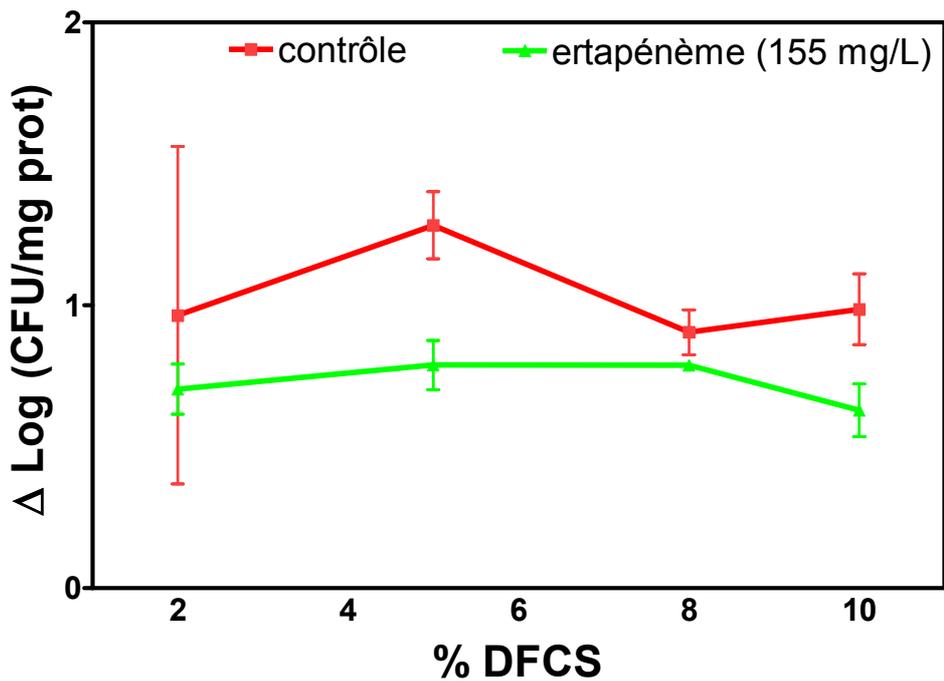


Fig. R.21. Effet de la concentration en sérum (2%, 5%, 8%, 10%) sur l'activité intracellulaire de l'ertapénème (Cmax) envers *L. monocytogenes*. L'ordonnée montre la variation en log du nombre de CFU/mg de protéines cellules au cours de 5h d'incubation. Les valeurs sont des moyennes \pm SD de trois expériences indépendantes (n=1).

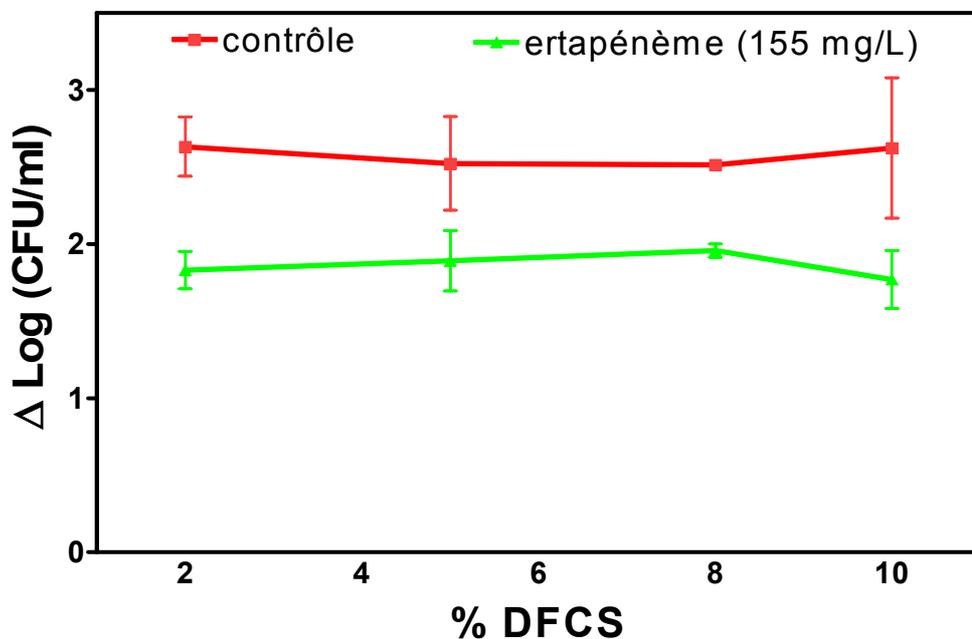


Fig. R.22. Effet de la concentration en sérum de veau foetal (2%, 5%, 8%, 10%) sur l'activité intracellulaire de l'ertapénème (Cmax) envers *L. monocytogenes*. L'ordonnée montre la variation en log du nombre de CFU/mg de protéines cellules au cours de 24h d'incubation. Les valeurs sont des moyennes \pm SD de trois expériences indépendantes (n=1).

4.3.4. Influence du sérum sur la capture cellulaire d'ertapénème

Pour expliquer l'absence d'influence de la fraction libre d'ertapénème sur la survie intracellulaire de *L. monocytogenes*, nous avons évalué la capture cellulaire de l'ertapénème dans les mêmes conditions expérimentales.

Cette détermination est réalisée à 37°C, après 5h et 24h d'exposition à l'antibiotique et en présence de concentrations variables de sérum (2%, 5%, 8%, 10%).

On constate que la concentration cellulaire d'antibiotique est similaire, dans les cellules infectées ou non, quel que soit le contenu sérique du milieu de culture cellulaire (tableau R.4.). De plus, comme décrit précédemment, la concentration cellulaire décroît avec le temps.

Sur base de la mesure de la concentration cellulaire d'ertapénème, nous avons calculé le rapport Cc/Ce. Celui-ci est inférieur à 1 et révèle que l'antibiotique ne s'accumule pas dans les cellules.

Temps d'incubation	% de sérum dans le milieu de culture	Macrophages infectés par <i>L. monocytogenes</i>		Macrophages non infectés par <i>L. monocytogenes</i>	
		Concentration cellulaire (mg/L)	Cc/Ce	Concentration cellulaire (mg/L)	Cc/Ce
5h	2 %	82.61 ± 2.96	0.53 ± 0.02	76,10 ± 5.53	0.49 ± 0.04
	5 %	83.70 ± 5.25	0.54 ± 0.03	83,3 ± 6.8	0.54 ± 0.04
	8 %	82.16 ± 1.35	0.53 ± 0.01	80,25 ± 7.3	0.52 ± 0.5
	10 %	83.09 ± 7.15	0.54 ± 0.05	66.58 ± 1.55	0.43 ± 0.01
24h	2 %	21.31 ± 4.65	0.13 ± 0.01	20.50 ± 1.93	0.14 ± 0.03
	5 %	15.39 ± 15.50	0.18 ± 0.03	27.49 ± 5.53	0.1 ± 0.1
	8 %	32.05 ± 3.08	0.21 ± 0.02	Non détectable	
	10 %	27.22 ± 9.3	0.24 ± 0.08	37.1 ± 12.18	0.18 ± 0.06

Tableau R.4. Rapport Cc/Ce de l'ertapénème (Cmax) et sa concentration cellulaire après 5h et 24h d'incubation dans un modèle de macrophages humains infectés ou non par *L. monocytogenes* (Moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, n = 2).

Discussion

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'activité de l'ertapénème, une pénème à large spectre anti-bactérien et à administration unique quotidienne, vis-à-vis des infections extracellulaires et intracellulaires à *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. L'intérêt potentiel de cette molécule, dans le cadre de ces infections demandant un traitement prolongé, est de diminuer le nombre d'administrations journalières.

Cette étude révèle cependant deux comportements surprenants dans le cadre de l'infection intracellulaire. En premier lieu, et contrairement à ce que beaucoup d'auteurs ont suggéré (Alexander et Good, 1968 ; Holmes et al., 1966 ; Mandell, 1973 ; Solberg et Hellum, 1978), nous observons que les trois β -lactames étudiées sont actives vis-à-vis de *S. aureus* intraphagocytaire. Les travaux de Renard et al. (1987) avaient, en fait, montré que la pénicilline G ne s'accumule pas dans les cellules et elle est pratiquement exclue de compartiments acides tels les lysosomes. Comme expliqué dans l'introduction, cette propriété a été attribuée à leur caractère d'acide organique faible. Etant donné que l'ertapénème et les deux autres β -lactames étudiées sont également porteurs d'une fonction carboxylique libre, on pouvait prévoir qu'aucune de ces trois molécules ne s'accumulerait dans les cellules. C'est effectivement ce que nous avons pu observer.

De plus, et étant donné que *S. aureus* est présenté comme un pathogène phagolysosomal, les considérations pharmacocinétiques reprises dans Renard et al. (1987) prédisent que leur concentrations soient au moins 100x plus faibles dans les lysosomes par rapport au cytosol. Appliquant ces données à l'ertapénème, on peut prédire que sa concentration intralysosomiale n'excédera pas ~ 0.7 mg/L. Ce chiffre est relativement proche de la CMI mesurée à pH 5.5 et suggère, dès lors, que l'antibiotique puisse être actif. Ce raisonnement, cependant, n'est pas applicable au méropénème et à l'ampicilline car leur concentrations cellulaires sont probablement très inférieures (la concentration estimée de méropénème dans les lysosomes doit être inférieures à 0.6 mg/L ; pour l'ampicilline, les données de Carryn et al. (2002) obtenues sur les mêmes cellules montrent que la concentration intralysosomiale doit être inférieure à 0.5 mg/L). En dépit de ces faibles concentrations, il n'y néanmoins pas de doutes que les antibiotiques utilisés ont eu un effet important sur les *S. aureus*, sur base de nos comptages bactériens et de nos observations morphologiques. Les images obtenues sont en effet celles de bactéries lysées comme elles peuvent s'observer lors d'un contact direct des β -lactames avec *S. aureus*. (Giesbrecht et al., 1998).

A l'heure actuelle, nous ne disposons pas d'explications simples de ces faits paradoxaux mais nous sommes en mesure de formuler deux hypothèses majeures. L'activité

intracellulaire des β -lactames pourrait en effet être renforcée par des facteurs intracellulaires. Ces mécanismes (Van den Broek et al., 1991) consisteraient en une sensibilisation du germe à la lyse, après perturbation de la synthèse du peptidoglycan occasionnée par les β -lactames. Le rôle des autolysines (Suginaka et al., 1979 ; Qoronfleh et Wilkinson, 1986 ; Sugai et al., 1997) et des « murosomes » (Giesbrecht et al., 1985 ; Giesbrecht et al., 1998) pourrait être critiqué. Les autolysines sont des enzymes de la paroi bactérienne dont l'activation entraînerait la lyse de celle-ci mais dont la coopération avec les agents anti-infectieux demeure encore incertaine. Ces enzymes semblent être associées à des structures vésiculaires de la paroi, dénommées les « murosomes », qui sont impliqués dans la morphogénèse et la séparation de deux bactéries en division. L'activation des « murosomes » est un phénomène hautement contrôlé, et leur activation désordonnée seraient à l'origine de la lyse bactérienne. Un deuxième élément à considérer dans le cadre de notre première hypothèse est peut-être la coopération entre antibiotiques et mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de défenses de l'hôte (libération d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote, ou encore l'action des cytokines, ...). Les travaux de Ouadrhiri et al. ont mis en évidence que les cellules THP-1 produisent de pareilles formes activées et que celles-ci permettent le contrôle de l'infection phagosomales telles que celles discutées avec *L. monocytogenes* en présence d'interféron- γ (IFN- γ). Il serait intéressant d'examiner dans quelle mesure l'addition d'inhibiteurs de la production de NO ou de catalase (qui détruit H₂O₂) diminuerait l'activité bactéricide des β -lactames. Inversement, cette activité pourrait être stimulée par la présence d'IFN- γ qui augmente leur production.

Une seconde hypothèse pourrait être que, contrairement aux données de la littérature, *S. aureus* puisse quitter le compartiment phagolysosomal et atteindre le cytosol,. Il serait dès lors exposé à des concentrations supérieures d'ertapénème, de méropénème ou d'ampicilline. Nous ne disposons d'aucune preuve directe pour étayer ces suppositions en ce qui concerne les cellules traitées (où *S. aureus* apparaît clairement dans les vacuoles phagolysosomiales, comme montré au laboratoire dans les cellules THP-1 par Barcia-Macay et al.,2003). Notre connaissance des modèles d'infections cellulaires à *S. aureus* nous renseigne d'ailleurs sur la nécessité de protéger les cellules (au moyen de gentamicine) de la multiplication extracellulaire des germes lorsque celles-ci sont maintenues plus de 6 h en culture après phagocytose.

Les staphylocoques dorés quittant le phagosome pourraient d'ailleurs tuer si rapidement la cellule que la visualisation des germes cytosoliques ait en fait échappé aux observateurs. Les travaux de Essmann et al. (2003) montrent en effet que la sécrétion de toxines- α par les staphylocoques dorés induit un processus de mort cellulaire caractérisé par

une nécrose prédominante. Par ailleurs, nos études de morphologie cellulaire mettent en évidence que les germes lysés (dans les cellules traitées à l'ertapénème) n'apparaissent pas dans les vacuoles mais bien dans le cytosol. Dans ce contexte, l'activité de l'ertapénème et du méropénème semblerait exclusivement dirigée vis-à-vis de germes cytosoliques (relargués des lysosomes), et leur faible bactéricidie pourrait être expliquée par l'inefficacité des β -lactames à agir vis-à-vis des germes séquestrés dans les phagolysosomes.

La seconde observation surprenante est le manque d'activité de l'ertapénème vis-à-vis des formes intracellulaires de *L. monocytogenes*, alors que (a) le méropénème et l'ampicilline sont remarquablement bactéricides à des concentrations considérablement extracellulaires inférieures, et que (b) l'activité intrinsèque (CMI) de l'ampicilline est similaire à celle de l'ertapénème. Nous n'avons pas détecté d'activité intracellulaire de l'ertapénème, même dans des cellules maintenues dans un milieu à faible contenu en protéines sériques. Ceci semble donc exclure un rôle critique de la liaison de l'ertapénème aux protéines sériques. Notons d'ailleurs que la capture cellulaire de l'ertapénème n'est pas influencée par la concentration extracellulaire en sérum dans nos conditions expérimentales. Enfin, nous n'avons pas vu de différences majeures de stabilité entre l'ertapénème et le méropénème qui puissent expliquer ces divergences d'activités intracellulaires.

Une explication simple, mais peut-être simpliste, pourrait être que l'ertapénème se lie à des constituants cytosoliques, empêchant l'antibiotique d'agir vis-à-vis de *L. monocytogenes*. Nous ne disposons d'aucune preuve directe à cet égard et cette proposition contredit nettement une des hypothèses préalablement avancée pour expliquer l'activité intracellulaire de l'ertapénème vis-à-vis de *S. aureus*. En conséquence, nous devons considérer qu'aucune explication significative n'est établie à ce jour et des études exploratrices complémentaires sont, dès lors, nécessaires. Ces dernières pourraient inclure (i) l'étude de l'activité intracellulaire de l'ertapénème, voire d'autres β -lactames, vis-à-vis d'une souche distincte de *Listeria*, à savoir *L. innocua*, qui est typiquement restreinte aux phagolysosomes par carence en LLO, et (ii) la détermination de la localisation subcellulaire de l'ertapénème (par des études de fractionnement).

En dépit des nombreuses hypothèses, incertaines et apparemment contradictoires, énoncées jusqu'ici, notre travail ouvre néanmoins des perspectives intéressantes concernant l'usage clinique de l'ertapénème. En premier lieu, nos résultats peuvent servir de support aux données indiquant que l'ertapénème est un antibiotique actif et efficace pour le contrôle d'infections staphylococciques sévères, telles que celles observées lors d'infections compliquées de la peau et des tissus mous (Pelak et al., 2002 ; Graham et al., 2002). Ces infections impliquent en effet *S. aureus* comme principal agent pathogène. Leur caractère

récurrent et persistant de telles infections semble d'ailleurs résulter d'une distribution intracellulaire du germe (Craven et Anderson, 1979; Mempel et al., 2002). De plus, l'activité similaire de l'ertapénème, du méropénème et de l'ampicilline, suggère que ces conclusions pourraient être étendues à d'autres pénèmes disponibles actuellement ou en développement. Une perspective intéressante serait d'étudier l'activité cellulaire du faropénème, une nouvelle pénème à usage oral et à haute affinité vis-à-vis des PBP de germes Gram + et Gram -, et inclant *S. aureus*. (Dalhoff et al., 2003).

Toutefois, l'usage des β -lactames dans le traitement des infections staphylococciques semble être limité en raison de la prévalence accrue d'organismes résistants. Ces germes, dénommés sous le terme de MRSA, sont résistants aux β -lactames conventionnelles. Néanmoins de nouveaux composés sont actuellement en développement et, parmi ceux-ci, le Ro 63-9141 (Heibeisen et al., 2001) qui dispose (i) d'une affinité suffisante vis-à-vis de la transpeptidase (PBP 2') du MRSA et (ii) d'une stabilité vis-à-vis des β -lactamases. Il serait, dès lors, intéressant d'étudier l'activité intracellulaire d'une telle molécule vis-à-vis de *S. aureus* dans nos modèles.

En revanche, nos travaux montrent clairement que des réserves nettes devraient être émises vis-à-vis de l'utilisation potentielle de l'ertapénème, en alternative au méropénème ou à l'ampicilline, dans le contrôle des infections à *L. monocytogenes*. Bien que l'avantage d'une administration uni-quotidienne aurait été particulièrement évident d'un point de vue clinique, les considérations pharmacocinétiques sont totalement inopportunes dans ce contexte d'inactivité de l'ertapénème vis-à-vis des formes intracellulaires à *L. monocytogenes*. Les macrophages ne constituent cependant pas la cible exclusive de *L. monocytogenes*. Des études ultérieures pourraient, dès lors, inclure la détermination de l'activité intracellulaire de l'ertapénème dans des modèles d'infections cellulaires distincts, mais également pertinents, tels que les cellules Caco-2 (modèle d'Ouadrhiri et al., 1999). Dans un contexte plus large, notre présente étude illustre parfaitement que les paramètres pharmacocinétiques et la présence de l'antibiotique dans l'organisme (ou un milieu considéré) ne se traduit pas nécessairement par une activité.

Annexes

Communications scientifiques

Résumé de la communication acceptée au 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prague, République tchèque, mai 2004

Comparison of ertapenem, ampicillin, and meropenem against the intracellular forms of *Listeria monocytogenes* in human THP-1 macrophages

S.Lemaire, S.Van de Velde, S.Carryn, F. Van Bambeke, M.-P. Mingeot-Leclercq and P.M.Tulkens

Objectives : Ertapenem (ETP) is a new carbapenem with prolonged half-life (approx. 4h), which could make it more suitable than meropenem (MEM) or ampicillin (AMP) for the treatment of listeriosis. However, *L. monocytogenes* is largely intracellular, and the activity of ETP against these forms has not been investigated. We, therefore, compared ETP to AMP and MEM in a model of human macrophages where AMP and MEM are cidal over a 24h incubation (approx. 2 log CFU decrease; Carryn et al., J Antimicrob Chemother. 2003, 51:1051-2).

Methods : MIC (arithmetic dilutions) and MBC (geometric dilutions) were determined in TSB by standard methods. Activity against extracellular and intracellular forms of *L. monocytogenes* was examined in THP-1 macrophages incubated with extracellular concentrations (ETP, 155 mg/L; AMP and MEM, 50 mg/L) equivalent to the C_{max} achievable in human serum after conventional dosing. The stability of the drugs in the culture medium under our experimental conditions was checked by HPLC.

Results : Activities in broth and in the cellular model are shown in the Table. (change in log CFU)

	Broth		THP-1 model	
	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)	extracellular	intracellular
ETP	0.48±0.03	>64	-0.57±0.05	0.96±0.23
AMP	0.37±0.23	>64	-0.46±0.03	-1.81±0.01
MEM	0.05±0.00	>64	-0.38±0.05	-1.82±0.01

means +/- SEM (n=3 independent experiments)

Thus, whereas AMP and ETP have similar activities against *L. monocytogenes* in broth, AMP was cidal but ETP unable to control the growth of intracellular *L. monocytogenes*. Yet, assay of cell-associated ETP showed that its apparent cellular concentration exceeded the MIC. Decreasing the serum concentration in the culture medium (from 10 to 2%) did not change the results. Stability studies showed a lower degree of degradation for ETP than for MEM.

Conclusions: In this model, ETP did not eradicate intraphagocytic *L. monocytogenes*. It is possible that intracellular conditions (e.g. binding to cytoplasmic proteins) hinder ETP intracellular activity in comparison with AMP or MEM.



Comparison of ertapenem, ampicillin, and meropenem against the intracellular forms of *Listeria monocytogenes* in human THP-1 macrophages

Sandrine Lemaire, Sébastien Van de Veide, Stéphane Carryn, Françoise Van Bambeke, Marie-Paule Mingeot-Leclercq and Paul M. Tulkens

Unité de Pharmacologie cellulaire et moléculaire, Université catholique de Louvain - Brussels - Belgium

P1045

Mailing address:
 P.M. Tulkens
 Pharmacologie cellulaire et moléculaire
 UCL 73-70 av. Mounier 73
 1348 Louvain-la-Neuve
 tulkens@farm.ucl.ac.be

Abstract

Objectives : Ertapenem (ETP) is a new carbapenem with prolonged half-life (approx. 4h), which could make it more suitable than meropenem (MEM) or ampicillin (AMP) for the treatment of listeriosis. However, *L. monocytogenes* is largely intracellular, and the activity of ETP against these forms has not been investigated. We, therefore, compared ETP to AMP and MEM in a model of human macrophages where AMP and MEM are dial over a 24h incubation (approx. 2 log CFU decrease; Carryn et al., J Antimicrob Chemother, 2003, 52: 1025-1032).

Methods : MIC (antimetic dilutions) and MBC (geometric dilutions) were determined in TSB by standard methods. Activity against extracellular and intracellular forms of *L. monocytogenes* was examined in THP-1 macrophages incubated with extracellular concentrations (ETP, 155 mg/L; AMP and MEM, 50 mg/L) equivalent to the Cmax achievable in human serum after conventional dosing. The stability of the drugs in the culture medium under our experimental conditions was assessed by HPLC. The number of viable cells in the culture medium (change in log CFU) in broth and in the cellular model are shown in the Table.

	THP-1 model	
	Broth	intracellular
ETP	0.48±0.03	-0.57±0.05
AMP	0.37±0.23	-0.46±0.03
MEM	0.05±0.00	-0.38±0.05
means ± SEM (n=3 independent experiments)		

Thus, whereas AMP, MEM and ETP have similar activities against *L. monocytogenes* in broth, AMP and MEM were not able to control the growth of intracellular *L. monocytogenes*. Yet, assay of cell-associated ETP showed that its apparent intracellular concentration exceeded the MIC. Decreasing the MIC (cellular concentration exceeded the MIC) led to a lower degree of results. Stability studies showed a lower degree of degradation for ETP than for MEM.

Conclusions : In this model, ETP did not eradicate intraphagocytic *L. monocytogenes*. It is possible that intracellular conditions (e.g. binding to cytoplasmic proteins) hinder ETP intracellular activity in comparison with AMP or MEM.

AIM OF THE STUDY

- To compare the extracellular (broth) and intraphagocytic (infected macrophages THP-1) activity of ertapenem with that of meropenem and ampicillin, at a concentration mimicking the Cmax reached in patients undergoing conventional therapy.
- To study the cellular accumulation and the stability of ETP in the experimental conditions used for determining activity, and to evaluate the potential influence of drug binding to serum proteins on activity.

RESULTS

1. comparative extracellular and intracellular activity of beta-lactams against *L. monocytogenes* in a 24 h model

Drug	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
CONTR	0.48±0.03	> 64
ETP	0.37±0.23	0.05±0.00
AMP	> 64	> 64
MEM	> 64	> 64

Change in the number of viable *L. monocytogenes* in broth or in infected macrophages after 24 h incubation in the absence of antibiotic (CONTR) or with ertapenem (ETP), ampicillin (AMP) or meropenem (MEM). The drugs were added at an extracellular concentration corresponding to the Cmax measured in the serum of patients (50 mg/L for AMP and MEM; 155 mg/L for ETP). For experiments with cells, the culture medium was added by 10% decompensated calf serum. Data are the mean ± SEM of 3 independent experiments.

* Reducing the serum content of the culture to 2% does not significantly alter the results.

2. accumulation of ertapenem in THP-1 macrophages after 24 h incubation

Cellular condition	cellular concentration (mg/L cell vol)	accumulation factor
non infected cells	27.9 ± 9.3	0.18 ± 0.06
infected cells	37.2 ± 10.9	0.24 ± 0.07

Extracellular concentration: 155 mg/L; data are mean ± SEM of 3 independent experiments

3. comparative stability of carbapenems after 24 h incubation in water or in the culture medium

METHODS

- Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration were determined in Tryptic Soy Broth (TSB) respectively by arithmetic and geometric dilution (3).
- Extracellular activity was assayed by CFUs counting after 24h exposition to the antibiotic in TSB (1,3).
- Intracellular activity was measured after 24 h of incubation of THP-1 human macrophages infected with an initial inoculum 5 bactericidal. The number of CFUs in cell lysates was determined and the results were expressed by geometric dilution (3).
- Stability of ertapenem, ampicillin and meropenem in non-infected or infected THP-1 after 24 h incubation. Ertapenem concentration was determined by microbiological assay (E. coli, lowest limit of detection: 0.25 mg/L; linearity from 0.25 mg/L to 16 mg/L, r²=0.9921); the apparent cellular concentration (Cc) was calculated by using a conversion factor of 5 µl of cell volume per mg of cell protein.
- Stability of ertapenem and meropenem was evaluated over a 24 h incubation period in water or in RPMI+10% calf serum. The drugs were assayed by RP-HPLC (4,5) (Lichrospher 100 RP-18, 25 x 4 cm, injection volume: 50 µl; elution buffer: 25 mM phosphate buffer, pH 6.5/acetonitrile [vol/vol]: 83:17 for ertapenem and sodium acetate 10.53 mM pH 4/acetonitrile [vol/vol]: 90:10) for meropenem; flow rate: 1 ml/min; UV detector: 300 nm; linearity from 0.05 mg/L to 200 mg/L (r²=0.9989). The extraction procedure from culture medium involved 3 successive cycles of precipitation of proteins in acetonitrile and centrifugation, the addition of dichloromethane to the supernatant and the injection of the sample in a Waters 2690 system.

INTRODUCTION

L. monocytogenes is an intracellular bacteria responsible for life-threatening infections in immunocompromised patients and pregnant women. The current therapeutic treatment consists in the combination of ampicillin (or meropenem) and an aminoglycoside. Because of the intracellular character of this infection, appropriate treatment options need to be assessed in models of infected cells.

Using infected human THP-1 macrophages, we recently showed that ampicillin and meropenem display a marked bactericidal activity against intracellular *L. monocytogenes*, provided that they are maintained for a prolonged time (24 h) in contact with the infected cells (1). These results suggest that beta-lactam activity develops on a time-dependent manner against intracellular bacteria as they do for extracellular organisms.

In this context, ertapenem appeared to us as an interesting alternative to meropenem because of its prolonged half-life in vivo, allowing for less frequent administrations (2).

CONCLUSIONS

- Against extracellular *L. monocytogenes*, ertapenem shows, as ampicillin and meropenem, only a bacteriostatic activity.
- Against intracellular *L. monocytogenes*, ertapenem is unable to control bacterial growth, in sharp contrast to ampicillin and meropenem, which are bactericidal.
- The cellular accumulation of ertapenem is low, but its cellular concentration nevertheless reaches values ~ 75 X higher than the MIC.
- The lack of intracellular activity of ertapenem cannot be ascribed to an insufficient cellular concentration, nor to the presence of serum in the culture medium, nor to a larger extracellular degradation (in comparison with meropenem).
- Further studies are needed to elucidate the contrasting behavior of ertapenem and ampicillin or meropenem.

REFERENCES

- Carryn et al (2003) J Antimicrob Chemother. 51:1051-1052
- Livermore et al (2003) J Antimicrob Chemother. 52:331
- Carryn et al (2002) Antimicrob Agents Chemother. 46:2097
- Vlaene et al (2002) Antimicrob Agents Chemother. 46:2327
- Xuan et al (2002) Antimicrob Agents Chemother. 46:2990

**Résumé de la communication soumise au 44th Interscience Conference on
Antimicrobial Agents and Chemotherapy**

**Contrasting effects of ertapenem (ETP) against intracellular *L.monocytogenes* (L.m.)
and *S.aureus* (S.a.) in a model of THP-1 macrophages**

S. Lemaire, F. Van Bambeke, M.-P. Mingeot-Leclercq and P.M. Tulkens

Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

I. Background

ETP is a penem with an unusually long half-time, yielding efficacy against extracellular infections with a once-daily schedule. We have studied its activity in two types of intracellular infections (L.m., [cytosol]; S.a., [phagolysosomes]).

II. Methods

MIC and MBC were measured in TSB. Intracellular activity in THP-1 macrophages was determined as previously described by Carryn et al. for L.m. (AAC, 2002, 46:2095-2103), and by Seral et al. for S.a. (AAC, 2003, 47:2283-2292) with minor adaptations. Meropenem (MEM) was used for comparison.

III. Results

	L.m.				S.a.			
	MIC ^a	MBC	Activity ^b		MIC ^a	MBC	Activity ^b	
			Broth	THP-1			Broth	THP-1
ETP (155 mg/L) ^c	0.48	>64	-0.57 ± 0.05	+1.16 ± 0.08	0.11	0.25	-4.89 ± 0.16	-0.98 ± 0.21
MEM (50 mg/L) ^c	0.05	>64	-0.38 ± 0.05	-1.90 ± 0.05	0.15	0.25	-4.85 ± 0.16	-1.03 ± 0.23

^a arithmetic dilutions; ^b change (log) from original inoculum (24h incubation); ^c Cmax in patients. (Means ± SEM of three independent experiments)

Thus, in contrast to MEM, ETP was not active against intracellular L.m. Both drugs, however, showed similar activities against intracellular S.a.

IV. Conclusion

The contrasting behaviour of ETP, in comparison with MEM, suggests that both MIC and local environment modulate the intracellular activities of β -lactams.

Bibliographie

Aldridge KE (2002) Ertapenem (MK-0826), a New Carbapenem: Comparative in Vitro Activity Against Clinically Significant Anaerobes. *Diagn Microbiol Infect Dis* **44**: pp 181-186.

Alexander EH and Hudson M C (2001) Factors Influencing the Internalization of Staphylococcus Aureus and Impacts on the Course of Infections in Humans. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: pp 361-366.

Alexander JW and Good R A (1968) Effect of Antibiotics on the Bactericidal Activity of Human Leukocytes. *J Lab Clin Med* **71**: pp 971-983.

Almeida RA, Matthews K R, Cifrian E, Guidry A J and Oliver S P (1996) Staphylococcus Aureus Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. *J Dairy Sci* **79**: pp 1021-1026.

Auwerx J (1991) The Human Leukemia Cell Line, THP-1: a Multifaceted Model for the Study of Monocyte-Macrophage Differentiation. *Experientia* **47**: pp 22-31.

Balfour JA, Bryson H M and Brogden R N (1996) Imipenem/Cilastatin: an Update of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Serious Infections. *Drugs* **51**: pp 99-136.

Barcia-Macay, M., Seral, C., Mingeot-Leclercq, M. P., Tulkens, P. M., and Van Bambeke, F. Comparative activity of 12 antibiotics used at clinically-meaningful extracellular concentration against *S. aureus* in broth and in human THP-1 macrophages. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, A-1174. 2003.
Ref Type: Abstract

Blendon DC, Kampelmacher E H and Torres-Anjel M J (1987) Listeriosis. *J Am Vet Med Assoc* **191**: pp 1546-1551.

Brown KN and Percival A (1978) Penetration of Antimicrobials into Tissue Culture Cells and Leucocytes. *Scand J Infect Dis Suppl* pp 251-260.

Camilli A, Tilney L G and Portnoy D A (1993) Dual Roles of PlcA in Listeria Monocytogenes Pathogenesis. *Mol Microbiol* **8**: pp 143-157.

Carlier MB, Scorneaux B, Zenebergh A, Desnottes J F and Tulkens P M (1990) Cellular Uptake, Localization and Activity of Fluoroquinolones in Uninfected and Infected Macrophages. *J Antimicrob Chemother* **26 Suppl B**: pp 27-39.

Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M P and Tulkens P M (2002) Comparative Intracellular (THP-1 Macrophage) and Extracellular Activities of Beta-Lactams, Azithromycin, Gentamicin, and Fluoroquinolones Against Listeria Monocytogenes at Clinically Relevant Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: pp 2095-2103.

Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-Leclercq M P, Van Bambeke F and Tulkens P M (2003) Intracellular Pharmacodynamics of Antibiotics. *Infect Dis Clin North Am* **17**: pp 615-634.

Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M P and Tulkens P M (2003) Activity of Beta-Lactams (Ampicillin, Meropenem), Gentamicin, Azithromycin and Moxifloxacin Against Intracellular Listeria Monocytogenes in a 24 h THP-1 Human Macrophage Model. *J Antimicrob Chemother* **51**: pp 1051-1052.

Casewell MW and Hill R L (1986) The Carrier State: Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *J Antimicrob Chemother* **18 Suppl A**: pp 1-12.

Chanteux H, Mingeot-Leclercq M P, Sonveaux E, Van Bambeke F and Tulkens P M (2003) Intracellular Accumulation and Activity of Ampicillin Used As Free Drug and As Its Phthalimidomethyl or Pivaloyloxymethyl Ester (Pivampicillin) Against *Listeria Monocytogenes* in J774 Macrophages. *J Antimicrob Chemother* **52**: pp 610-615.

Chanteux H, Paternotte I, Mingeot-Leclercq M P, Brasseur R, Sonveaux E and Tulkens P M (2003) Cell Handling, Membrane-Binding Properties, and Membrane-Penetration Modeling Approaches of Pivampicillin and Phthalimidomethylampicillin, Two Basic Esters of Ampicillin, in Comparison With Chloroquine and Azithromycin. *Pharm Res* **20**: pp 624-631.

Conlan JW and North R J (1992) Early Pathogenesis of Infection in the Liver With the Facultative Intracellular Bacteria *Listeria Monocytogenes*, *Francisella Tularensis*, and *Salmonella Typhimurium* Involves Lysis of Infected Hepatocytes by Leukocytes. *Infect Immun* **60**: pp 5164-5171.

Cossart P and Lecuit M (1998) Interactions of *Listeria Monocytogenes* With Mammalian Cells During Entry and Actin-Based Movement: Bacterial Factors, Cellular Ligands and Signaling. *EMBO J* **17**: pp 3797-3806.

Craig WA (2003) Basic Pharmacodynamics of Antibacterials With Clinical Applications to the Use of Beta-Lactams, Glycopeptides, and Linezolid. *Infect Dis Clin North Am* **17**: pp 479-501.

Craven N and Anderson J C (1979) The Location of *Staphylococcus Aureus* in Experimental Chronic Mastitis in the Mouse and the Effect on the Action of Sodium Cloxacillin. *Br J Exp Pathol* **60**: pp 453-459.

Curran M, Simpson D and Perry C (2003) Ertapenem: a Review of Its Use in the Management of Bacterial Infections. *Drugs* **63**: pp 1855-1878.

Dagan D and Sarne Y (1979) Selective Degeneration of Neurons Induced by Cobalt Ions. *Brain Res* **177** : pp 214-219.

Dalhoff A, Nasu T and Okamoto K (2003) Target Affinities of Faropenem to and Its Impact on the Morphology of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Chemotherapy* **49**: pp 172-183.

de Chastellier C and Berche P (1994) Fate of *Listeria Monocytogenes* in Murine Macrophages: Evidence for Simultaneous Killing and Survival of Intracellular Bacteria. *Infect Immun* **62**: pp 543-553.

Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P and Cossart P (1995) Entry of *Listeria Monocytogenes* into Hepatocytes Requires Expression of InIB, a Surface Protein of the Internalin Multigene Family. *Mol Microbiol* **16**: pp 251-261.

Drevets DA, Sawyer R T, Potter T A and Campbell P A (1995) *Listeria Monocytogenes* Infects Human Endothelial Cells by Two Distinct Mechanisms. *Infect Immun* **63**: pp 4268-4276.

Drevets DA (1999) Dissemination of *Listeria Monocytogenes* by Infected Phagocytes. *Infect Immun* **67**: pp 3512-3517.

Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K and Hudson M (2003) Intracellular *Staphylococcus Aureus*. A Mechanism for the Indolence of Osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* **85**: pp 918-921.

Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels I H, Sinha B, Schulze-Osthoff K and Janicke R U (2003) Staphylococcus Aureus Alpha-Toxin-Induced Cell Death: Predominant Necrosis Despite Apoptotic Caspase Activation. *Cell Death Differ* **10**: pp 1260-1272.

Farber JM and Peterkin P I (1991) Listeria Monocytogenes, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol Rev* **55**: pp 476-511.

Fuchs PC, Barry A L and Brown S D (2001) In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) Against Clinical Bacterial Isolates From 11 North American Medical Centers. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: pp 1915-1918.

Gaillard JL, Berche P and Sansonetti P (1986) Transposon Mutagenesis As a Tool to Study the Role of Hemolysin in the Virulence of Listeria Monocytogenes. *Infect Immun* **52**: pp 50-55.

Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S and Sansonetti P (1987) In Vitro Model of Penetration and Intracellular Growth of Listeria Monocytogenes in the Human Enterocyte-Like Cell Line Caco-2. *Infect Immun* **55**: pp 2822-2829.

Galbenu P, Gheorghiu M and Marinescu D (1979) Infection in Vitro of the Human Pulmonary Macrophage With Staphylococcus Aureus (Bacteriologic and Ultrastructural Observations). *Morphol Embryol (Bucur)* **25**: pp 175-184.

Gedde MM, Higgins D E, Tilney L G and Portnoy D A (2000) Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of Listeria Monocytogenes. *Infect Immun* **68**: pp 999-1003.

Geoffroy C, Raveneau J, Beretti J L, Lecroisey A, Vazquez-Boland J A, Alouf J E and Berche P (1991) Purification and Characterization of an Extracellular 29-Kilodalton Phospholipase C From Listeria Monocytogenes. *Infect Immun* **59**: pp 2382-2388.

Giesbrecht P, Labischinski H and Wecke J (1985) A Special Morphogenetic Wall Defect and the Subsequent Activity of "Murosomes" As the Very Reason for Penicillin-Induced Bacteriolysis in Staphylococci. *Arch Microbiol* **141**: pp 315-324.

Gill CJ, Jackson J J, Gerckens L S, Pelak B A, Thompson R K, Sundelof J G, Kropp H and Rosen H (1998) In Vivo Activity and Pharmacokinetic Evaluation of a Novel Long-Acting Carbapenem Antibiotic, MK-826 (L-749,345). *Antimicrob Agents Chemother* **42**: pp 1996-2001.

Glasser L and Fiederlein R L (1987) Functional Differentiation of Normal Human Neutrophils. *Blood* **69**: pp 937-944.

Goldberg MB (2001) Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: pp 595-626, table.

Goldstein EJ, Citron D M, Vreni M C, Warren Y and Tyrrell K L (2000) Comparative In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) Against 1,001 Anaerobes Isolated From Human Intra-Abdominal Infections. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: pp 2389-2394.

Graham DR, Lucasti C, Malafaia O, Nichols R L, Holtom P, Perez N Q, McAdams A, Woods G L, Ceesay T P and Gesser R (2002) Ertapenem Once Daily Versus Piperacillin-Tazobactam 4 Times Per Day for Treatment of Complicated Skin and Skin-Structure Infections in Adults: Results of a Prospective, Randomized, Double-Blind Multicenter Study. *Clin Infect Dis* **34**: pp 1460-1468.

- Gray ML and Killinger A H (1966) *Listeria Monocytogenes* and Listeric Infections. *Bacteriol Rev* **30**: pp 309-382.
- Gresham HD, Lowrance J H, Caver T E, Wilson B S, Cheung A L and Lindberg F P (2000) Survival of *Staphylococcus Aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. *J Immunol* **164**: pp 3713-3722.
- Hamada M, Kuroiwa A, Matsumoto T, Nomoto K and Takeya K (1981) Modification of Protective Mechanisms Against *Listeria Monocytogenes* During Pregnancy. *J Clin Lab Immunol* **6**: pp 169-173.
- Hebeisen P, Heinze-Krauss I, Angehrn P, Hohl P, Page M G and Then R L (2001) In Vitro and in Vivo Properties of Ro 63-9141, a Novel Broad-Spectrum Cephalosporin With Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: pp 825-836.
- Hess DJ, Henry-Stanley M J, Erickson E A and Wells C L (2003) Intracellular Survival of *Staphylococcus Aureus* Within Cultured Enterocytes. *J Surg Res* **114**: pp 42-49.
- Hiramatsu K (1998) The Emergence of *Staphylococcus Aureus* With Reduced Susceptibility to Vancomycin in Japan. *Am J Med* **104**: pp 7S-10S.
- Hoellman DB, Kelly L M, Credito K, Anthony L, Ednie L M, Jacobs M R and Appelbaum P C (2002) In Vitro Antianaerobic Activity of Ertapenem (MK-0826) Compared to Seven Other Compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: pp 220-224.
- Holmes B, Quie P G, Windhorst D B, Pollara B and Good R A (1966) Protection of Phagocytized Bacteria From the Killing Action of Antibiotics. *Nature* **210**: pp 1131-1132.
- Hudson MC, Ramp W K, Nicholson N C, Williams A S and Nousiainen M T (1995) Internalization of *Staphylococcus Aureus* by Cultured Osteoblasts. *Microb Pathog* **19**: pp 409-419.
- Hurst M and Lamb H M (2000) Meropenem: a Review of Its Use in Patients in Intensive Care. *Drugs* **59** : pp 653-680.
- Johnson JD, Hand W L, Francis J B, King-Thompson N and Corwin R W (1980) Antibiotic Uptake by Alveolar Macrophages. *J Lab Clin Med* **95**: pp 429-439.
- Jones RN (2001) In Vitro Evaluation of Ertapenem (MK-0826), a Long-Acting Carbapenem, Tested Against Selected Resistant Strains. *J Chemother* **13**: pp 363-376.
- Jones, TC (1996) The effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on macrophage function in microbial disease. *Med.Oncol.***13**:141-147.
- Kahl B, Herrmann M, Everding A S, Koch H G, Becker K, Harms E, Proctor R A and Peters G (1998) Persistent Infection With Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus Aureus* in Patients With Cystic Fibrosis. *J Infect Dis* **177**: pp 1023-1029.
- Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon S M, Kaplan G, Peters G and Cheung A L (2000) *Staphylococcus Aureus* RN6390 Replicates and Induces Apoptosis in a Pulmonary Epithelial Cell Line. *Infect Immun* **68**: pp 5385-5392.
- Kaufmann SH and Kaplan G (1996) Immunity to Intracellular Bacteria. *Res Immunol* **147**: pp 487-489.

- Kernodle DS, Classen D C, Stratton C W and Kaiser A B (1998) Association of Borderline Oxacillin-Susceptible Strains of Staphylococcus Aureus With Surgical Wound Infections. *J Clin Microbiol* **36**: pp 219-222.
- Kielian T, Cheung A and Hickey W F (2001) Diminished Virulence of an Alpha-Toxin Mutant of Staphylococcus Aureus in Experimental Brain Abscesses. *Infect Immun* **69**: pp 6902-6911.
- Kohler J, Dorso K L, Young K, Hammond G G, Rosen H, Kropp H and Silver L L (1999) In Vitro Activities of the Potent, Broad-Spectrum Carbapenem MK-0826 (L-749,345) Against Broad-Spectrum Beta-Lactamase- and Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Klebsiella Pneumoniae and Escherichia Coli Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: pp 1170-1176.
- Kreft J, Vazquez-Boland J A, Altrock S, Dominguez-Bernal G and Goebel W (2002) Pathogenicity Islands and Other Virulence Elements in Listeria. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: pp 109-125.
- Kuhn M, Prevost M C, Mounier J and Sansonetti P J (1990) A Nonvirulent Mutant of Listeria Monocytogenes Does Not Move Intracellularly but Still Induces Polymerization of Actin. *Infect Immun* **58**: pp 3477-3486.
- Labro MT (2000) Interference of Antibacterial Agents With Phagocyte Functions: Immunomodulation or "Immuno-Fairy Tales"? *Clin Microbiol Rev* **13**: pp 615-650.
- Livermore DM, Carter M W, Bagel S, Wiedemann B, Baquero F, Loza E, Endtz H P, van Den B N, Fernandes C J, Fernandes L, Frimodt-Moller N, Rasmussen L S, Giamarellou H, Giamarellos-Bourboulis E, Jarlier V, Nguyen J, Nord C E, Struelens M J, Nonhoff C, Turnidge J, Bell J, Zbinden R, Pfister S, Mixson L and Shungu D L (2001) In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) Against Recent Clinical Bacteria Collected in Europe and Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: pp 1860-1867.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH N J, FARR A L and RANDALL R J (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**: pp 265-275.
- Lowy FD (1998) Staphylococcus Aureus Infections. *N Engl J Med* **339**: pp 520-532.
- Lowy FD (2000) Is Staphylococcus Aureus an Intracellular Pathogen? *Trends Microbiol* **8**: pp 341-343.
- MACKANESS GB (1962) Cellular Resistance to Infection. *J Exp Med* **116**: pp 381-406.
- MACKANESS GB (1969) The Influence of Immunologically Committed Lymphoid Cells on Macrophage Activity in Vivo. *J Exp Med* **129**: pp 973-992.
- Majumdar AK, Musson D G, Birk K L, Kitchen C J, Holland S, McCrea J, Mistry G, Hesney M, Xi L, Li S X, Haesen R, Blum R A, Lins R L, Greenberg H, Waldman S, Deutsch P and Rogers J D (2002) Pharmacokinetics of Ertapenem in Healthy Young Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: pp 3506-3511.
- Mandell GL (1973) Interaction of Intraleukocytic Bacteria and Antibiotics. *J Clin Invest* **52**: pp 1673-1679.
- Marco AJ, Altimira J, Prats N, Lopez S, Dominguez L, Domingo M and Briones V (1997) Penetration of Listeria Monocytogenes in Mice Infected by the Oral Route. *Microb Pathog* **23**: pp 255-263.

Mempel M, Schnopp C, Hojka M, Fesq H, Weidinger S, Schaller M, Korting H C, Ring J and Abeck D (2002) Invasion of Human Keratinocytes by Staphylococcus Aureus and Intracellular Bacterial Persistence Represent Haemolysin-Independent Virulence Mechanisms That Are Followed by Features of Necrotic and Apoptotic Keratinocyte Cell Death. *Br J Dermatol* **146**: pp 943-951.

MILNE MD, SCRIBNER B H and CRAWFORD M A (1958) Non-Ionic Diffusion and the Excretion of Weak Acids and Bases. *Am J Med* **24**: pp 709-729.

Mirza J, Kim Y and Lorian V (1985) Effect of PH on the Morphology of Staphylococcus Aureus. *Drugs Exp Clin Res* **11**: pp 149-153.

Musson DG, Majumdar A, Birk K, Holland S, Wickersham P, Li S X, Mistry G, Fisher A, Waldman S, Greenberg H, Deutsch P and Rogers J D (2003) Pharmacokinetics of Intramuscularly Administered Ertapenem. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: pp 1732-1735.

Musson DG, Birk K L, Kitchen C J, Zhang J, Hsieh J Y, Fang W, Majumdar A K and Rogers J D (2003) Assay Methodology for the Quantitation of Unbound Ertapenem, a New Carbapenem Antibiotic, in Human Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **783**: pp 1-9.

Musson DG, Majumdar A, Holland S, Birk K, Xi L, Mistry G, Sciberras D, Muckow J, Deutsch P and Rogers J D (2004) Pharmacokinetics of Total and Unbound Ertapenem in Healthy Elderly Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: pp 521-524.

Noble WC, Valkenburg H A and Wolters C H (1967) Carriage of Staphylococcus Aureus in Random Samples of a Normal Population. *J Hyg (Lond)* **65**: pp 567-573.

North RJ (1970) The Relative Importance of Blood Monocytes and Fixed Macrophages to the Expression of Cell-Mediated Immunity to Infection. *J Exp Med* **132**: pp 521-534.

Odenholt I (2001) Ertapenem: a New Carbapenem. *Expert Opin Investig Drugs* **10**: pp 1157-1166.

Ogawa SK, Yurberg E R, Hatcher V B, Levitt M A and Lowy F D (1985) Bacterial Adherence to Human Endothelial Cells in Vitro. *Infect Immun* **50**: pp 218-224.

Ortiz-Ruiz G, Caballero-Lopez J, Friedland I R, Woods G L and Carides A (2002) A Study Evaluating the Efficacy, Safety, and Tolerability of Ertapenem Versus Ceftriaxone for the Treatment of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis* **34**: pp 1076-1083.

Ouadrhiri Y, Scorneaux B, Sibille Y and Tulkens P M (1999) Mechanism of the Intracellular Killing and Modulation of Antibiotic Susceptibility of Listeria Monocytogenes in THP-1 Macrophages Activated by Gamma Interferon. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: pp 1242-1251.

Ouadrhiri Y, Sibille Y and Tulkens P M (1999) Modulation of Intracellular Growth of Listeria Monocytogenes in Human Enterocyte Caco-2 Cells by Interferon-Gamma and Interleukin-6: Role of Nitric Oxide and Cooperation With Antibiotics. *J Infect Dis* **180**: pp 1195-1204.

Portnoy DA, Auerbuch V and Glomski I J (2002) The Cell Biology of Listeria Monocytogenes Infection: the Intersection of Bacterial Pathogenesis and Cell-Mediated Immunity. *J Cell Biol* **158**: pp 409-414.

- Prats N, Lopez S, Domingo M, Briones V, Garcia J A, Dominguez L and Marco A J (1997) Prolonged Persistence of *Listeria Monocytogenes* After Intragastric Infection in Corticosteroid-Treated Mice. *Vet Microbiol* **58**: pp 79-85.
- Proctor RA, Kahl B, von Eiff C, Vaudaux P E, Lew D P and Peters G (1998) Staphylococcal Small Colony Variants Have Novel Mechanisms for Antibiotic Resistance. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**: pp S68-S74.
- Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Berche P, Milon G, Geissmann F and Gaillard J L (2001) Dendritic Cells Are Early Cellular Targets of *Listeria Monocytogenes* After Intestinal Delivery and Are Involved in Bacterial Spread in the Host. *Cell Microbiol* **3**: pp 331-340.
- Qoronfleh MW and Wilkinson B J (1986) Effects of Growth of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus Aureus* in the Presence of Beta-Lactams on Peptidoglycan Structure and Susceptibility to Lytic Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **29**: pp 250-257.
- Racz P, Tenner K and Mero E (1972) Experimental *Listeria* Enteritis. I. An Electron Microscopic Study of the Epithelial Phase in Experimental *Listeria* Infection. *Lab Invest* **26**: pp 694-700.
- Racz P, Tenner K and Mero E (1972) Experimental *Listeria* Enteritis. I. An Electron Microscopic Study of the Epithelial Phase in Experimental *Listeria* Infection. *Lab Invest* **26**: pp 694-700.
- Renard C, Vanderhaeghe H J, Claes P J, Zenebergh A and Tulkens P M (1987) Influence of Conversion of Penicillin G into a Basic Derivative on Its Accumulation and Subcellular Localization in Cultured Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: pp 410-416.
- Roy S, Higareda I, Angel-Muller E, Ismail M, Hague C, Adeyi B, Woods G L and Teppler H (2003) Ertapenem Once a Day Versus Piperacillin-Tazobactam Every 6 Hours for Treatment of Acute Pelvic Infections: a Prospective, Multicenter, Randomized, Double-Blind Study. *Infect Dis Obstet Gynecol* **11**: pp 27-37.
- Sapan CV, Lundblad R L and Price N C (1999) Colorimetric Protein Assay Techniques. *Biotechnol Appl Biochem* **29 (Pt 2)**: pp 99-108.
- Saroglou G, Cromer M and Bisno A L (1980) Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Interstate Spread of Nosocomial Infections With Emergence of Gentamicin-Methicillin Resistant Strains. *Infect Control* **1**: pp 81-89.
- Schlech WF, III, Lavigne P M, Bortolussi R A, Allen A C, Haldane E V, Wort A J, Hightower A W, Johnson S E, King S H, Nicholls E S and Broome C V (1983) Epidemic *Listeriosis*--Evidence for Transmission by Food. *N Engl J Med* **308**: pp 203-206.
- Scoreaux B, Ouadrhiri Y, Anzalone G and Tulkens P M (1996) Effect of Recombinant Human Gamma Interferon on Intracellular Activities of Antibiotics Against *Listeria Monocytogenes* in the Human Macrophage Cell Line THP-1. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: pp 1225-1230.
- Seleznev AS and Bykov A S (1981) [Electron Microscopic Study of the Effect of Methicillin on Phagocytized *Staphylococcus Aureus* Cells]. *Antibiotiki* **26**: pp 514-519.
- Seral C, Van Bambeke F and Tulkens P M (2003) Quantitative Analysis of Gentamicin, Azithromycin, Telithromycin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Oritavancin (LY333328)

Activities Against Intracellular Staphylococcus Aureus in Mouse J774 Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: pp 2283-2292.

Shah PM and Isaacs R D (2003) Ertapenem, the First of a New Group of Carbapenems. *J Antimicrob Chemother* **52**: pp 538-542.

Sheretz RJ, Reagan D R, Hampton K D, Robertson K L, Streed S A, Hoen H M, Thomas R and Gwaltney J M, Jr. (1996) A Cloud Adult: the Staphylococcus Aureus-Virus Interaction Revisited. *Ann Intern Med* **124**: pp 539-547.

Solberg CO and Hellum K B (1978) Protection of Phagocytosed Bacteria Against Antimicrobial Agents. *Scand J Infect Dis Suppl* pp 246-250.

Solomkin JS, Yellin A E, Rotstein O D, Christou N V, Dellinger E P, Tellado J M, Malafaia O, Fernandez A, Choe K A, Carides A, Satishchandran V and Teppler H (2003) Ertapenem Versus Piperacillin/Tazobactam in the Treatment of Complicated Intraabdominal Infections: Results of a Double-Blind, Randomized Comparative Phase III Trial. *Ann Surg* **237**: pp 235-245.

Soriano A, Martinez J A, Mensa J, Marco F, Almela M, Moreno-Martinez A, Sanchez F, Munoz I, Jimenez de Anta M T and Soriano E (2000) Pathogenic Significance of Methicillin Resistance for Patients With Staphylococcus Aureus Bacteremia. *Clin Infect Dis* **30**: pp 368-373.

Sugai M, Yamada S, Nakashima S, Komatsuzawa H, Matsumoto A, Oshida T and Suginaka H (1997) Localized Perforation of the Cell Wall by a Major Autolysin: Atl Gene Products and the Onset of Penicillin-Induced Lysis of Staphylococcus Aureus. *J Bacteriol* **179**: pp 2958-2962.

Suginaka H, Shimatani M, Ogawa M and Kotani S (1979) Prevention of Penicillin-Induced Lysis of Staphylococcus Aureus by Cellular Lipoteichoic Acid. *J Antibiot (Tokyo)* **32**: pp 73-77.

Territo MC and Golde D W (1979) The Function of Human Alveolar Macrophages. *J Reticuloendothel Soc* **25**: pp 111-120.

Tomasz A (1986) Penicillin-Binding Proteins and the Antibacterial Effectiveness of Beta-Lactam Antibiotics. *Rev Infect Dis* **8 Suppl 3**: pp S260-S278.

Tomera KM, Burdmann E A, Reyna O G, Jiang Q, Wimmer W M, Woods G L and Gesser R M (2002) Ertapenem Versus Ceftriaxone Followed by Appropriate Oral Therapy for Treatment of Complicated Urinary Tract Infections in Adults: Results of a Prospective, Randomized, Double-Blind Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: pp 2895-2900.

Trouet AU, Pirson P, Steiger R, Masquelier M, Baurain R and Gillet J (1981) Development of New Derivatives of Primaquine by Association With Lysosomotropic Carriers. *Bull World Health Organ* **59**: pp 449-458.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T and Tada K (1980) Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). *Int J Cancer* **26**: pp 171-176.

Tulkens PM (1990) Intracellular Pharmacokinetics and Localization of Antibiotics As Predictors of Their Efficacy Against Intraphagocytic Infections. *Scand J Infect Dis Suppl* **74**: pp 209-217.

Tulkens PM (1991) Intracellular Distribution and Activity of Antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**: pp 100-106.

Tulkens PM (1996) [Intracellular Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibiotics]. *Rev Pneumol Clin* **52 Suppl 2**: pp S51-S55.

van den Broek PJ (1991) Activity of Antibiotics Against Microorganisms Ingested by Mononuclear Phagocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**: pp 114-118.

Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J and Kreft J (2001) Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: pp 584-640.

Vazquez-Boland JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorn B, Kreft J and Goebel W (2001) Pathogenicity Islands and Virulence Evolution in Listeria. *Microbes Infect* **3**: pp 571-584.

Vazquez-Boland JA (2002) Bacterial Growth in the Cytosol: Lessons From Listeria. *Trends Microbiol* **10**: pp 493-495.

Vesga O, Groeschel M C, Otten M F, Brar D W, Vann J M and Proctor R A (1996) Staphylococcus Aureus Small Colony Variants Are Induced by the Endothelial Cell Intracellular Milieu. *J Infect Dis* **173**: pp 739-742.

Viaene E, Chanteux H, Servais H, Mingeot-Leclercq M P and Tulkens P M (2002) Comparative Stability Studies of Antipseudomonal Beta-Lactams for Potential Administration Through Portable Elastomeric Pumps (Home Therapy for Cystic Fibrosis Patients) and Motor-Operated Syringes (Intensive Care Units). *Antimicrob Agents Chemother* **46**: pp 2327-2332.

von Eiff C, Proctor R A and Peters G (2000) Small Colony Variants of Staphylococci: a Link to Persistent Infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **113**: pp 321-325.

von Eiff C, Proctor R A and Peters G (2000) Staphylococcus Aureus Small Colony Variants: Formation and Clinical Impact. *Int J Clin Pract Suppl* pp 44-49.

Xuan D, Banevicius M, Capitano B, Kim M K, Nightingale C and Nicolau D (2002) Pharmacodynamic Assessment of Ertapenem (MK-0826) Against Streptococcus Pneumoniae in a Murine Neutropenic Thigh Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: pp 2990-2995.

The eradication of bacterial intracellular infections remains a real therapeutic challenge, because of (i) the recurrent character of these infections, (ii) the incapacity for humoral immune defences to gain access to intracellular bacteria and (iii) the necessity to use antibiotics able to accumulate in the infected compartment.

L. monocytogenes and *S. aureus* are able to multiply in distinct subcellular compartments, namely the cytosol (*L. monocytogenes*) and phagolysosomes (*S. aureus*). The current treatment for these infections consists in the administration of a beta-lactam (ampicillin, penem) in association with an aminoglycoside. However, due to their short half-life, beta-lactams need to be administered several times per day, which makes their use uneasy in the clinics.

In this work, we have studied the activity of ertapenem in models of intracellular infection by *L. monocytogenes* and *S. aureus* using THP-1 human macrophages. This molecule is characterized by a prolonged half-life as compared to most beta-lactams. Accordingly, it can be administered once-daily only, with sustained therapeutic serum levels can be obtained by a once daily administration.

In a first step, we have characterized the intrinsic activity (MIC, MBC) and the pharmacodynamic properties of ertapenem in broth, in comparison with that of ampicillin and meropenem. The three drugs showed a bacteriostatic activity against *L. monocytogenes* and a time- and concentration-dependent bactericidal activity against *S. aureus*. In a second step, we have compared the intracellular activity of these antibiotics. Ertapenem was unable to prevent the intracellular growth of *L. monocytogenes* while ampicillin and meropenem displayed a time-dependent bactericidal effect. In contrast, the three antibiotics proved equally active against intracellular *S. aureus*, with a bactericidal effect developing on a time- and concentration-dependent manner. In electron microscopy, intracellular *L. monocytogenes* actively multiplied in cells exposed to ertapenem, while the morphology of intracellular *S. aureus* was markedly affected.

To try to explain the contrasting effects of ertapenem in these two models, we have then studied (i) the cellular concentration of ertapenem, (ii) its stability, and (iii) its binding to serum proteins. None of these studies allowed us to provide a satisfactory explanation, since (i) ertapenem reached a cellular concentration above the MIC of *L. monocytogenes*, (ii) the stability of ertapenem was higher than that of meropenem, and (iii) ertapenem activity was not improved by a reduction of the percentage of serum in the culture fluid (10% to 2% so as to increase the free fraction).

