



HAL
open science

Production d'un peptide dérivé d'une endolysine de bactériophage et évaluation de sa toxicité sur un modèle de biofilm monoespèce de *Streptococcus mutans*

Lucas Stanislas Zaremba

► To cite this version:

Lucas Stanislas Zaremba. Production d'un peptide dérivé d'une endolysine de bactériophage et évaluation de sa toxicité sur un modèle de biofilm monoespèce de *Streptococcus mutans*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. dumas-04056345

HAL Id: dumas-04056345

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04056345v1>

Submitted on 3 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2023

Thèse n°31

THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR
EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Par Lucas, Stanislas ZAREMBA

Né le 9 Octobre 1997 à Schœlcher (972)

Le 27/03/2023

**Production d'un peptide dérivé d'une endolysine de
bactériophage et évaluation de sa toxicité sur un modèle de
biofilm monospèce de *Streptococcus mutans***

Sous la direction du Docteur Johan SAMOT

Présidente	Mme BOILEAU Marie-José	Professeur des Universités
Directeur	M. SAMOT Johan	Maître de Conférences des Universités
Rapporteur	Mme BADET Marie-Cécile	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	Mme AUSSEL Audrey	Maître de Conférences des Universités

UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ
01/01/2023

Président M. LEWIS Dean
Directeur de Collège des Sciences de la Santé M. PELLEGRIN Jean-Luc

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES

Directrice Mme BERTRAND Caroline 58-01
Directeur Adjoint à la Pédagogie M. DELBOS Yves 56-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche M. CATROS Sylvain 57-01
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales M. SEDARAT Cyril 57-01

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Sylvain	CATROS	Chirurgie orale	57-01
M.	Raphaël	DEVILLARD	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-01
M.	Jean- Christophe	FRICAIN	Chirurgie orale	57-01

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Cécile	BADET	Biologie Orale	57-01
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-01
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie orale	57-01
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M,	Jean- Christophe	COUTANT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M,	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Hélène	FRON-CHABOUIS	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Dominique	GILLET	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-01

M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-01
M.	Johan	SAMOT	Biologie Orale	57-01
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Rawen	SMIRANI	Parodontologie	57-01
Mme	Noélie	THEBAUD	Biologie Orale	57-01
M.	Eric	VACHEY	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01

PRATICIENS HOSPITALIER-UNIVERSITAIRE

M.	Pierre-Hadrien	DECAUP	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Julia	ESTIVALS	Odontologie pédiatrique	56-01

AUTRES ENSEIGNANTS

M.	Maxime	BOITEAUD	CDD 2e degré Santé publique	56-02
----	--------	----------	-----------------------------	-------

ASSISTANTS

M.	Adrien	AMELINE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	William	AUMAILLEY	Prothèse dentaire	58-01
M.	Baptiste	BERGES	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Virginie	CHUY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Diane	DELADRIERE	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Mathieu	DELOLME	Parodontologie	57-01
M.	Quentin	DESPERIEZ	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Laura	DONNET	Biologie Orale	57-01
Mme	Laurie	FUCHS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Joran	GARDIN	Parodontologie	57-01
M.	Paul	GIRARDEAU	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	Pierre-André	GUILLAUD	Parodontologie	57-01
M.	Louis	HUAULT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	Jean-Baptiste	IRIBARREN	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Aymeric	JOUBERT DU CELLIER	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Sarah	KAWCHAGIE	Prothèse Dentaire	58-01
Mme	Camille	LACAULE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Xavier	LAGARDE	Chirurgie Orale	57-01
M.	Clément	LEBRET	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Mathilde	LEVRIER	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Léa	MASSE	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Chiara	PASCALI	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Imane	RAMDANI	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Ana	RIBEIRO MAGALHES	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme	Florianne	VILLAT	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Clément	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

Remerciements

À notre Présidente de thèse

Madame le Professeur Marie-José BOILEAU
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Section Orthopédie dento-faciale – 56-01

Je vous remercie sincèrement de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et de mon profond respect. Même si je n'ai pas choisi la voie de l'orthodontie, j'ai aimé la qualité de vos enseignements qui sont à l'origine de votre renommée.

À notre Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Johan SAMOT
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Section Biologie Orale – 57-01

J'ai beaucoup apprécié vos enseignements et votre pédagogie à l'hôpital. Je vous remercie grandement pour vos conseils bienveillants car me diriger n'a pas toujours été facile. Malgré mes quelques difficultés à comprendre certains aspects de la microbiologie, vous m'avez toujours rassuré avec sérénité et rigueur dans ce travail. Je suis heureux d'avoir travaillé avec vous. Je vous souhaite une belle carrière hospitalo-universitaire.

À notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Marie-Cécile BADET
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Section Biologie Orale – 57-01

Je vous remercie pour la qualité de vos enseignements, votre présence au laboratoire ainsi que votre réactivité pour rédiger le rapport de ma thèse. Vous avez su vous montrer disponible pour moi et m'avez de façon bienveillante conseillé sur mon travail. Permettez-moi de vous exprimer ici toute ma reconnaissance et mes sentiments les plus respectueux.

À notre Assesseur

Madame le Docteur Audrey AUSSEL
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Sciences anatomiques et physiologiques – 58-01

Merci pour le dévouement que vous montrez aux étudiants. Votre exercice à l'hôpital et vos enseignements me confortent dans l'idée que pour vous, transmettre est une passion. Vous le faites avec humour et une grande tolérance. Je garde un souvenir spécial de séances d'hypnose auprès de jeunes enfants qui m'ont beaucoup impressionnées. Merci pour votre aide précieuse dans les derniers jours de ce travail.

Aux membres du jury,

Je vous remercie profondément d'avoir pris en compte ma situation personnelle. Ce geste envers moi me touche infiniment et je vois en vous beaucoup d'humanité et d'empathie.

À mes parents que j'aime,

Maman, tu es la personne la plus forte que je connais. Ton caractère doux et ta résilience font de toi une femme, une mère exceptionnelle. Tu m'as guidé vers une vie d'adulte accompli avec beaucoup de détermination et de tolérance. J'espère un jour te ressembler.

Papa, Tatus, tu m'as transmis des valeurs fortes de générosité et curiosité. J'ai toujours admiré ta culture sans bornes, ta dextérité hors et dans ton métier. Notre quotidien a récemment été chamboulé par ta soudaine et violente maladie. Sache que peu importent les conséquences, je serai toujours là pour toi et suis prêt à sacrifier beaucoup pour que tu ailles bien. Sache aussi qu'en ton absence nous avons su rester dignes de toi. Je tiens tellement à toi, nous avons encore tant à vivre ensemble. Sois fort comme tu l'as toujours été. Je t'aime.

À Edwige,

Merci de me soutenir dans les bons comme dans les mauvais jours. Pour ce que nous avons déjà vécu, et pour toutes les belles choses qui nous restent à vivre. Merci. Une belle vie nous attend. Je t'aime.

À mes sœurs, Anna et Eva,

Vous êtes si différentes, mais je vous aime avec la même force.

À Thibaud et Apolline,

Je vous remercie d'être entrés dans la famille. Vous apportez de la joie dans ma vie.

À mes amis de dentaire,

Avant de m'engager dans ces études, je n'aurais jamais pensé croiser le chemin d'amis si chers. Vous êtes de ma famille. Je suis sûr qu'on continuera à fêter la vie encore très longtemps ensemble. À mes frères et mes sœurs : Léo, Julian, Julien, Tom, Maxime, Martin, Gonzague, Clément, Dilli, Freitas, Vincent, Guillaume, Claire, Sophie, Sarah, Marie, Chloé, Céline, Hortense et bien d'autres...

À Julia,

Merci pour ton soutien et ta douceur. Tu es une grande amie.

À mes amis de toujours,

Etienne, Maïlys, Louis, Brian, Alizée. Partout où vous êtes, même si on ne se voit pas souvent, nous sommes liés. Je pense à vous.

À ma famille,

De Pologne ou de France, je pense à vous tout le temps. Le lien familial est sacré, les épreuves de la vie nous le rappellent.

À Ghislaine et Thierry,

Vous qui me voyez depuis maintenant près de 4 ans, je vous remercie de tout cœur d'être là pour moi.

Merci aux Docteurs Cédric Hardy et Stéphanie Carrier qui ont été des mentors pour moi. Merci à Éric et Simin Normand de m'avoir accueilli dans leur cabinet et pour leur aide précieuse.

Table des matières

Table des illustrations	7
Table des abréviations	8
Introduction	9
1 État des connaissances	10
1.1 Rappels sur la formation de la carie	10
1.2 Rappels sur <i>Streptococcus mutans</i> : implication dans la maladie carieuse et facteurs de virulence	13
1.3 Rappels sur la phagothérapie	17
1.3.1 Présentation des phages thérapeutiques	17
1.3.2 Les endolysines	24
1.3.3 Les peptides antimicrobiens de synthèse	28
1.1.2 La phagothérapie dans la lutte contre les maladies infectieuses orales	30
2 Etude expérimentale	34
2.1 Objectifs	34
2.2 Matériels et méthodes	34
2.2.1 Matériels	34
2.2.2 Méthodes	35
1.2 Résultats	37
1.2.1 Sélection du peptide à tester	37
1.2.2 Optimisation du peptide	37
1.2.3 Tests d'inhibition de croissance	38
1.2 Discussion	42
Conclusion	46
BIBLIOGRAPHIE	47
ANNEXES	53

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation schématique de la formation du biofilm dentaire adapté de Hojo et al. (20)	11
Figure 2 : Schéma de structure de la paroi d'une bactérie Gram+ (17)	13
Figure 3 : Schéma de la structure du peptidoglycane (17)	14
Figures 4a. et 4b. : Adhérence des s. mutans à la pellicule acquise exogène et coaggrégation interbactérienne a) saccharose-indépendante. b) saccharose-dépendante. (19)	16
Figure 5 : Nombre d'articles consacrés au bactériophage et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011 (26)	18
Figure 6 : Schéma d'un bactériophage caudé de type T4 (25)	19
Figure 7 : Cycles lytique et lysogénique (29)	21
Figure 8 : Phages M-102 en microscopie électronique (7)	33
Figure 9 : Description du génome du phage M-102 par van der Ploeg (7) ;	34
Figure 10 : Séquence peptidique de l'ORF 19 agrandie et recherche de sites actifs (entourés en rouge)	37
Figure 11 : Résultats de l'analyse de prédiction microbienne	38
Figure 12 : Suivi de la croissance bactérienne en présence du peptide "Minilysine" à 4mg/mL	40
Figure 13 : Suivi de la croissance bactérienne en présence du peptide "Minilysine" à 8mg/mL	41

Tableaux

Tableau 1 : Facteurs de virulence de S. mutans	15
Tableau 2 : Tableau comparatif illustrant les principales caractéristiques des thérapies phagiques en comparaison avec les antibiotiques Adapté de Knoll et al. 2014 (29)	28
Tableau 3 : Illustration des principaux travaux scientifiques sur les phages de S. mutans retrouvés dans la littérature	32
Tableau 4 : Relevé des mesures de Densité Optique (DO) en présence du peptide "Minilysine" dosé à 4mg/mL	39
Tableau 5 : Relevé des mesures de Densité Optique (DO) en présence du peptide "Minilysine" dosé à 8 mg/mL	40

Table des abréviations

ADN Acide Désoxyribonucléique

AMP Antimicrobial peptide

ATCC American Type Culture Collection

CBD Cell Wall Binding Domain

CSP Competence Stimulating Peptide

DO Densité Optique

EAD Enzymatic Activity Domain

EDTA Acide ethylènediaminetétraacétique

FDA Food and Drug Administration

GTF Glycosyltransférase

HSV Herpes Simplex Virus

IST Infection Sexuellement Transmissible

LTA Acide Lipoteichoïque

ORF Open Reading Frame

PAE Pellicule Acquisée Exogène

TS Tryptone Soja

UFC Unité Formant Colonie

UV Ultra-Violet

VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

La carie dentaire représente l'infection orale la plus répandue dans le monde (1, 2). Le traitement et la prévention de cette maladie constituent donc un défi en matière de santé publique. Cette maladie d'origine multifactorielle est due à la déminéralisation des tissus durs de la dent sous l'action de bactéries cariogènes présentes dans le biofilm dentaire. Parmi elles, la bactérie *Streptococcus mutans* joue un rôle primordial dans l'initiation de la maladie carieuse (3).

Les moyens actuels de prévention chez l'Homme contre les bactéries cariogènes ont comme défaut principal de ne pas cibler d'espèce virulente en particulier et d'éliminer aussi bien des bactéries pathogènes que des bactéries commensales non-pathogènes (4).

De plus, avec l'incidence accrue de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques depuis la fin du XXe siècle, les scientifiques sont contraints de s'orienter vers des thérapies antimicrobiennes plus spécifiques aux micro-organismes pathogènes (5). Dans ce contexte, l'utilisation de virus naturellement présents dans le monde vivant ciblant les bactéries, les bactériophages, représente une alternative aux antibiotiques.

Les bactériophages peuvent infecter spécifiquement une bactérie, perturber leur métabolisme et provoquer leur lyse (4). À la fin de ce cycle de reproduction dit « lytique », les phages libèrent leur descendance en détruisant la paroi bactérienne grâce à des enzymes spécifiques, les endolysines (6).

Si les chercheurs se sont concentrés sur l'utilisation de phages entiers depuis le début du XXe siècle (5), les endolysines de synthèse constitue un axe de recherche prometteur et innovant dans la phagothérapie (6). L'utilisation de leurs propriétés lytiques appliquée aux bactéries pathogènes des biofilms oraux telles que *S. mutans* aurait un intérêt dans la prévention de la maladie carieuse.

À ce jour, le génome de 4 phages de *S. mutans* isolés à partir de salive humaine ont été séquencés et sont disponibles dans la littérature (4), parmi lesquels se trouve celui du phage M-102 (7).

L'objet de ce travail est de tester l'hypothèse selon laquelle un peptide de synthèse correspondant à un site actif modifié d'endolysine du phage M-102 aurait une activité antimicrobienne envers un modèle de biofilm de *S. mutans*.

1 État des connaissances

1.1 Rappels sur la formation de la carie

La maladie carieuse est d'origine bactérienne et d'étiologie multifactorielle (8, 9). Elle fait intervenir des bactéries pathogènes organisées au sein d'un biofilm oral, la plaque dentaire. Ce biofilm se définit comme un ensemble de micro-colonies bactériennes adhérant entre elles et à la surface des dents, incluses dans une matrice tridimensionnelle adhésive constituée de polysaccharides d'origine microbienne et salivaire (10, 11, 12). Cette forme d'organisation protège les bactéries d'agressions extérieures et leur permet de croître, se multiplier, communiquer entre elles et avec d'autres espèces tout en se protégeant des prédateurs, dans un environnement qui peut être hostile (13).

Lorsque le biofilm est en condition d'anaérobiose (11), les bactéries cariogènes par leur métabolisme fermentaire utilisent les glucides alimentaires comme substrat et relarguent des acides organiques, principalement de l'acide lactique (acidogénèse). La chute du pH à l'interface de la plaque et de la dent provoque la dissolution de l'hydroxyapatite constitutive des tissus durs de la dent (émail, dentine, cément) et ainsi leur destruction localisée, les mécanismes de défense de l'organisme étant dépassés (9). Le processus carieux peut être décrit comme le résultat d'un déséquilibre prolongé dans la cavité buccale, où les facteurs favorisant la déminéralisation de la dent l'emportent sur ceux qui facilitent sa reminéralisation (14).

Parmi le nombre considérable d'espèces retrouvées dans le biofilm dentaire, on distingue principalement 3 genres de bactéries impliqués dans le processus carieux (15):

- Le groupe *Streptococcus mutans*, retrouvé essentiellement dans l'initiation de la carie ;
- Le genre *Lactobacillus*, surtout impliqué dans la progression de la carie ;
- Le genre *Actinomyces*, essentiellement retrouvé dans les caries radiculaires ;

On s'intéressera dans cette étude à la bactérie *S. mutans*.

Pour rappel, la formation du biofilm dentaire (figure 1) est un processus dynamique complexe qui se fait par différentes étapes :

- 1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)
- 2. Colonisation bactérienne : Fixation des bactéries pionnières puis secondaires
- 3. Maturation du biofilm
- 4. Détachement cellulaire

Lors de l'étape de colonisation du biofilm, les bactéries pionnières fixent d'autres bactéries ou groupes de bactéries par des phénomènes de coaggrégation dont les bactéries *S. mutans*. Des phénomènes de co-adhésion viennent intensifier la colonisation et permettre son augmentation en volume et en taille (16). Ces bactéries adhérentes au biofilm vont permettre de complexifier la structure : elles synthétisent des polymères extra-cellulaires ce qui forme la matrice extra-cellulaire, qui renforce la cohésion de la plaque (17, 18, 19).

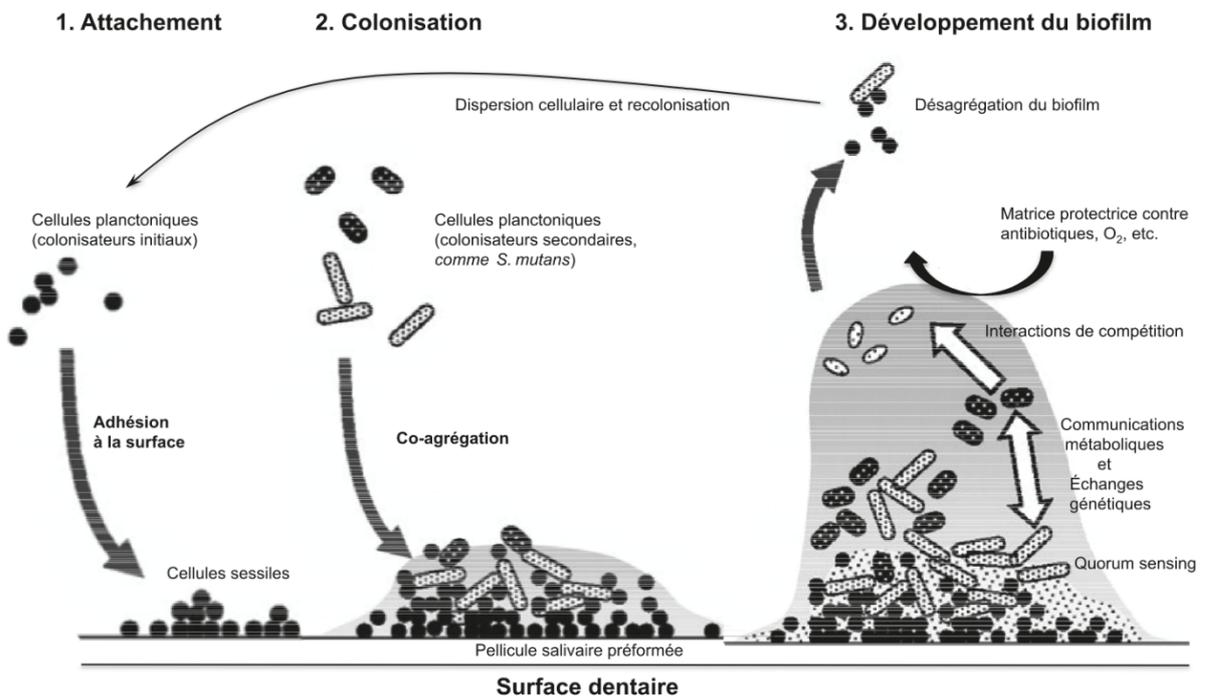


Figure 1 : Représentation schématique de la formation du biofilm dentaire adapté de Hojo et al. (20)

La maturation dans le biofilm offre une protection contre les antibiotiques et les facteurs de stress environnementaux de deux manières : la barrière physique formée par la matrice extracellulaire, empêche la pénétration des agents antimicrobiens dans le biofilm ; et des mécanismes de communication bactérienne stimulent les bactéries à produire des enzymes et des protéines importantes pour l'adaptation physiologique du biofilm (21). En raison de son implication dans les infections bucco-dentaires, la lutte contre ces organismes pathogènes organisés en biofilms représente donc l'enjeu principal dans le contrôle de la maladie carieuse (22).

De nos jours, l'élimination du biofilm dentaire se fait principalement par le biais de moyens mécaniques (brosse à dent, brossettes, fil dentaire, détartrage professionnel). Cette action mécanique peut être combinée à l'utilisation d'agents chimiques antimicrobiens contenus dans le dentifrice ou utilisés en bain de bouche comme la chlorhexidine, qui a la propriété d'inhiber la colonisation et la croissance bactérienne (18). Ces mesures de contrôle de plaque non-spécifiques aux bactéries cariogènes (7) ont le défaut de manquer de sensibilité : elles ne sont pas spécifiques à une espèce bactérienne et éliminent aussi bien des espèces pathogènes que des espèces commensales, qui sont protectrices contre la formation de biofilms pathogènes (23).

De nouvelles stratégies émergent, visant à minimiser le risque de résistance bactérienne et essayant de provoquer une éradication bactérienne rapide, tout en maintenant l'homéostasie biologique de la flore bactérienne orale et la santé des tissus de l'hôte. Ces stratégies spécifiques aux espèces pourraient alors compléter le contrôle mécanique de la plaque dentaire.

1.2 Rappels sur *Streptococcus mutans* : implication dans la maladie carieuse et facteurs de virulence

Les streptocoques oraux représentent environ 20% des bactéries buccales. Ils font partie de la flore commensale de la cavité orale et jouent un rôle important dans le développement de la plaque dentaire. Ils peuvent aussi être impliqués dans les endocardites suite à des traitements dentaires ou des pneumopathies (13).

Ils sont divisés en quatre groupes phylogéniques : *salivarius*, *anginosus*, *mitis* et *mutans*. On parle de « *mutans* » car leur structure passe de cocci à cocco-bacille. Les bactéries du groupe *mutans* nichent principalement à la surface des dents. Elles sont immobiles, non sporulées, non encapsulées, de type aéro-anaérobie facultatif, à catalase négative, Gram+, de diamètre 0,7 à 0,9 μ m (13).

Les *S. mutans* sont classés selon 4 sérotypes : c, e, f, et k, une classification basée sur la composition chimique de leur polysaccharide spécifique au sérotype ; de 70 à 80% des souches trouvées dans la cavité orale sont de sérotype c, 20% sont de sérotype e les sérotypes f et k représentent chacun moins de 5% (13).

Leur présence est liée à l'éruption des dents et on suppose leur origine par une transmission de mère à l'enfant. Ces bactéries sont capables de produire des acides forts et de résister à un environnement très acide. Ce sont des bactéries qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la lésion carieuse et dans les récives sous obturation (9, 13).

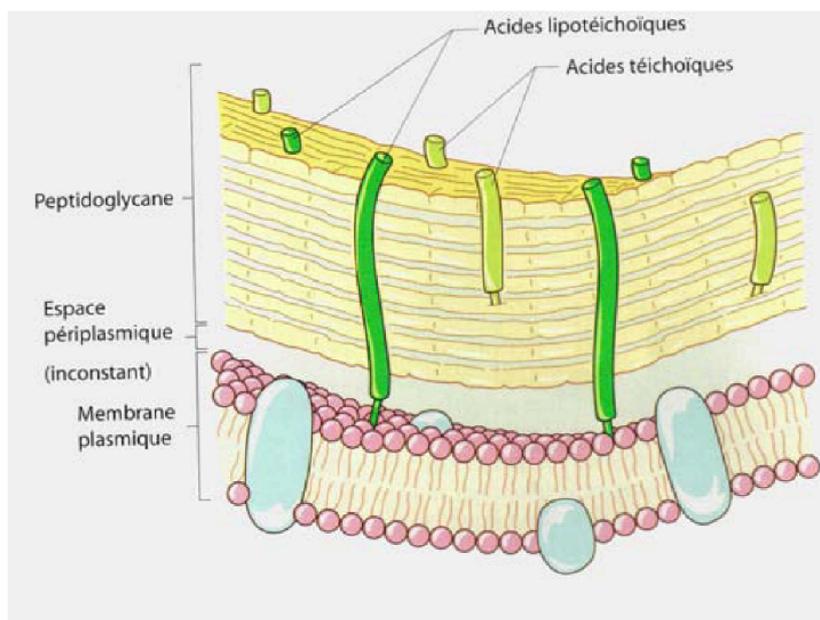


Figure 2 : Schéma de structure de la paroi d'une bactérie Gram+ (17)

S. mutans, en tant que bactérie Gram+, a une paroi épaisse constituée essentiellement de peptidoglycane (Figure 2), les autres constituants sont les acides teichoïques et les acides lipoteichoïques (LTA). Ce peptidoglycane (figure 3) est composé d'une partie glucidique (polysaccharide) et d'une partie peptidique : il s'agit d'un enchainement de maillons de N-acétylglucosamines et d'acides N-acétylmuramiques, reliés ensemble par des chaînes et ponts peptidiques. Il est sensible au lysozyme, qui découpe les chaînes glucidiques, aux antibiotiques (dont les bêtalactamines), aux désinfectants (phénol) et il est antigénique.

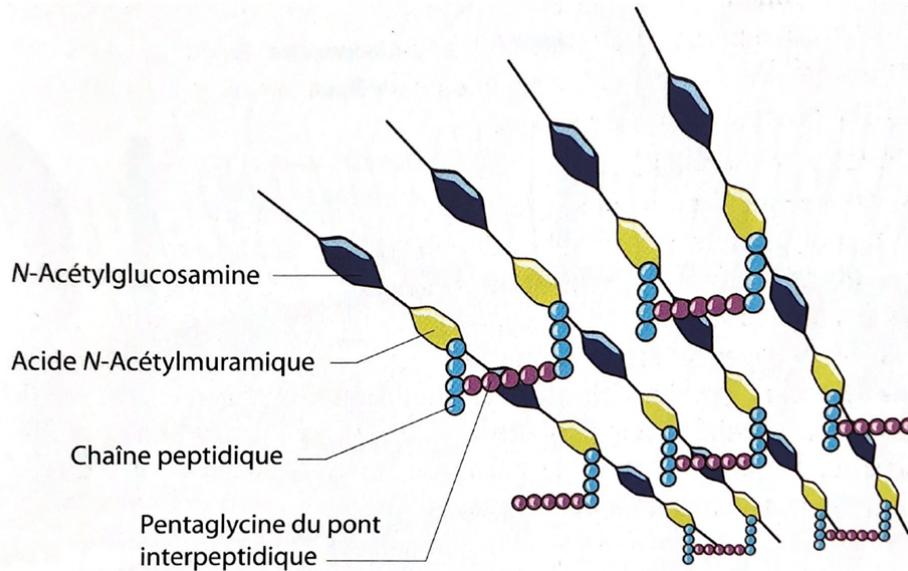


Figure 3 : Schéma de la structure du peptidoglycane (17)

Facteurs de virulence (19)

Les *S. mutans* ont de nombreux facteurs de virulence qui leur confèrent un pouvoir cariogène et un avantage écologique sur les autres bactéries du biofilm. Ce sont des bactéries acidogènes et acidotolérantes responsables de la déminéralisation des tissus dentaires et capables de résister à un pH faible. Elles sont aussi capables de synthétiser des polysaccharides extra-cellulaires nécessaires à leur adhésion aux surfaces dentaires mais aussi des polymères intracellulaires permettant de constituer une réserve d'énergie.

Ces facteurs de virulence sont résumés dans le tableau suivant (19):

Facteurs de virulence	Rôle
Synthèse de polymères extra cellulaires	Adhésion aux surfaces dentaires
Synthèse de polymères intracellulaires (glycogène)	Survie bactérienne Production d'acides lors de carence en saccharose
Acidogénèse : production d'acides	Déminéralisation des tissus dentaires
Acidotolérance : résistance aux acides	Survie en milieu acide
Production de dextranases (glycane hydrolases) ou fructanases inductibles	Apport de glucose ou fructose en cas de carence en nutriments par hydrolyse des polymères extracellulaires

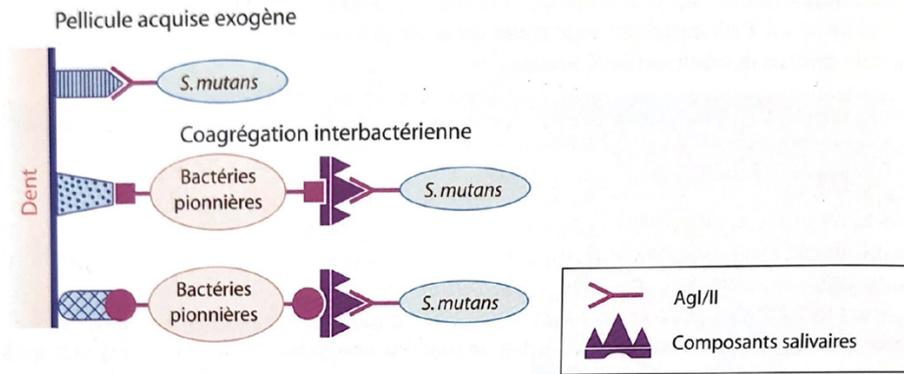
Tableau 1 : Facteurs de virulence de *S. mutans*

Le facteur qui apporte véritablement un avantage sélectif est la **capacité à adhérer aux surfaces dures**, ce qui leur permet de se multiplier et de résister aux contraintes de la cavité orale.

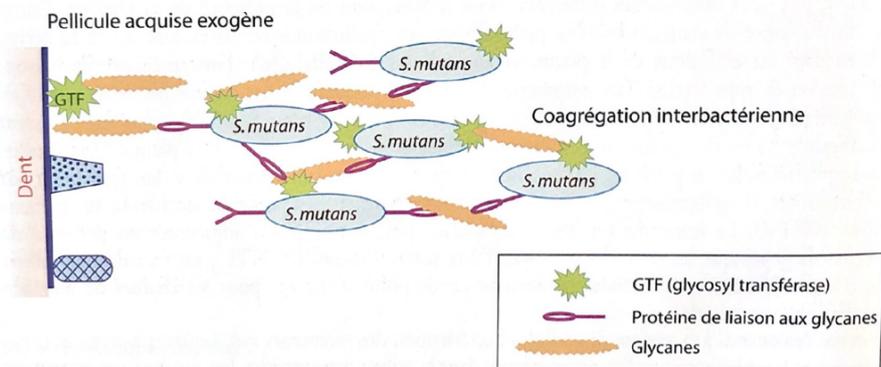
Ces phénomènes d'adhésion sont obtenus par des mécanismes différents : l'un dépendant du saccharose, l'autre indépendant du saccharose. Ils permettent de se lier à la Pellicule Acquise Exogène et aussi d'obtenir une coaggrégation interbactérienne.

- En l'absence de saccharose, la bactérie utilise des liaisons ioniques ou de type lectine pour adhérer aux protéines salivaires, aux autres bactéries, à la matrice extracellulaire de la plaque dentaire (figure 4a). Cette liaison se fait grâce aux adhésines présentes à la surface de la bactérie (antigènes I/II) qui reconnaissent un récepteur salivaire de la Pellicule Acquise Exogène ou la plaque, l'agglutinine. Ce sont des liaisons de type ligand/récepteur.

- En présence de saccharose, *S mutans* présente à sa surface des glycosyltransférases (GTF) qui synthétisent des polymères de glycanes (figure 4b). Ces glycanes étant fortement adhérents à la surface dentaire, vont ainsi maintenir la bactérie par l'intermédiaire de la liaison glycosyl-transférase/polymère formée. Ce sont des liaisons de type enzyme-substrat. Les glycanes insolubles produits à partir du saccharose, augmentent la porosité de la plaque et permettent une pénétration plus profonde des sucres à travers le biofilm, et donc une production plus importante d'acides près de la surface dentaire (19).



a. Saccharose-indépendante.



b. Saccharose-dépendante.

Figures 4a. et 4b. : Adhérence des *S. mutans* à la pellicule acquise exogène et coagrégation interbactérienne a) saccharose-indépendante. b) saccharose-dépendante. (19)

On attribue donc à *S. mutans* un pouvoir cariogène fort surtout dans l'initiation de la lésion, permise par son action au sein du biofilm, qui joue un rôle de protection des bactéries cariogènes (24):

- Il piège les acides relâchés par les bactéries cariogènes de la plaque.
- il limite l'accès des tampons salivaires à la surface dentaire en contact avec ces acides déminéralisants.
- Il filtre les particules : à partir d'une certaine épaisseur de biofilm, les grosses molécules pénètrent plus difficilement, tandis que les petites molécules comme le saccharose, substrat de prédilection de *S. mutans*, restent accessibles aux bactéries cariogènes situées en profondeur.

1.3 Rappels sur la phagothérapie

1.3.1 Présentation des phages thérapeutiques

1.3.1.1 Définitions

Les bactériophages, ou phages, sont des virus naturellement présents dans le monde vivant qui envahissent uniquement les bactéries. Comme tout virus, ils ne peuvent se multiplier qu'aux dépens de cellules vivantes qu'ils parasitent. Cependant, ils forment un groupe particulier de virus, car ils n'utilisent que les constituants des cellules procaryotes bactériennes pour se multiplier. Certains bactériophages (dits bactériophages lytiques) peuvent détruire les bactéries, perturbant leur métabolisme et les entraînent vers la lyse, tout en étant inoffensifs pour les cellules humaines, animales et végétales (cellules eucaryotes) (25). D'autres peuvent s'intégrer au chromosome bactérien puis s'activer et détruire la bactérie lorsque celle-ci subit un stress (on parle de bactériophages tempérés). La bactérie qui est infectée par un bactériophage est appelée « bactérie hôte ». Les bactériophages ont la propriété d'être étroitement spécifiques : ils ne s'attaquent qu'à une espèce bactérienne précise ou à quelques individus de cette espèce et ne peuvent survivre qu'aux dépens de cette espèce. Par contre, plusieurs bactériophages différents peuvent être spécifiques d'une même bactérie.

Bien que peu connus du grand public, ils constituent la biomasse la plus importante du vivant (26), et font l'objet de nombreux travaux de recherche. Les bactériophages sont en effet présents partout dans le monde vivant et ils interagissent fortement au sein des environnements naturels ; plus particulièrement, ils entretiennent une relation avec les bactéries qu'ils infectent : cette dynamique est appelée co-évolution adaptative. Il existe une lutte mortelle depuis des centaines de millions d'années, où chaque partie tente de prendre le dessus sur l'adversaire. Cela a permis au bactériophage d'être spécialisé et de se doter d'excellentes propriétés qui ont pu être exploitées par l'Homme. Leur étude a permis de grandes avancées scientifiques (6, 25).

La phagothérapie désigne l'utilisation de bactériophages afin de traiter et de guérir des infections bactériennes. Elle met à profit la propriété destructrice, ou lytique d'un bactériophage vis à vis d'une bactérie pathogène. La phagoprophylaxie est, par analogie, la prévention de l'apparition d'une maladie infectieuse par l'utilisation de phages (25).

1.3.1.2 Historique des phages thérapeutiques (26)

Les bactériophages ont été découverts en premier grâce aux travaux de F. Twort (1915), mais c'est le biologiste de l'Institut Pasteur Félix d'Hérelle (1917) qui a compris leur intérêt et promu leur utilisation en tant que thérapie anti-infectieuse. En témoignent les résultats de thérapies expérimentales qu'il a menées pour traiter la dysenterie chez des jeunes enfants. L'utilisation thérapeutique de phages a ensuite été fréquente durant le début du XXe siècle notamment pour soigner la peste et le choléra sous l'impulsion de d'Hérelle dans les années 1920, puis des maladies dues aux *Staphylococci*, *Streptococci* ou à *Escherischia coli*.

Mais suite à la découverte de la pénicilline par Fleming en 1928, et la généralisation de l'antibiothérapie pour répondre à la demande immense en traitements anti-infectieux durant la Seconde Guerre mondiale, la phagothérapie a été quelque peu délaissée dans les pays de l'Ouest pour surtout persister dans les pays du bloc de l'Est, surtout en Géorgie et en Pologne.

Par la suite, avec le mésusage des molécules antibiotiques et l'apparition conséquente de souches bactériennes résistantes vers la fin du XXe siècle, les thérapies à base de phages ont vu un regain d'intérêt jusqu'à nos jours. Des travaux de recherche concernant les phages thérapeutiques se sont récemment multipliés, comme en témoigne le nombre d'études croissant concernant les bactériophages (figure 5).

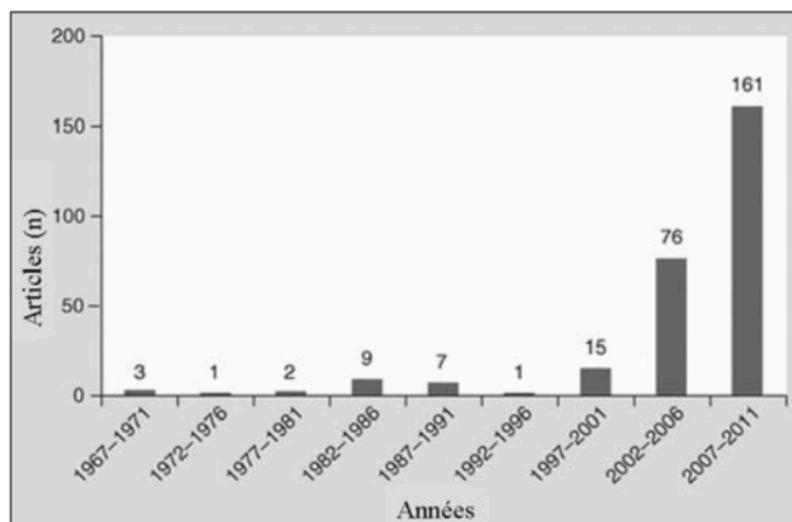


Figure 5 : Nombre d'articles consacrés au bactériophage et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011 (26)

1.3.1.3 Fonctionnement des phages thérapeutiques : structure, phages lytiques et phages tempérés, cycle de réplication, procédés de fabrication (26, 27)

Structure

S'il existe différentes formes de bactériophages, la structure commune est la même. Elle comporte au minimum : le matériel génétique, en général contenu dans une capsid, un dispositif d'arrimage à la bactérie cible et un dispositif d'injection du matériel génétique dans la bactérie.

Taille

Les bactériophages sont des micro-organismes de très petite taille, de l'ordre de la taille des virus entre 60 et 300 nm, ils ne sont donc visibles formellement que par microscopie électronique.

Taxonomie

Les phages sont classés en 13 familles selon leur morphologie, leur type d'acide nucléique, selon la présence d'enveloppe ou de lipide. La majorité des phages sont des phages à queue, composée d'une tête icosaédrique et d'une queue.

Parmi les milliers de phages décrits, 95% d'entre eux appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*, des virus à ADN double brin non enveloppés (28). Parmi les *Caudovirales*, les bactériophages lytiques sont classés en trois familles principales selon la morphologie de leur queue : les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*. Le phage le plus étudié est le bactériophage T4 spécifique de *E. coli* appartenant à l'ordre des *Myoviridae* (figure 6).

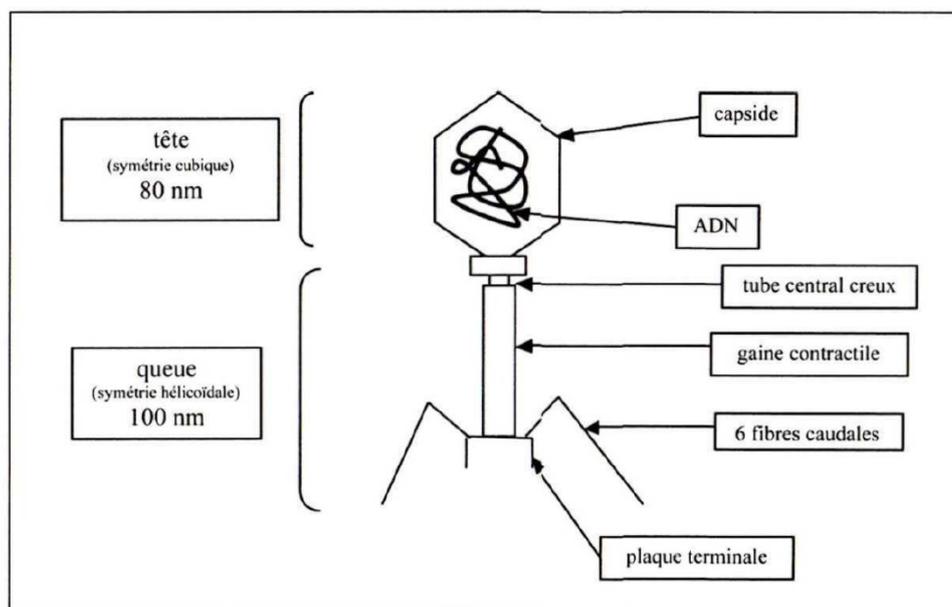


Figure 6 : Schéma d'un bactériophage caudé de type T4 (25)

1.3.1.4 Cycles de réplication

Le but du phage est comme tout virus d'infecter une cellule hôte. Il s'arrime à la paroi, libère son matériel génétique dans la cellule bactérienne et utilise sa machinerie cellulaire pour produire des virions. Ainsi, les bactériophages utilisent différents types de cycles infectieux, dépendants des informations codées dans leurs génomes et de l'état métabolique des cellules infectées. On distingue alors principalement les cycles : **lytique** et **non lytique** (26).

- Les phages **non lytiques ou tempérés** entrent dans un cycle dit « lysogénique » durant lequel ils intègrent leur matériel génétique au génome bactérien. Ils peuvent rester quiescents pendant très longtemps, tapis dans le génome bactérien, à l'état de prophage. Leur capacité de reproduction se fait au rythme de la bactérie qu'ils envahissent. Le génome viral est ainsi dupliqué à chaque division cellulaire et transmis à la descendance (28). Quand l'hôte bactérien se trouve dans une situation où l'ADN peut être dégradé, c'est-à-dire une situation de stress (stress oxydatif, état métabolique, stress nutritif, rayons UV, choc thermique, quorum sensing, antibiotiques...), il change d'état, excise son génome et entre dans le cycle lytique, aboutissant à la destruction de la cellule hôte. Ces phages tempérés ne sont pas utilisés en thérapeutique mais comme auxiliaires en biologie moléculaire, car ils contribuent aux échanges de matériel génétique entre bactéries (transduction).

- Les **phages lytiques ou virulents** suivent un cycle dit lytique : il s'agit d'un processus d'infection par lequel ils se multiplient exponentiellement dans la bactérie jusqu'à entraîner sa lyse (Figure 7). Ce sont eux que l'on utilise en thérapie. Un fois que l'ADN est injecté dans le cytoplasme bactérien, des gènes précoces sont transcrits et traduits, permettant de constituer rapidement de nouveaux virions en détournant les mécanismes de défense de l'hôte. En fin de cycle, les virions nouvellement formés sont libérés grâce à l'éclatement de la cellule dû à la destruction de la paroi bactérienne grâce à des enzymes.

Plus rarement, les phages peuvent entrer dans des cycles pseudo-lysogéniques et infectieux chroniques (28).

Le cycle lytique comporte différentes phases décrites dans la figure 7 :

- 1) Arrimage, fixation du phage sur la bactérie grâce à des récepteurs spécifiques au phage et à l'espèce bactérienne à laquelle il s'attaque.
 - 2) Perforation de la paroi et de la membrane bactériennes à l'aide d'enzymes contenues dans le phage.
 - 3) Injection de l'ADN du phage dans le cytoplasme bactérien, le plus souvent à l'aide des molécules contractiles du fourreau, qui se comporte ainsi comme une seringue.
 - 4) Production avec fragmentation de l'ADN bactérien et utilisation de celui-ci pour synthétiser les éléments constitutifs des futurs phages.
 - 5) Maturation et assemblage des différents éléments produits.
 - 6) Éclatement de la bactérie et libération des phages dans le milieu. Cette étape conduit à la mort bactérienne et à la production de 50 à 100 clones du phage original pour chaque cycle lytique.
- Le cycle lytique produit ainsi un phénomène d'amplification considérable puisque pour une bactérie attaquée, il y a plus de 50 phages produits.

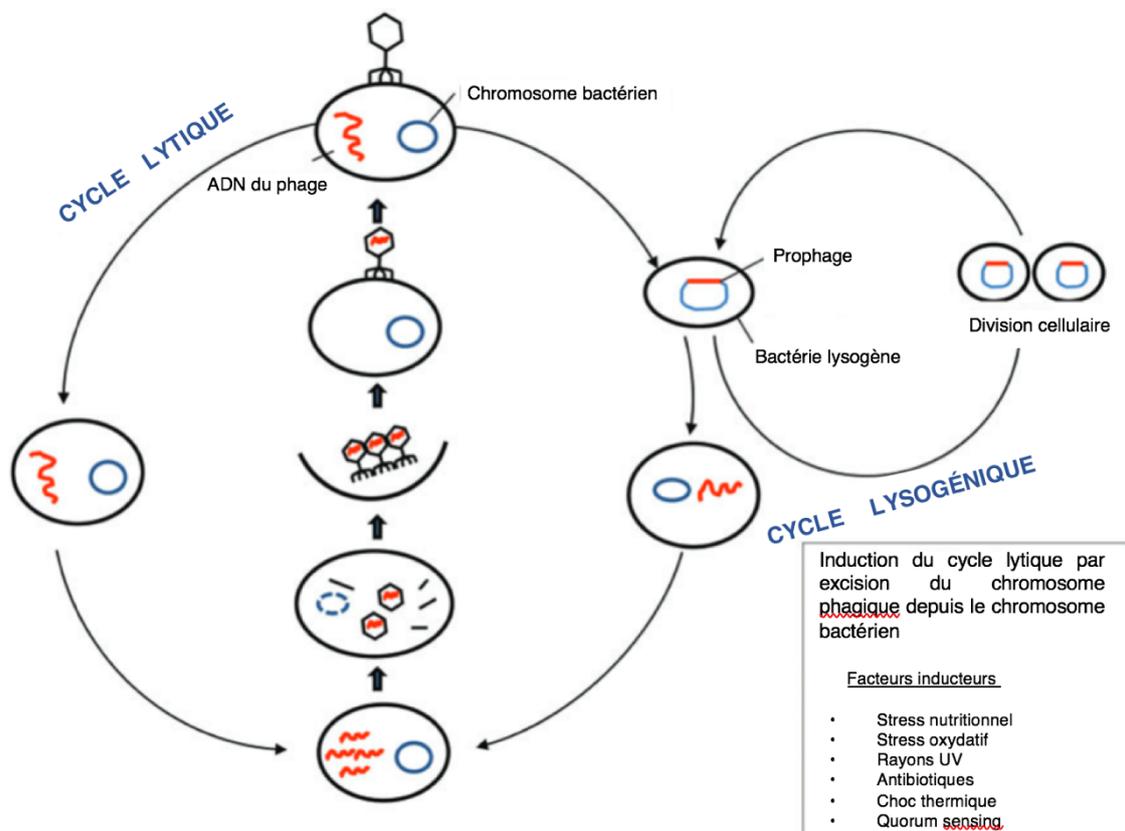


Figure 7 : Cycles lytique et lysogénique (29)

1.3.1.5 Domaines actuels d'application des phages

La découverte des phages a été un pilier dans la **recherche biologique** car cela a permis de comprendre des phénomènes génétiques importants comme la transduction : les phages peuvent être des vecteurs de clonage permettant le transfert de gènes d'une bactérie à une autre. Par ailleurs, la découverte de l'ADN a en partie été permise grâce à l'étude de phages (Hershey-Chase en 1952) (26).

Dans le domaine de la **médecine**, des phages sont utilisés en thérapie : la phagothérapie s'est principalement développée au centre Eliava à Tbilissi en Géorgie depuis les années 1930. Par exemple, Pyo® bacteriophages est un cocktail de phages qui agit contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* (30). Il est utilisé dans les cas d'infections purulentes, d'infections urinaires et digestives, et pour les bronchopneumonies. On peut également citer le cocktail Intesti® bacteriophages, utilisé en prophylaxie et en thérapie contre les infections intestinales dues à *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, et *E. coli* (30). Ces préparations ne sont pas utilisées en occident par manque de bonnes pratiques de fabrication (23). Concernant l'usage de phages dans le monde occidental, certains auteurs ont mené récemment des études respectant les bons procédés de fabrication correspondant aux standards occidentaux. Wright et al. en 2009 rapportent des résultats positifs sur l'efficacité et la sécurité d'un cocktail de phages appliqué en topique sur des patients souffrant d'otite chronique due à la bactérie multi-résistante *P. aeruginosa* dans un essai clinique contrôlé en double aveugle de phase I/II (31). PhagoBurn® est le premier exemple d'utilisation de phages sur des patients brûlés dans un essai clinique randomisé, contrôlé, en double aveugle en phase I-II. Il a pour but de tester l'efficacité de différents cocktails de phages pour le traitement de brûlures infectées par *E. coli* et *P. aeruginosa* en accord avec les bons procédés de fabrication occidentaux (32).

Enfin, dans le domaine de la **sécurité alimentaire et l'agriculture**, l'adoption des technologies à base de phages a été rapide, depuis les années 2000 avec plusieurs produits approuvés disponibles dans le commerce : des cocktails de phages lytiques peuvent être utilisés pour prévenir de contaminations bactériennes sur la viande (dirigés contre *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella*) (21, 31).

1.3.1.6 Principes de la phagothérapie (27, 31, 32)

Cette pratique a pour principe d'utiliser les propriétés prédatrices naturelles des phages pour éliminer les populations bactériennes pathogènes, en les mettant au contact direct sinon au plus proche des sites d'infections.

Il existe plusieurs manières d'utiliser les phages en thérapie :

- De façon analogue aux antibiogrammes, on peut utiliser des **phagogrammes** ou bactériophagogrammes pour choisir le phage correspondant à la bactérie étudiée. Une fois isolée, la bactérie que l'on étudie est testée *in vitro* grâce aux nombreux phages disponibles dans des phagothèques. Après incubation des bactéries avec les phages, on observe les plages de lyse obtenues sur la gélose et on détermine ainsi les phages vis-à-vis desquels la bactérie s'avère sensible. Avant l'étape du traitement, il est cependant nécessaire d'adapter le phage à la bactérie pour le rendre le plus efficace possible contre elle, de produire artisanalement une quantité de phages suffisante, de créer à partir d'eux les suspensions et de les tester pour s'assurer de leur innocuité et de leur pureté via des tests bactériologiques et des inoculations à des animaux. Toutes ces étapes ne sont pas compatibles avec le traitement d'une infection aiguë. Il n'est donc envisageable de prendre le temps de préparer ce genre de traitement que pour les infections chroniques.

- Il est possible d'administrer un **cocktail de bactériophages**. Ce sont des mélanges bien établis et caractérisés de plusieurs bactériophages destinés à combattre les infections bactériennes les plus courantes. On distingue les cocktails selon les atteintes et les appareils pour lesquels ils sont préconisés (appareil digestif, urinaire ...). Ces cocktails présentent les avantages de couvrir un large spectre, de générer peu de résistances et d'être compatibles avec une utilisation en urgence, puisque déjà prêts. Cependant, ce sont des préparations « standard » qui ne sont pas forcément les plus appropriés lors d'infections atypiques. Dans ces derniers cas, il vaut mieux privilégier une méthode plus ciblée où les phages auront suffisamment été adaptés et seront donc plus virulents, ce qui peut impliquer la réalisation d'un phagogramme avant la fabrication d'un nouveau cocktail.

- On peut aussi utiliser des **protéines phagiques** seules, purifiées ou des peptides de synthèse. Les endolysines, les holines et les saccharides dépolymérases font partie des enzymes produites par les phages pendant différentes étapes permettant la destruction de la bactérie cible (35). L'utilisation de telles protéines permet de ne pas utiliser des phages entiers et d'éviter

certains phénomènes de résistance des bactéries contre les phages décrits dans la littérature. Leur utilisation est un axe de recherche prometteur concernant la phagothérapie et fait l'objet d'un nombre croissant de publications scientifiques.

1.3.2 Les endolysines

1.3.2.1 Présentation

En raison de l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques, la phagothérapie qui inclut aussi l'utilisation de protéines lytiques telles que les endolysines, est devenue un domaine de recherche émergent comme alternative viable à ces molécules. Les endolysines ou lysines ont été décrites en premier sur des lysats de *S. aureus* dans les années 1960 (36).

Ce sont des protéines codées par les phages en fin de cycle lytique, des peptidoglycane hydrolases, responsables de la dégradation du peptidoglycane qui est présent dans la paroi des bactéries. La dégradation du maillage du peptidoglycane perturbe l'équilibre entre la pression osmotique cellulaire et celle de son environnement, entraînant la lyse et la mort de la cellule. Cette mort cellulaire s'accompagne de la libération de nombreux phages nouvellement formés pendant le cycle lytique (37).

Les phages à ADN double brin, qui représentent la majorité des virus bactériens connus, emploient au moins deux protéines dont l'action coordonnée aboutit à la lyse de la cellule hôte : les holines et les endolysines. La holine est une protéine hydrophobe qui s'oligomérisse dans la membrane cytoplasmique provoquant la formation de pores. Les endolysines acquièrent leur conformation finale avant d'être exportées vers l'espace péri-plasmique de la paroi par les holines. Une fois dans l'espace péri-plasmique, les endolysines exercent leur action hydrolase en clivant différentes liaisons du polymère de peptidoglycane (35). D'autres endolysines possèdent des peptides-signal et sont sécrétées sans l'aide de holines, tandis que les phages filamenteux libèrent de nouvelles descendances avec un mécanisme entièrement différent qui ne lyse ni ne tue les cellules hôtes (34).

Comme nous l'avons rappelé précédemment, la paroi bactérienne des bactéries Gram-positives possède principalement une couche épaisse de peptidoglycane, tandis que celle des bactéries Gram-négatives est mono- ou bicouche (38) et possède en outre une membrane externe. Ainsi, pour les bactéries Gram-positives, les endolysines peuvent lyser le peptidoglycane de l'extérieur de la cellule car le peptidoglycane leur est directement accessible (34). La membrane externe des bactéries Gram-négatives empêche généralement la lyse des

endolysines par l'extérieur, à moins que l'endolysine n'ait été conçue avec des peptides perméabilisant la membrane externe (39).

Les endolysines sont des enzymes hydrolytiques capables d'identifier et de cliver spécifiquement les peptidoglycane bactériens. Elles remplissent deux fonctions : la reconnaissance du substrat et l'activité enzymatique. Ainsi, elles ont une structure modulaire correspondant à ces deux domaines fonctionnels. Le domaine de liaison qui ancre la protéine à la paroi cellulaire, localisé généralement en C-terminal, est appelé *cell wall binding domain* (CBD), tandis que le domaine catalytiquement actif en N-terminal qui hydrolyse la paroi de la bactérie est appelé *enzymatic activity domain* (EAD) (34).

Les endolysines ciblant les bactéries Gram-positives sont généralement composées de plusieurs domaines, généralement un ou plusieurs domaines enzymatiquement actifs (EAD) à l'extrémité N-terminale et un CBD à l'extrémité C-terminale.

D'autre part, des endolysines ciblant les bactéries Gram-négatives ont été mises en évidence dans des travaux récents : ce sont généralement de petites protéines globulaires à domaine unique constituées uniquement d'EAD (39, 41); même si d'autres endolysines possèdent un CBD à l'extrémité N-terminale (40, 42).

Le peptidoglycane, constituée de chaînes d'acide N-acétylmuramique et de N-acétyl-D-glucosamine liées par des liaisons glycosidiques, régule la pression osmotique et empêche le passage indésirable des molécules. Cinq types d'activités enzymatiques sont associés aux différentes endolysines ; elles sont dirigées contre les principaux liens covalents retrouvés dans le peptidoglycane et permettent de les classer : glucosaminidase, muramidase, endopeptidase, amidase et transglycosylases lytiques (35, 36).

La fonction naturelle de ces endolysines peut être exploitée pour les utiliser comme de puissants antibiotiques à base d'enzymes, également appelés « enzybiotiques ». (34)

1.3.2.2 **Avantages et limites**

Les avantages conférés aux endolysines par rapport aux antibiotiques classiques sont nombreux : leur spécificité pour certains types de peptidoglycane limite en général leur action antimicrobienne à certains genres, espèces ou sérotypes bactériens, ne perturbant pas la microflore associée. Il a été démontré que les endolysines pouvaient être actives contre les biofilms (44). Elles présentent aussi une faible toxicité pour l'hôte. Les endolysines sont actives

à basse concentration, sur des surfaces muqueuses. Elles sont sûres, stables et relativement faciles à produire (45). Il a aussi été constaté un faible risque de développement de souches résistantes. (34)

Cependant, les endolysines présentent les limites d'être actives principalement contre les bactéries Gram-positives, ce qui limite leur action contre un grand nombre de pathogènes Gram-négatifs, même si des travaux récents ont permis de résoudre partiellement ce problème en perméabilisant la membrane grâce à l'addition d'EDTA ou la fusion peptidique ou encore en encapsulant l'endolysine (37). La communauté scientifique manque de preuves et d'essais cliniques concernant ces nouvelles approches. On peut aussi noter qu'étant donnée la nature protéique des endolysines, elles sont potentiellement immunogènes, même si on n'a pas démontré de toxicité pour l'hôte pour le moment. Aussi d'autres essais cliniques sont nécessaires pour révéler le profil d'innocuité des endolysines pour le traitement. Concernant les coûts de production, des investissements importants sont nécessaires pour les produire à large échelle en tant qu'antimicrobien (37).

1.3.2.3 **Domaines d'application des endolysines et perspectives**

Au cours des deux dernières décennies, les endolysines ont prouvé leur efficacité dans différents modèles d'infection chez l'animal (32, 43, 44) et concernant la contamination bactérienne dans les aliments (48). Ces connaissances ont ouvert la voie au développement de l'utilisation d'endolysines dans diverses phases d'essais précliniques et cliniques.

À partir du début des années 2000, les endolysines ont été utilisées avec succès dans diverses applications médicales *in vivo*, pour le traitement des infections systémiques et le contrôle des bactéries pathogènes de divers genres et espèces tels que *Streptococcus*, *Bacillus* et *Staphylococcus*. Dans le domaine de la sécurité alimentaire, les endolysines sont prometteuses en tant qu'additifs antimicrobiens naturels alimentaires. Les domaines de liaisons à la paroi (CBD) peuvent être utilisés comme méthodes de détection d'agents pathogènes. Les applications agricoles des endolysines comprennent la création de plantes transgéniques résistantes aux phytopathogènes et la prévention et le traitement de la mammite bovine (34).

Dans une analyse comparative récente concernant les nouvelles approches antibactériennes, Czaplewski et al. ont classé les endolysines en fonction de leur impact clinique et de leur faisabilité technique comme la classe alternative d'antibactériens ayant le plus grand potentiel (49). Par conséquent, le développement d'endolysines en tant qu'antibactériens répond

à un besoin important et suscite un grand enthousiasme dans la communauté scientifique. À ce jour, l'utilisation de la phagothérapie dans la plupart des pays fait face à des problèmes réglementaires en raison du manque d'essais cliniques établis et de données sécurisées (37).

Dans un but de comparaison, le tableau 2 ci-dessous résume les caractéristiques des traitements par bactériophages, endolysines et antibiotiques.

Caractéristiques	Bactériophages	Endolysines	Antibiotiques
Action clinique	Bactéricide	Bactéricide	Bactéricide ou bactériostatique
Capacité à éliminer le biofilm	Oui	Oui	Non
Site d'activité	<ul style="list-style-type: none"> • Se concentrent sur le site d'infection • S'auto-amplifient selon la charge bactérienne de l'hôte 	<ul style="list-style-type: none"> • Ne se concentrent pas nécessairement sur le site d'infection 	<ul style="list-style-type: none"> • Ne se concentrent pas nécessairement sur le site d'infection
Spectre antibactérien et conséquences	<ul style="list-style-type: none"> • cible-spécifiques • ne peuvent pas être utilisés de façon empirique • Un spectre étroit peut être neutralisé par des cocktails de phages polyvalents • Pas de dommage collatéral sur la flore commensale • La production de phages en grand nombre est relativement simple et peu coûteuse car ils se multiplient (29). 	<ul style="list-style-type: none"> • cible-spécifiques • ne peuvent pas être utilisés de façon empirique • Efficaces principalement contre les bactéries Gram-positives • Pas de dommage collatéral sur la flore commensale • découvertes récentes d'endolysines dirigées contre les bactéries Gram - (37) 	<ul style="list-style-type: none"> • Spectre plus large • Peuvent être utilisés de façon empirique • spectre médicament-spécifique • peut perturber la flore commensale
Risque de développement de résistance	<ul style="list-style-type: none"> • facteurs inducteurs principalement inconnus • phages en monothérapie : important • Dans les cocktails de phages : faible • Le développement de variants résistants peut être maîtrisé par la sélection de nouveaux phages ciblant un variant d'hôte résistant en quelques jours 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de résistance connue 	<ul style="list-style-type: none"> • Facteurs inducteurs principalement connus • En fonction du ou des mécanismes biochimiques, non limités aux bactéries cibles et aux classes d'antibiotiques uniques. • Le développement de nouveaux médicaments antibiotiques efficaces contre les bactéries

	<ul style="list-style-type: none"> • Les mutations résistantes pourraient avoir un impact négatif sur la forme physique ou la virulence bactérienne. 		résistantes prend du temps. <ul style="list-style-type: none"> • Les bactéries résistantes peuvent voir leur valeur sélective et/ou leur virulence augmentée ou diminuée.
Effets secondaires	Inconnus		Suffisamment connus
Efficacité	<ul style="list-style-type: none"> • Peu ou pas prouvée 		Démontrée
Impact environnemental	<ul style="list-style-type: none"> • Faible impact environnemental (26) 		<ul style="list-style-type: none"> • Des antibiotiques non métabolisés et répandus dans la nature peuvent accélérer l'apparition de souches résistantes (37).

Tableau 2 : Tableau comparatif illustrant les principales caractéristiques des thérapies phagiques en comparaison avec les antibiotiques Adapté de Knoll et al. 2014 (29)

1.3.3 Les peptides antimicrobiens de synthèse

1.3.3.1 Présentation

Les peptides antimicrobiens, *antimicrobial peptides* en anglais (AMPs), sont un élément important des défenses naturelles de la plupart des organismes vivants contre les agents pathogènes envahisseurs. Ce sont des peptides relativement petits (<10 kDa et en général moins de 50 acides aminés), cationiques et amphipathiques, de longueur, séquence et structure variables. Au cours des dernières décennies, de nombreux AMPs ont été isolés (50).

La plupart de ces peptides sont obtenus à partir de différentes sources trouvées dans l'environnement : il peut s'agir de peptides d'origine bactérienne, fongique, virale, végétale ou animale. Ces peptides présentent une activité à large spectre contre une grande variété de micro-organismes, y compris les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, protozoaires, levures, champignons et virus. Quelques peptides se sont également révélés cytotoxiques pour les cellules tumorales (49, 50).

Avec l'apparition de souches microbiennes ayant développé des résistances aux antibiotiques classiquement utilisés, les AMPs constituent une alternative intéressante pour la communauté scientifique (52). En effet, les AMPs se sont avérés être d'excellents candidats pour développer de nouveaux agents antimicrobiens car certains présentent une activité contre les agents pathogènes responsables d'infections sexuellement transmissibles (IST), y compris le VIH/HSV, mais aussi l'impétigo, les ulcères du pied diabétique et des infections gastriques à *Helicobacter* (51).

De nos jours, plus de 2000 AMPs ont été isolés d'une multitude d'organismes vivants et décrits dans la littérature (53). Ainsi, plus d'une dizaine de médicaments antibiotiques sont aujourd'hui basés sur l'activité antimicrobienne des AMPs. Parmi eux, un glycopeptide, la vancomycine, était vendu dès 1954 pour le traitement de diverses infections bactériennes. Plusieurs AMPs homologues à ce dernier ont ensuite été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) dans les années 2000 et 2010, dont la Dalbavancine, l'Oritavancine et la Telavancine (50).

Le développement de la synthèse de peptides en phase solide a ouvert d'énormes opportunités pour l'utilisation de peptides synthétiques dans des applications médicales. Au cours des dernières décennies, les thérapies peptidiques sont devenues un marché émergent pour l'industrie pharmaceutique. Il existe aujourd'hui de nombreux médicaments peptidiques approuvés, mis sur le marché (une soixantaine à ce jour) et des centaines sont en cours d'essais cliniques et précliniques (54).

La plupart de ces peptides agissent en perturbant la membrane plasmique conduisant à la lyse de la cellule (51). Les peptides conviennent pour cibler les interactions entre protéines et étudier le devenir des récepteurs et des peptides dans les cellules vivantes. Ils peuvent également être utilisés comme systèmes de transports pour les molécules médicamenteuses afin de les expédier aux cellules cancéreuses ou à d'autres zones de l'organisme (50).

Contrairement aux petites molécules, les métabolites des peptides sont rarement toxiques et ont donc une faible incidence d'effets secondaires. Néanmoins, les peptides sont beaucoup plus petits que certaines autres biomolécules (par exemple, les grosses protéines ou les anticorps), et ils peuvent facilement répondre au besoin de thérapeutiques de taille moyenne avec une spécificité élevée et une faible toxicité (55).

D'autre part, les principaux inconvénients des peptides sont leur sensibilité à la dégradation enzymatique, la clairance rénale rapide et, dans certains cas extrêmes, les peptides peuvent provoquer une réponse immunogène. Même si certains progrès ont été réalisés au cours des dernières années vers l'administration orale de peptides et de protéines, leur faible biodisponibilité orale et leur mauvaise absorption à travers les membranes sont toujours un problème. Par conséquent, avant que les peptides naturels puissent être utilisés comme agents thérapeutiques peptidiques, les scientifiques doivent répondre à ces questions, les stabiliser et les rendre efficaces *in vivo* (55).

En bioinformatique, plusieurs bases de données existent pour cataloguer les peptides antimicrobiens, telles que DBAASP (<https://dbaasp.org/>) ou APD3 (<http://aps.unmc.edu/>). Ces bases de données contiennent divers outils d'analyse et de prédiction de l'activité des peptides antimicrobiens.

1.3.3.2 **Peptides dérivés d'endolysines**

Des efforts récents se concentrent sur l'utilisation de peptides dérivés d'endolysines comme antibactériens, car certains semblent avoir des propriétés physicochimiques similaires à celles rapportées pour les peptides antimicrobiens (56).

En 2014, l'équipe de Briers, en modifiant la structure d'une endolysine de phage et en la fusionnant à d'autres peptides, ont produit une lysine synthétique (Artilysine®) capable de déstabiliser le lipopolysaccharide. Cela a rendu possible le passage de cette endolysine à travers la membrane externe d'une bactérie à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* (6), l'endolysine a alors pu exprimer son activité enzymatique en lysant la bactérie. Ces travaux rendent l'usage des endolysines potentiellement applicable à beaucoup de bactéries, y compris Gram-négatives, et ouvrent le champ à l'utilisation de davantage de peptides de synthèse (56).

1.3.4 **La phagothérapie dans la lutte contre les maladies infectieuses orales**

1.3.4.1 **Contexte**

Le potentiel de la phagothérapie dans la lutte contre les maladies orales a été suggéré par plusieurs auteurs et fait l'objet de nombreuses études depuis une vingtaine d'années (23). Des études sur des bactériophages lytiques dirigés contre différentes bactéries orales (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (57), *Fusobacterium nucleatum* (58), *Enterococcus faecalis* (59), *Streptococcus salivarius* (60), *Veillonella* (61), *Lactobacillus casei* (62)) ou leurs

protéines intrinsèques ont montré la lyse de ces bactéries qui sont à l'origine des maladies orales les plus fréquentes (parodontite, infection péri-apicale, maladie carieuse...) (23). Les bactériophages pourraient alors être considérés comme des outils thérapeutiques potentiels pour l'élimination des foyers infectieux oraux. L'efficacité des phages (sur les cellules planctoniques, sur les biofilms *in vitro*, sur des modèles *ex vivo* ou *in vivo*) ainsi que leur innocuité sont rapportées dans plusieurs études. Les pouvoirs curatif et préventif des bactériophages sont mis en évidence (55, 59). Ainsi, l'utilisation de phages soit en association avec un traitement antibiotique (en présence de bactéries sensibles aux antibiotiques), soit en monothérapie (pour éliminer des bactéries résistantes aux antibiotiques) est envisagée par de nombreux auteurs (21, 23).

1.3.4.2 **Publications scientifiques concernant les phages de *Streptococcus mutans* à ce jour**

Les travaux de recherche concernant des phages dirigés contre les souches de *Streptococcus mutans*, sont assez peu nombreux. À notre connaissance, seuls 6 phages ont été isolés à partir de salive humaine et étudiés (tableau 3). Leur utilisation pourrait en théorie servir comme traitement préventif de choix contre l'apparition de carie ou de façon complémentaire aux moyens de contrôle de plaque actuels, en agissant sur la formation du biofilm. Elle n'éliminerait pas les bactéries orales de la flore commensale et ne présenterait pas de toxicité contre l'organisme.

Année	Auteurs	Phages	Description
1988	Armau et al. (64)	M-102, e10, fl	- En 1988, l'équipe française de Armau et al. isole à partir de salive humaine les phages M-102 (voir figure 8), e10 et fl.
1993	Deslile, Rostowski (65)	M-102, e10, fl	- En 1993, Deslile et Rostowski publient un article dans lequel ils décrivent les trois phages M-102, e10 et fl précédemment isolés par l'équipe d'Armau. Ils les décrivent comme strictement lytiques, de morphotype B1, et de l'ordre des siphoviridés. Les 3 phages sont sérotype-spécifiques : le phage M-102 a une activité lytique sur 3 <i>S. mutans</i> , tous de sérotype c, le phage e10 a une activité lytique sur les 4 <i>S. mutans</i> de sérotype e et le phage fl a une activité lytique sur le <i>S. mutans</i> de sérotype f.
2007	Van Der Ploeg (7)	M-102	- En 2007, van der Ploeg séquence le génome du phage lytique M-102, spécifique de souches de <i>S. mutans</i> de sérotype c. Il y décrit un module lytique composé de deux enzymes lytiques dont l'une a probablement une séquence signal N-terminale.
2012	Deslile al. (66)	M-102 AD	- En 2012, Deslile et al. séquencent le génome de phages d'un stock qu'ils avaient obtenu de l'équipe française d'Armau et al. dans les années 1980, qu'ils pensent être de souches de M-102, mais ils notent des différences génétiques. Ils nomment alors ce nouveau phage M102-AD. M102AD a pu lyser une souche sur 25 testées.
2015	Dalmasso, de Haas et al. (67)	ΦAPCM01	- En 2015, Dalmasso, de Haas et al. décrivent le génome d'un phage lytique extrait de salive humaine, ΦAPCM01 dirigé contre des souches de <i>S. mutans</i> de sérotype e dont la séquence est proche de celle des deux phages lytiques précédents (M-102 et M-102AD). L'étude décrit une réduction significative de l'activité métabolique d'un modèle <i>in vitro</i> de biofilm de <i>S. mutans</i> en présence de ce phage. Cependant, ΦAPCM01 n'a pu lyser qu'une seule souche de <i>S. mutans</i> , sur 17 testées.
2021	Ben-Zaken (4)	SMHBZ8	- En 2021, Ben Zaken et al. publient la description du génome d'un nouveau phage, SMHBZ8, qui est un phage lytique qui infecte et tue efficacement les cultures planctoniques et biofilms de <i>S. mutans</i> <i>in vitro</i> , ainsi que dans un modèle expérimental de dentine cariogène. Ce phage peut prévenir la formation de biofilm et réduire l'importance du biofilm déjà formé.
2021	Wolfoviz-Zilberman (68)	SMHBZ8	- En 2021, Wolfoviz-Zilberman et al. testent sur des mandibules de souris ce phage SMHBZ8 afin d'évaluer l'efficacité dans la prévention de la carie <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> . Cette étude montre comment le phage SMHBZ8 ciblant <i>S. mutans</i> peut servir de modèle efficace de prévention des caries, en suspension ou avec un système d'administration à libération prolongée.

Tableau 3 : Illustration des principaux travaux scientifiques sur les phages de *S. mutans* retrouvés dans la littérature

Ainsi parmi les phages décrits, 4 ont été séquencés : M-102, M-102AD, SMHBZ8 et Φ APCM01. Les phages e10 et f1 ont été décrits et isolés mais leur génome n'a pas été séquencé. Φ APCM01, M-102, M-102 AD et SMHBZ8 présentent des hauts pourcentages de gènes en commun ce qui suggère une même origine (4). Ces phages présentent des efficacités différentes contre les souches de *S. mutans* et les biofilms ; APCM01 et SMHBZ8 sont les seuls phages dont l'action lytique contre les biofilms de *S. mutans* a été démontrée. (4)

D'autres auteurs ont testé l'activité lytique de certaines endolysines contre *S. mutans* sur des modèles animaux et *in vitro* :

- L'endolysine ClyR a été testée sur de nombreuses souches bactériennes dont *S. mutans*, et présente une large activité antibactérienne envers elles (69).
- L'endolysine du phage tempéré PH10 isolé de *Streptococcus oralis* OMZ 1038 présente aussi une activité anti *S. mutans* (70).
- L'endolysine du phage C1 inhibe la croissance de souches de *S. mutans* dans l'étude de Nelson et al. (71)
- L'endolysine du phage tempéré PH15 de *Streptococcus gordonii* inhibe également la croissance de souches de *S. mutans* (72).

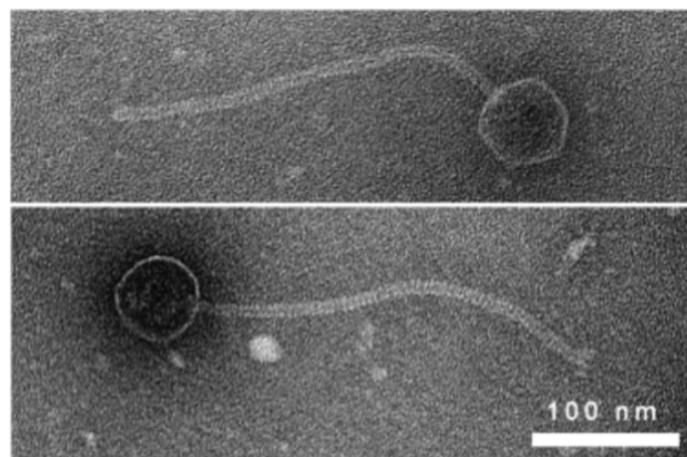


Figure 8 : Phages M-102 en microscopie électronique (7)

2 Etude expérimentale

2.1 Objectifs

L'objectif de cette étude est de tester l'hypothèse selon laquelle un peptide dérivé d'une endolysine (dont la séquence est issue d'un phage spécifiquement dirigé contre *S. mutans*) a une activité antimicrobienne sur différentes souches de *S. mutans*.

Pour cela, le phage M-102, décrit par van der Ploeg en 2007 et spécifique des souches de *Streptococcus mutans* de sérotype c, sera utilisé. Des analyses bioinformatiques indiquent que le génome de M-102 contient un module de lyse qui code pour une holine et deux endolysines : une muramidase et une endopeptidase (Figure 9).

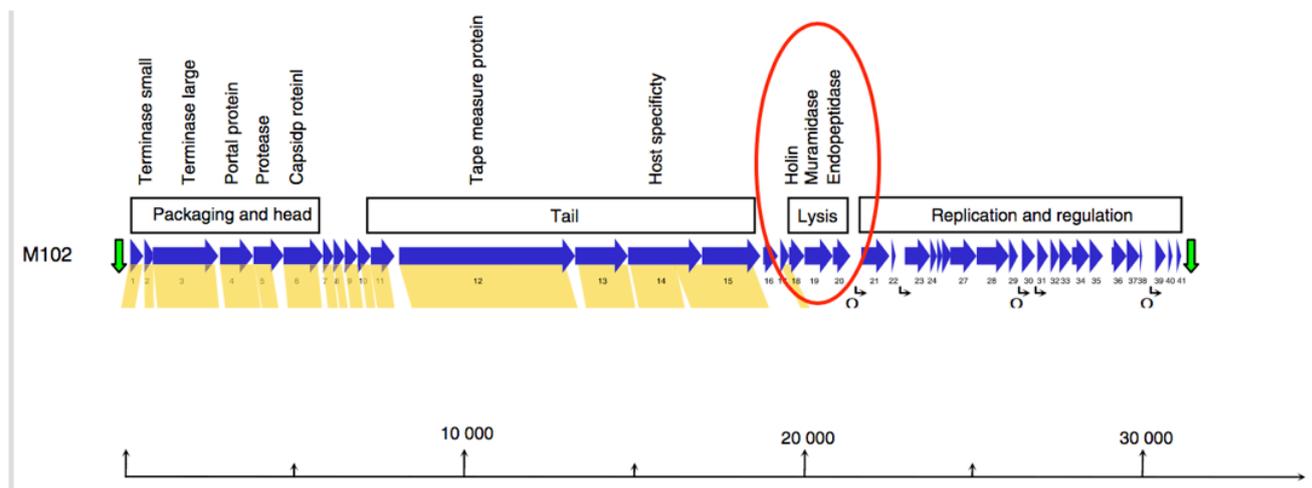


Figure 9 : Description du génome du phage M-102 par van der Ploeg (7) ;
En rouge est entouré le module de lyse du génome

Le peptide, synthétisé chimiquement à partir de la séquence peptidique de la muramidase, sera testé à différentes concentrations et la croissance bactérienne suivie par spectrophotométrie.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Matériels

3 souches de *S. mutans* différentes ont été utilisées :

- 2 isolats cliniques obtenus de patients issus de l'étude « Parkident » (73). Ces isolats cliniques ont été prélevés dans la salive de patients âgés de plus de 18 ans, atteints de la maladie de Parkinson affiliés au système de santé français, et capables de donner un consentement éclairé

écrit. Les souches ont été nommées pour les besoins de l'étude 02BD'3 et 11MM2. Les souches 02BD'3 (sérotipe c) et 11MM2 (sérotipe k) ont été identifiées par biologie moléculaire et par spectrométrie de masse. Pour la biologie moléculaire, l'identification était faite initialement par PCR (décrite par Oho et al.) mais aussi par séquençage (réalisé à la plateforme génome transcriptome de Bordeaux).

- la souche ATCC 25175 (souche de référence issue de l'American Type Culture Collection® et de sérotipe c).

Les souches ont été conservées à -80°C.

Pour les besoins des expérimentations, les souches ont été mises en culture dans du milieu Tryptone Soja (TS) à 37°C. Ce milieu de culture a aussi servi à préparer les solutions stock de peptide.

Le peptide produit sous forme de poudre a été conservé à -80°C.

2.2.2 Méthodes

2.2.2.1 Recherche de séquences peptidiques antimicrobiennes dans le génome d'une lysine d'un phage dirigé contre *Streptococcus mutans*

La séquence peptidique du potentiel peptide antimicrobien a été déterminée en se basant sur une partie de la séquence peptidique de la muramidase (NCBI Reference Sequence: YP_002995476.1) codée par le phage M-102 (NCBI Reference Sequence: NC_012884.1).

Le choix de la séquence obtenue a été fait à l'aide de l'outil « Conserved Domain » de NCBI (74). La séquence correspondait à un site actif d'une glycoside hydrolase (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=Y_P_002995476.1)

2.2.2.2 Sélection, optimisation et production du peptide

Afin de prédire les possibilités antimicrobiennes de la séquence retenue, la base de données APD3 (<https://aps.unmc.edu/>) a été utilisée. L'outil d'amélioration des peptides antimicrobiens de cette base de données « Antimicrobial Peptide Designer » a été utilisé. Le peptide a été optimisé en suivant les recommandations de cet outil. Deux grammes de peptide lyophilisé (pureté 95%) ont été synthétisés par le laboratoire Synvec® (Bordeaux). Le peptide ainsi obtenu a servi à la suite des expérimentations et a été appelé « Minilysine ».

2.2.2.3 Tests d'inhibition de croissance

L'effet du peptide « Minilysine » sur la croissance de *S.mutans* a été évalué pour différentes concentrations. Pour cela, la croissance des différentes souches a été suivie par spectrophotométrie, en relevant des mesures de densité optique à différents intervalles (voir protocole 1 en annexe 4).

Les souches ont d'abord été introduites dans du bouillon de culture la veille des relevés (*culture overnight*) : dans des tubes stériles, 500µL de chacune des 3 souches décongelées ont été introduites dans du milieu TS. Après agitation, les préparations ont été mises à l'étuve à 37°C et laissées en culture pendant 24h.

- Les tubes tests contenaient 3mL de solution bactérienne calibrée à une densité optique $DO_{600nm}=0,2$ et 3mL de solution « stock » de « Minilysine ». Le peptide a été testé à deux concentrations : 4 et 8mg/mL. Ces solutions stock ont été préparées respectivement à des concentrations de 8 et 16 mg/mL : 400mg et 800mg de poudre de peptide pour 50mL de solution de milieu TS. Ainsi les concentrations finales de « Minilysine » dans les tubes de 6mL étaient de 4 et 8mg/mL. La concentration finale de la suspension bactérienne de *S. mutans* dans le tube était mesurée à $DO_{600nm}=0,1$ soit 10^{3-4} UFC/mL selon les travaux de Lozano et al. (75). Les expériences ont été réalisées en triplicata.
- Les tubes témoins contenant 3mL de solution bactérienne calibrée à $DO_{600nm}=0,2$ et 3mL de milieu TS pur (sans peptide) ont été faits en triplicata.

Le suivi de la croissance a été fait à l'aide de la spectrophotométrie : le spectrophotomètre a été réglé à une longueur d'onde de 600nm. Un tube de TS pur a été utilisé en référence pour étalonner, et enfin la densité optique a été relevée à T0, T3h, T6h et T24h pour chaque tube. Entre chaque mesure au spectrophotomètre, les tubes ont été conservés à l'étuve à 37°C.

2.3 Résultats

2.3.1 Sélection du peptide à tester

La séquence peptidique testée a été extraite du génome du phage M-102, un phage spécifique aux souches de *Streptococcus mutans* de sérotype c. Ce phage possède un module de lyse qui code pour une holine (ORF18) et deux endolysines : une muramidase (ORF19) et une endopeptidase (ORF20).

Arbitrairement, le choix a été fait de se focaliser sur la séquence de la muramidase (la muramidase est une glycoside hydrolase, elle est retrouvée chez les autres phages lytiques décrits de *S. mutans*). Tout aussi arbitrairement, un site actif de cette glycoside hydrolase a été choisi pour la séquence peptidique utilisée ici. Il correspondait à la position 8 à 18 de la muramidase considérée (Figure 10).

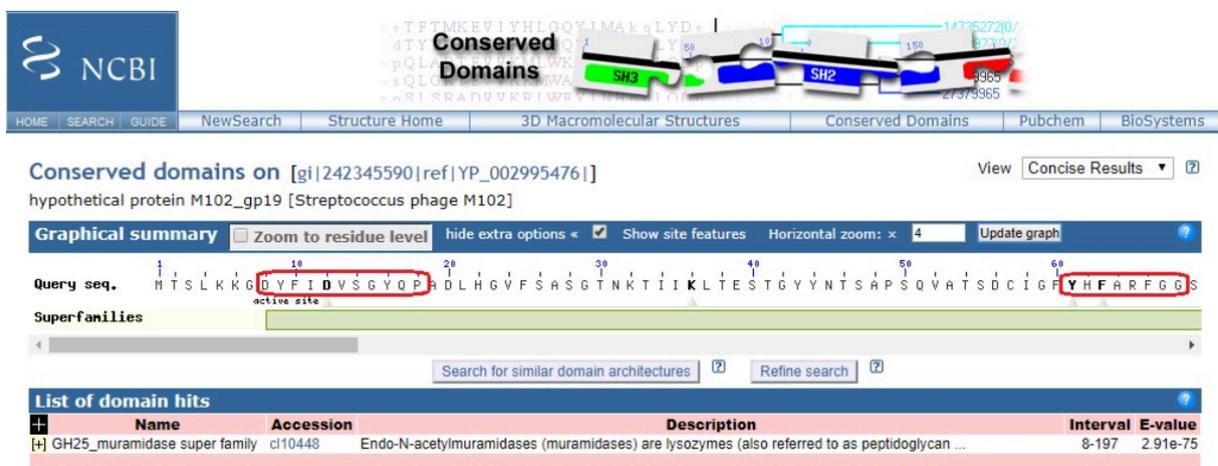


Figure 10 : Séquence peptidique de l'ORF 19 agrandie et recherche de sites actifs (entourés en rouge)

La séquence résultante est la suivante : **DYFIDVSGYQP**

2.3.2 Optimisation du peptide

La séquence choisie a été analysée dans le logiciel de prédiction antimicrobienne de la base de données APD3. Du fait d'une charge négative du peptide, le logiciel a d'abord indiqué que celui-ci avait très peu de chance d'avoir une activité antimicrobienne. En suivant les recommandations d'ajouter des acides aminés chargés positivement et/ou d'enlever des acides aminés chargés négativement, le choix a été fait d'ajouter deux lysines, chargées positivement, de part et d'autre de la séquence précédemment retenue, en supprimant aussi le premier acide aminé chargé lui négativement (acide aspartique). Le choix de la lysine a été fait arbitrairement, le logiciel nous proposait d'autres acides aminés chargés positivement tels que l'histidine ou l'arginine.

La séquence ainsi obtenue est la suivante : : **KYFIDVSGYQPK**

L'analyse de cette nouvelle séquence par le logiciel précédemment évoqué a, cette fois, estimé que l'activité antimicrobienne serait plus efficace, avec un peptide ayant un indice de Boman de 1.34kcal/mol et une structure en hélice qui peut interagir avec la membrane cellulaire (Figure 11).

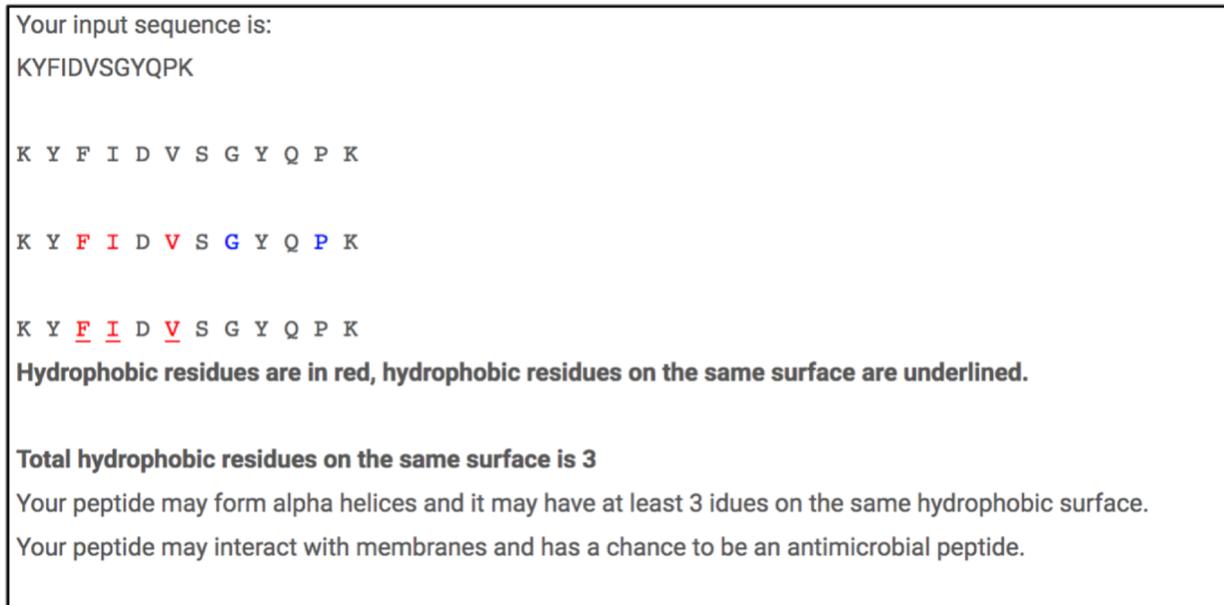


Figure 11 : Résultats de l'analyse de prédiction microbienne

C'est donc la séquence **KYFIDVSGYQPK** qui a été testé *in fine*.

2.3.3 Tests d'inhibition de croissance

Le suivi de croissance des suspensions bactériennes des souches de *S. mutans* testées a été fait à l'aide de mesures de densité optique (DO) à 600nm. Ces relevés ayant été fait en triplicata, la moyenne des mesures relevées a été reportée dans les tableaux 4 (mesures effectuées avec une concentration de Minilyse de 4mg/mL) et 5 (mesures effectuées avec une concentration de Minilyse de 8mg/mL). Les figures 12 et 13 modélisent graphiquement ces résultats.

Légende (Tableaux 4 et 5 ; figures 12 et 13)

Groupe test (*S. mutans* au contact du peptide)

- **m 11MM2 +** : Moyenne des valeurs de DO des triplicata de la 1^{ère} souche de *S. mutans* Parkident en présence de Minilysine
- **m 02BD'3 +** : Moyenne des valeurs de DO des triplicata de la 2^e souche de *S. mutans* Parkident en présence de Minilysine
- **m ATCC 25175 +** : Moyenne des valeurs de DO des triplicata de la souche de *S. mutans* ATCC 25175 en présence du peptide

Groupe témoin (*S. mutans* en milieu de culture sans peptide)

- **t 11MM2** : Moyenne des valeurs de DO des triplicata de la 1^{ère} souche de *S. mutans* sans peptide
- **t 02BD'3** : Moyenne des valeurs de DO des triplicata de la 2^e souche de *S. mutans* sans peptide
- **t ATCC 25175** : Moyenne des valeurs de DO des triplicata de la souche de référence de *S. mutans* ATCC 25175 sans peptide

2.3.3.1 **Pour une concentration de « Minilysine » de 4mg/mL**

DO _{600nm} / Temps	t 11MM2	m 11MM2 +	t 02BD'3	m 02BD'3 +	t ATCC 25175	m ATCC 25175 +
T0	0,047	0,058	0,074	0,090	0,086	0,110
T3h	0,15	0,155	0,202	0,199	0,161	0,176
T6h	0,596	0,634	0,594	0,544	0,465	0,507
T24h	0,97	1,019	0,876	0,940	0,987	1,020

Tableau 4 : Relevé des mesures de Densité Optique (DO) en présence du peptide "Minilysine" dosé à 4mg/mL

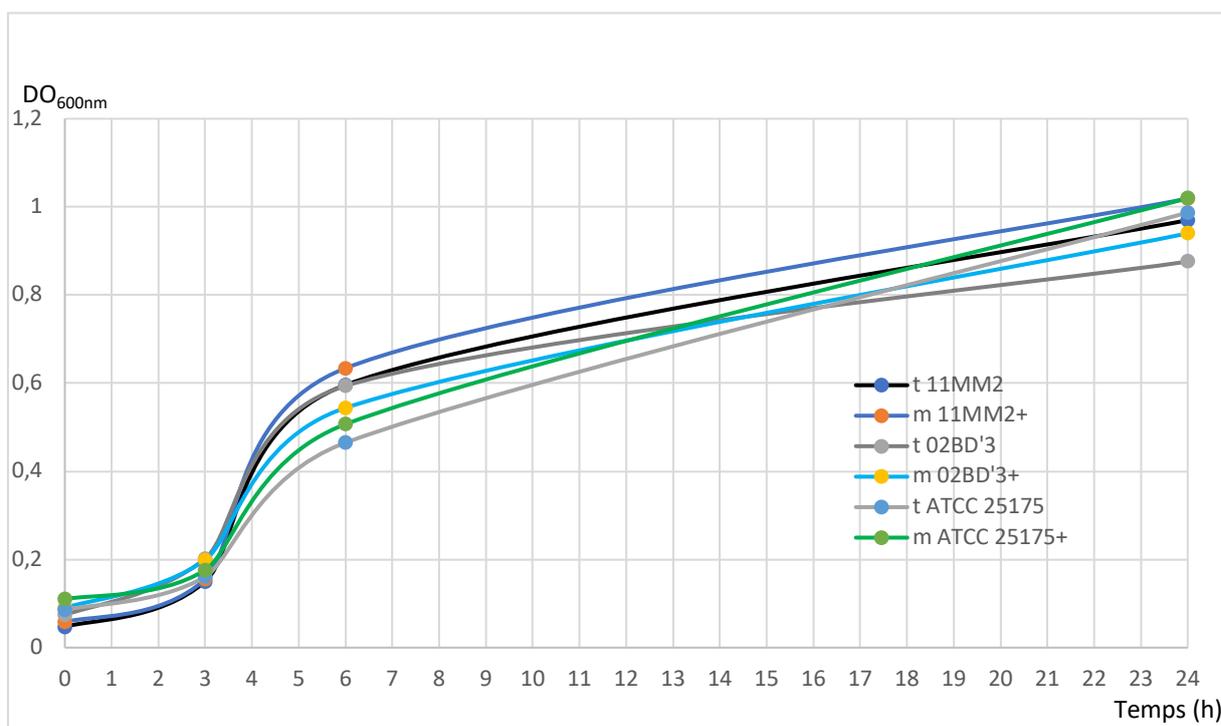


Figure 12 : Suivi de la croissance bactérienne en présence du peptide "Minilysine" à 4mg/mL

Figure 12 : À une concentration de 4mg/mL, les tests montrent que la formule intégrant le peptide synthétisé ne produit aucun effet inhibiteur sur la croissance. Les courbes suivent les phases de latence, croissance exponentielle et stationnaire de façon similaire avec ou sans peptide.

2.3.3.2 Pour une concentration de « Minilysine » de 8mg/mL

DO _{600nm} \ Temps	t 11MM2	m 11MM2+	T 02BD'3	M 02BD'3 +	t ATCC 25175	m ATCC 25175 +
0	0,094	0,072	0,081	0,075	0,084	0,068
3	0,156	0,195	0,192	0,186	0,18	0,18
6	0,836	0,878	0,856	0,865	0,972	0,908
24	1,066	1,13	1,052	1,092	1,028	1,013

Tableau 5 : Relevé des mesures de Densité Optique (DO) en présence du peptide "Minilysine" dosé à 8 mg/mL

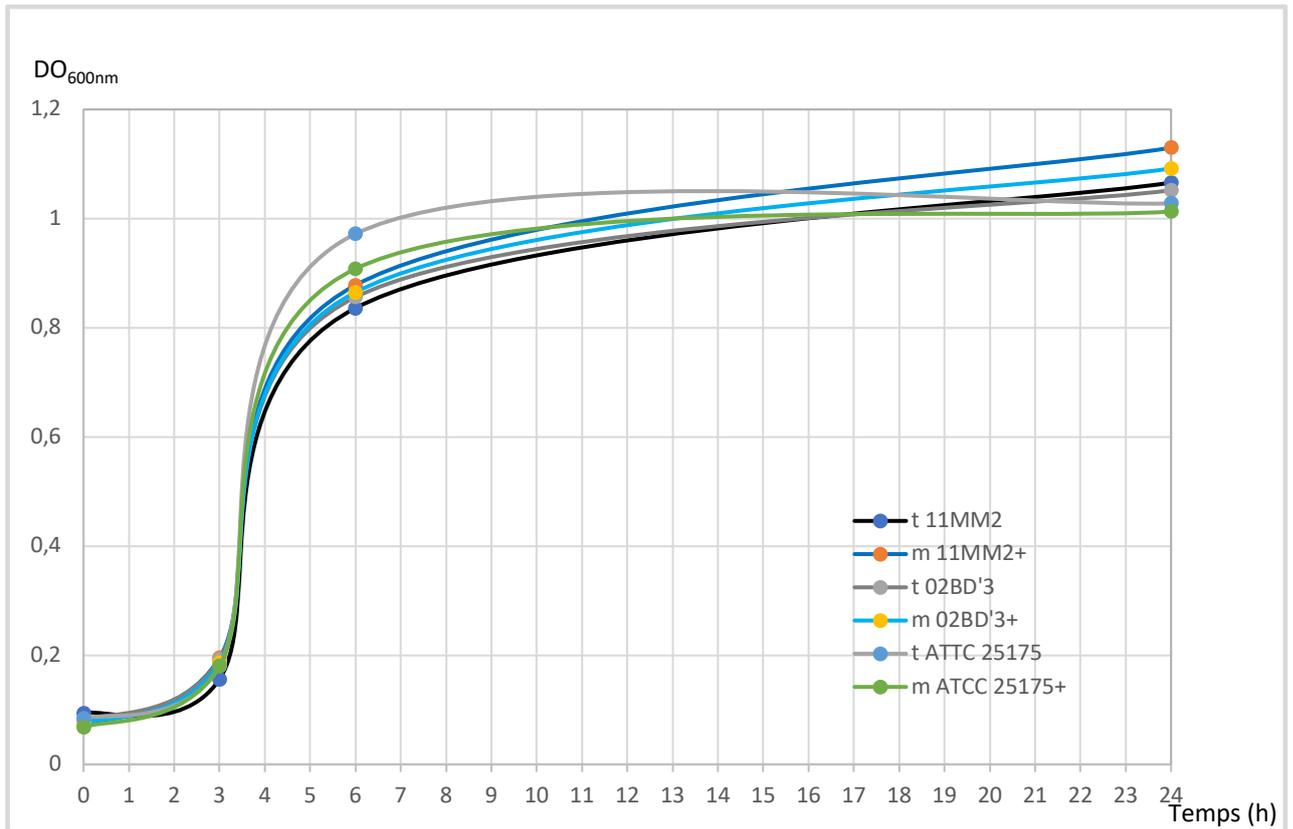


Figure 13 : Suivi de la croissance bactérienne en présence du peptide "Minilysine" à 8mg/mL

Figure 13 : À une concentration de 8mg/mL, les tests montrent également que la formule intégrant le peptide synthétisé ne produit aucun effet inhibiteur sur la croissance.

2.4 Discussion

Le but principal de ce travail était d'évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur d'un peptide dérivé d'une endolysine du phage lytique M-102 sur la croissance de bactéries cariogènes *S. mutans*.

En utilisant une méthodologie de production *de novo* de peptide antimicrobien, nous avons obtenu un peptide issu de la séquence protéique de la muramidase du phage M-102 décrit par Van der Ploeg (7). Après analyse du potentiel antimicrobien de ce peptide, considéré comme faible par le logiciel de prédiction de la base de données APD3, la séquence a été modifiée afin d'augmenter ce potentiel et rendre le peptide plus stable. Nous avons ensuite utilisé un test d'inhibition de croissance en inoculant ce peptide à différentes concentrations dans les suspensions bactériennes des trois souches testées. Pour les deux concentrations de peptide testées, dans aucun cas le peptide n'a montré d'effet inhibiteur sur la croissance des souches de *S. mutans* choisies. En effet, l'augmentation de la densité optique, de façon similaire à la culture contrôle (sans peptide), a montré que, sur les souches testées, le peptide n'a pas eu d'effet antimicrobien. Ici, le choix a été fait d'utiliser des tests d'inhibition en spectrophotométrie, mais pour montrer une action antimicrobienne et anti-biofilm sur ces souches, d'autres tests en laboratoire auraient pu être faits, comme le test d'adhérence sur tube de verre incliné et le comptage des unités formant colonie (UFC) sur gélose (18).

Pour expliquer ces résultats négatifs, plusieurs éléments peuvent être mentionnés. Premièrement, si une activité antimicrobienne de ce phage a été décrite pour des souches planctoniques de *S. mutans* dans l'étude de Van der Ploeg (7), il n'existe pas à ce jour dans la littérature de preuve d'efficacité de M-102 sur des biofilms de *S. mutans*, donc rien ne prouve pour l'instant qu'une endolysine de ce phage, même entière, est active sur les biofilms de *S. mutans* (4). Des études supplémentaires pourraient être menées en ce sens.

De plus, les phages M-102 sont décrits comme ayant une gamme d'hôtes étroite d'après Van der Ploeg et spécifiques du sérotype C. Ici la souche testée 02BD'3 était de sérotype C mais la souche 11MM2 était de sérotype K, tandis que la souche ATCC 25175 était de sérotype C. De plus, toutes les souches d'un même sérotype ne sont pas sensibles à un phage donné, ce qui peut expliquer les résultats négatifs de ce peptide avec les souches utilisées.

Nous pouvons également nous interroger sur la fiabilité du logiciel de prédiction antimicrobienne qui aurait pu nous induire en erreur ; nous n'avons ici pas confirmé notre prédiction par d'autres logiciels que celui de la base de données APD3.

Par ailleurs, la méthode de synthèse d'un peptide antimicrobien utilisée présente des points d'amélioration. Ici, le choix a été fait de privilégier des séquences courtes (10 acides

aminés) car d'après certains auteurs comme Erak, un peptide antimicrobien court paraît plus stable, et présente l'avantage de limiter les coûts de production (55). La séquence choisie l'a été de manière arbitraire, elle correspondait à un site actif, mais d'autres sites actifs existent. Ainsi, on aurait pu additionner ces séquences en les connectant bout à bout afin d'obtenir une seule chaîne, comme le suggère Erak ; ou choisir d'autres parties de la séquence codée par l'ORF 19 ayant plus de sites actifs regroupés, comme entre le 60 et le 68^e acide aminé. Ces nouveaux peptides peuvent être testés et pourraient montrer des résultats positifs sur l'inhibition.

Pour se rapprocher de conditions *in vivo* chez l'Homme, la méthodologie utilisée dans cette étude pourrait être améliorée. Dans le protocole d'inhibition de croissance utilisé dans cette étude, des suspensions bactériennes en milieu liquide ont été choisies pour suivre la croissance bactérienne. En bouche, la bactérie *Streptococcus mutans* est retrouvée à la fois sous forme planctonique dans le milieu liquide (salive) et sous forme de biofilm, au contact des surfaces dures telles que l'émail, la dentine ou le ciment. Le pouvoir anti-biofilm aurait pu être évalué avec un support en hydroxyapatite ou sur tube de verre incliné avec un milieu supplémenté en saccharose, méthode décrite par Hamada et Torii (76). Des auteurs ont décrit les simulations de biofilms dentaires sur ce genre de support comme l'équipe de Leathers en 2018 (77), où les auteurs ont testé la toxicité de liamocines contre des biofilms de *S. mutans* et *S. sobrinus* : la formation de biofilm y était simulée sur des coupes d'hydroxyapatite.

Dans cette étude, nous n'avons pas pris en compte lors de nos expérimentations, certains paramètres comme le pH du milieu, ce qui limite notre capacité à interpréter ces résultats ou à les transposer chez l'Homme.

D'autres auteurs se sont intéressés à des peptides antimicrobiens dirigés contre *S. mutans*, de façon spécifique ou non (78). Plusieurs ont montré une activité contre *S. mutans*, dans le cadre de propriétés antimicrobiennes à large spectre comme la nisine (79), le décapeptide KSL (80), et le lipopeptide C14KKc12K (81). D'autres ont une action spécifiquement conçue contre *S. mutans*, comme le peptide IMB-2 (82) et le lipopeptide cyclique 4 (CLP-4) (83). Pour chacun d'entre eux, les peptides présentent une longueur n'excédant pas 34 acides aminés (nisine), CLP-4 présente lui 6 acides aminés.

Plus spécifiquement, dans leur étude datant de 2011, l'équipe de Mai a produit le peptide IMB-2, modifié à partir d'un peptide antimicrobien à large spectre d'origine marine, la pleurocidine (82). Le gène ComC code le CSP, une molécule de Quorum Sensing parfois appelée phéromone, qui peut se lier à *S. mutans*. L'origine de IMB-2 repose sur l'ajout d'un domaine de liaison de cette phéromone à un domaine lytique de pleurocidine pour générer un

peptide antimicrobien spécifique à la cible. Les résultats ont montré que près de 95% des bactéries *S. mutans* ont perdu leur viabilité suite à une exposition au peptide de fusion IMB-2 (5,65 μ M pendant 15 min).

Nous avons ici utilisé des concentrations élevées (4 et 8mg/mL) de peptides. Pourtant les endolysines sont actives à faible concentration : les auteurs ayant fait des tests d'inhibition ont en général inoculé l'endolysine à une concentration avoisinant les 100 μ g/mL (68). Les auteurs qui ont inoculé des peptides synthétisés chimiquement dirigés contre *S. mutans* et ayant démontré une activité antimicrobienne ont utilisé des concentrations inférieures à 100 μ g/mL comme l'équipe de Min en 2017 qui utilisait des concentrations comprises entre 5 et 25 μ g/mL de CLP-4 (83). Or, les concentrations de 4 et 8mg/mL utilisées dans ce travail diffèrent de plus d'une unité de mesure par rapport à de telles concentrations. Nous sommes partis du principe qu'en testant notre peptide à une concentration élevée, celui-ci aurait pu exprimer une forte activité antimicrobienne : on suppose que s'il n'y a eu pas d'activité inhibitrice à forte concentration, il n'y en a pas à faible concentration. Les résultats se sont montrés négatifs pour une concentration à 4mg/mL de peptide. On a choisi devant ce résultat négatif de doubler la concentration (8mg/mL) et les résultats se sont aussi montrés négatifs. On aurait pu aller encore au-delà des concentrations utilisées (supérieures à 8mg/mL) pour voir si ce peptide avait vraiment un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne, mais par des contraintes budgétaires et de disponibilité du peptide nous n'avons pas pu poursuivre.

Enfin, les tests ici ont été menés uniquement sur les pathogènes procaryotes. Un des objectifs de l'expérimentation d'un peptide antimicrobien est de tester sa toxicité sur l'Homme. Or, ici nous n'avons pas eu l'occasion de le faire car le peptide ne présentait pas de toxicité contre la bactérie. Dans le cas où les résultats avaient montré un effet inhibiteur, il aurait fallu par la suite tester la toxicité sur des modèles animaux puis sur des cellules orales humaines comme les fibroblastes gingivaux ou les kératinocytes buccaux. C'est ce travail essentiel qui limite l'utilisation des peptides antimicrobiens sur l'Homme.

La principale raison pour laquelle les peptides deviennent essentiels dans le traitement de différentes maladies est leur haute spécificité *in vivo*. Néanmoins, malgré les nombreux aspects positifs des peptides, ils présentent également des points négatifs : ils sont souvent chimiquement et physiquement instables, ont une clairance rapide, sont rapidement dégradés par les enzymes et, en raison de leur taille et de leur charge, sont difficilement capables de traverser les membranes. Pour ces raisons, les scientifiques cherchent à stabiliser des peptides ainsi qu'une voie d'administration qui serait pratique pour les patients et qui serait en même

temps un moyen d'administration efficace. Les peptides ayant une biodisponibilité orale faible, la norme actuelle en matière d'administration de peptides est la voie sous-cutanée qui est probablement l'une des raisons pour lesquelles ils ne sont pas plus largement utilisés dans les traitements antimicrobiens (55). Mais pour des peptides antimicrobiens dirigés contre des pathogènes oraux comme dans cette étude, la voie orale est la plus adéquate, car on cherche une action topique. On pourrait imaginer d'utiliser ce peptide sous forme de bain de bouche ou pâte dentifrice, ou associé à des produits d'ingénierie tissulaire.

Enfin, selon plusieurs sociétés d'études et d'analyses de marché, le marché des peptides continuera d'être un marché en croissance à l'avenir (55), ce qui encourage la communauté scientifique à développer les travaux de recherche à ce sujet.

Conclusion

Nous avons donc cherché à évaluer, *in vitro*, l'action d'un peptide dérivé d'une endolysine de phage sur la croissance d'une bactérie fortement impliquée dans la cariogenèse : *S. mutans*.

Les expérimentations qui ont été réalisées ici n'ont pas mis en évidence l'effet inhibiteur du peptide synthétisé chimiquement. La méthodologie que nous avons utilisée doit être améliorée et plus de peptides doivent être testés. En effet, le nombre de peptides à tester disponibles dans la nature représente un potentiel énorme de molécules antimicrobiennes dirigés contre des bactéries pathogènes.

Des travaux supplémentaires doivent être envisagés sur l'action d'endolysines sur la croissance de *S. mutans* ou d'autres pathogènes oraux, et sur les thérapies à base de phages en général. En effet, une course contre la montre est engagée pour trouver des alternatives aux antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses, qui sont de moins en moins efficaces : l'Organisation Mondiale de la Santé estime que la résistance aux antibiotiques dans le traitement clinique, si elle persiste au rythme actuel, peut conduire à 10 millions de décès par an, soit la première cause de mortalité dans le monde (84).

Pour envisager une quelconque utilisation clinique ou préventive sur l'apparition de caries chez l'Homme, l'utilisation de préparations à base de phages paraît encore lointaine, au vu du peu d'essais cliniques sur le sujet. Bien que des études montrent des résultats encourageant sur des modèles de souris (68), des recherches approfondies sur le sujet restent nécessaires avant de pouvoir l'étendre à des moyens préventifs de routine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dye BA. The Global Burden of Oral Disease: Research and Public Health Significance. *J Dent Res.* avr 2017;96(4):361-3.
2. Kidd E, Fejerskov O. Caries control in health service practice. *Prim Dent J.* 2013 Jul;2(3):4.
3. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* déc 1986;50(4):353-80.
4. Ben-Zaken H, Kraitman R, Copenhagen-Glazer S, Khalifa L, Alkalay-Oren S, Gelman D, et al. Isolation and Characterization of *Streptococcus mutans* Phage as a Possible Treatment Agent for Caries. *Viruses.* 2 mai 2021;13(5):825.
5. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* janv 2014;5(1):226-35.
6. Gerstmans H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin®: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochem Soc Trans.* 15 févr 2016;44(1):123-8.
7. van der Ploeg JR. Genome sequence of *Streptococcus mutans* bacteriophage M102. *FEMS Microbiol Lett.* oct 2007;275(1):130-8.
8. Lupi-Pégurier L, Bourgeois D, Muller-Bolla M. *Epidémiologie de la carie.* EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Médecine Buccale, 28-155-C-10, 2009. In.
9. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet Lond Engl.* 6 janv 2007;369(9555):51-9.
10. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* avr 1994;176(8):2137-42.
11. Simain F, Rompen E, Heinen E. Biofilms bactériens et médecine dentaire. *Rev Med Liège.* déc 2010;65(10):5.
12. Marsh P, Martin M. *Oral microbiology.* 5th ed. Edinburgh: Elsevier; 2009. 222 p.
13. Nicolas GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Can J Microbiol.* janv 2011;57(1):1-20.
14. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* févr 1997;25(1):5-12.
15. Badet C, Richard B. *Étude clinique de la carie.* EMC Dent. févr 2004;1(1):40-48.
16. Houvion E. *Le biofilm dentaire: composition, formation et propriétés,* Thèse d'exercice pour le DE de chirurgie dentaire, Université de Lorraine, 2014.

17. Samaranayake LP. Essential microbiology for dentistry. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. 363 p.
18. Yue Yew J. Étude de l'effet de quatre composés contenant du miel sur deux bactéries cariogènes : streptococcus mutans et lactobacillus rhamnosus. Thèse d'exercice pour le DE de chirurgie dentaire, Université de Bordeaux, 2015.
19. Chardin H, Barsotti O, Bonnaure Mallet M. Microbiologie en odonto-stomatologie. Paris; Maloine; 2006. 328 p.
20. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res. 2009 Nov;88(11):982-90.
21. Corbin A, Pitts B, Parker A, Stewart PS. Antimicrobial Penetration and Efficacy in an *In Vitro* Oral Biofilm Model. Antimicrob Agents Chemother. juill 2011;55(7):3338-44.
22. da Silva BR, de Freitas VAA, Carneiro VA, Arruda FVS, Lorenzón EN, de Aguiar ASW, et al. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. Peptides. avr 2013;42:78-83.
23. Shlezinger M, Khalifa L, Houry-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Resch G, Que YA, et al. Phage Therapy: A New Horizon in the Antibacterial Treatment of Oral Pathogens. Curr Top Med Chem. 2017;17(10):1199-211.
24. Mouton C, Robert J -C, Sixou J -L, Trahan L. Bactériologie bucco-dentaire. Paris, Elsevier-Masson;1994. 192 p.
25. Dublanchet A. La phagothérapie, Des virus pour combattre les infections, renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre; 2017. 247 p.
26. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. Ann Burns Fire Disasters. 2015 Mar 31;28(1):13-20.
27. Breton A. La phagothérapie orale. Thèse d'exercice pour le DE de chirurgie dentaire, Université de Bordeaux, 2019.
28. Dufour N, Chevallereau A, Debarbieux L. Les bactériophages : comment ces virus alliés fonctionnent-ils? Biofutur. févr 2016;373:31-4.
29. Knoll BM, Mylonakis E. Antibacterial Bioagents Based on Principles of Bacteriophage Biology: An Overview. Clin Infect Dis. 15 févr 2014;58(4):528-34.
30. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. Med Mal Infect. août 2008;38(8):426-30.
31. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. Clin Otolaryngol Off J ENT-UK Off J Neth Soc

Oto-Rhino-Laryngol Cervico-Facial Surg. août 2009;34(4):349-57.

32. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis.* janv 2019;19(1):35-45.

33. Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol.* déc 2015;13(12):777-86.

34. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* oct 2012;7(10):1147-71.

35. Magin V. Exploitation du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat en Génie des Procédés et Bioprocédés. Université Bretagne Loire, 2019.

36. Ralston DJ, McIvor M. Lysis -from- without of *Staphylococcus aureus* strains by combinations of specific phages and phage-induced lytic enzymes. *J Bacteriol.* 1964 Sep;88(3):676-81.

37. Wong KY, Megat Mazhar Khair MH, Song AAL, Masarudin MJ, Chong CM, In LLA, et al. Endolysins against *Streptococci* as an antibiotic alternative. *Front Microbiol.* 2 août 2022;13:935145.

38. Dik DA, Marous DR, Fisher JF, Mobashery S. Lytic transglycosylases: concinnity in concision of the bacterial cell wall. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2017 Oct;52(5):503-542.

39. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered Endolysin-Based “Artilynsins” To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. Hendrix R, éditeur. *mBio.* 29 août 2014;5(4):e01379-14.

40. Broendum SS, Buckle AM, McGowan S. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins. *Mol Microbiol.* 2018 Dec;110(6):879-896.

41. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021 Apr 15;13(4):680.

42. Chang, Y. Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety. *Microorganisms.* 2020 May 13;8(5):724.

43. Walmagh, M., Briers, Y., dos Santos, S. B., Azeredo, J., and Lavigne, R. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae Phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1. *PLoS One* 2012;7(5):e36991.

44. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins — current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* août 2005;8(4):480-7.

45. Szafranski SP, Winkel A, Stiesch M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J Biotechnol.* mai 2017;250:29-44.
46. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 27 mars 2001;98(7):4107-12.
47. Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage.* 3 juill 2015;5(3):e1062590.
48. Schmelcher M, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Curr Opin Biotechnol.* 1 févr 2016;37:76-87.
49. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis.* 1 févr 2016;16(2):239-51.
50. Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci.* 28 oct 2021;22(21):11691.
51. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* déc 2004;24(6):536-47.
52. Zoukimian, C. Mise Au Point Et Industrialisation De La Synthèse De Peptides Complexes. Thèse de doctorat en Chimie Organique, Université Grenoble Alpes, 2020.
53. Phoenix DA, Dennison SR, Harris F. *Antimicrobial Peptides.* 1^{re} éd. Wiley; 2013. 248 p.
54. Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett.* 10 déc 2019;27(1):4-16.
55. Erak M, Bellmann-Sickert K, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg Med Chem.* juin 2018;26(10):2759-65.
56. Gerstmans H, Criel B, Briers Y. Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnol Adv.* mai 2018;36(3):624-40.
57. Castillo-Ruiz M, Vinés ED, Montt C, Fernández J, Delgado JM, Hormazábal JC, et al. Isolation of a novel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b bacteriophage capable of lysing bacteria within a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* mai 2011;77(9):3157-9.
58. Machuca P, Daille L, Vinés E, Berrocal L, Bittner M. Isolation of a novel bacteriophage specific for the periodontal pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Appl Environ Microbiol.* nov 2010;76(21):7243-50.
59. Khalifa L, Brosh Y, Gelman D, Coppenhagen-Glazer S, Beyth S, Poradosu-Cohen R, et

- al. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl Environ Microbiol.* avr 2015;81(8):2696-705.
60. Maal KB, Bouzari M, Zavareh FA. Identification of *Streptococcus salivarius* bacteriophage isolated from Persian Gulf as a potential agent for dental caries phage therapy. *African J Microbiol Res.* 2010;4(20):2127–32.
61. Hiroki H, Shiiki J, Handa A, Totsuka M, Nakamura O. Isolation of bacteriophages specific for the genus *Veillonella*. *Arch Oral Biol.* 1976;21(3):215-7.
62. Meyers CE, Walter EL, Green LB. Isolation of a bacteriophage specific for a *Lactobacillus casei* from human oral material. *J Dent Res.* févr 1958;37(1):175-8.
63. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol.* oct 1992;37(4):258-61.
64. Armau, J. L. Bousque, D. Boue, and G. Tiraby, Isolation of lytic bacteriophages for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, *J Dent Res.* 1998; 67: 121.
65. Delisle AL, Rostkowski CA. Lytic bacteriophages of *Streptococcus mutans*. *Current Microbiology* 1993;27:163–167.
66. Delisle AL, Guo M, Chalmers NI, Barcak GJ, Rousseau GM, Moineau S. Biology and genome sequence of *Streptococcus mutans* phage M102AD. *Appl Environ Microbiol.* avr 2012;78(7):2264-71.
67. Dalmaso M, de Haas E, Neve H, Strain R, Cousin FJ, Stockdale SR, et al. Isolation of a Novel Phage with Activity against *Streptococcus mutans* Biofilms. Biswas I, éditeur. *PLOS ONE.* 23 sept 2015;10(9):e0138651.
68. Wolfviz-Zilberman A, Kraitman R, Hazan R, Friedman M, Houry-Haddad Y, Beyth N. Phage Targeting *Streptococcus mutans* In Vitro and In Vivo as a Caries-Preventive Modality. *Antibiot Basel Switz.* 21 août 2021;10(8):1015.
69. Xu J, Yang H, Bi Y, Li W, Wei H, Li Y. Activity of the Chimeric Lysin ClyR against Common GramPositive Oral Microbes and Its Anticaries Efficacy in Rat Models. *Viruses.* 20 2018;10(7).
70. van der Ploeg JR. Genome sequence of the temperate bacteriophage PH10 from *Streptococcus oralis*. *Virus Genes.* déc 2010;41(3):450-8.
71. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 mars 2001;98(7):4107-12.
72. van der Ploeg JR. Characterization of *Streptococcus gordonii* prophage PH15: complete genome sequence and functional analysis of phage-encoded integrase and endolysin.

Microbiology (Reading, Engl). oct 2008;154(Pt 10):2970-8.

73. University Hospital, Bordeaux. Preliminary Study of the Quality of the Oral Flora in Parkinson's Patients [Internet]. clinicaltrials.gov; 2021 sept [cité 6 oct 2022]. Report No.: NCT03827551. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03827551>.

74. Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yang M, Zhang D, Zheng C, Lanczycki CJ, Marchler-Bauer A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D265-D268.

75. Lozano CP, Díaz-Garrido N, Kreth J, Giacaman RA. Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis Expression of Competition-Related Genes, Under Sucrose. *Caries Res.* 2019;53(2):194-203.

76. Hamada S, Torii M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of Streptococcus mutans and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun.* 1978 Jun;20(3):592-9.

77. Leathers TD, Rich JO, Bischoff KM, Skory CD, Nunnally MS. Inhibition of Streptococcus mutans and S. sobrinus biofilms by liamocins from Aureobasidium pullulans. *Biotechnol Rep.* 21 déc 2018;21:e00300.

78. Cui T, Luo W, Xu L, Yang B, Zhao W, Cang H. Progress of Antimicrobial Discovery Against the Major Cariogenic Pathogen Streptococcus mutans. *Curr Issues Mol Biol.* 2019;32:601-44.

79. Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides.* 1 nov 2010;31(11):2003-8.

80. Williams RL, Sroussi HY, Leung K, Marucha PT. Antimicrobial decapeptide KSL-W enhances neutrophil chemotaxis and function. *Peptides.* 1 janv 2012;33(1):1-8.

81. Meir O, Zaknoon F, Cogan U, Mor A. A broad-spectrum bactericidal lipopeptide with anti-biofilm properties. *Sci Rep.* 19 mai 2017;7:2198.

82. Mai J, Tian XL, Gallant JW, Merkley N, Biswas Z, Syvitski R, et al. A Novel Target-Specific, Salt-Resistant Antimicrobial Peptide against the Cariogenic Pathogen Streptococcus mutans. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2011;55(11):5205-13.

83. Min KR, Galvis A, Williams B, Rayala R, Cudic P, Ajdic D. Antibacterial and Antibiofilm Activities of a Novel Synthetic Cyclic Lipopeptide against Cariogenic Streptococcus mutans UA159. *Antimicrob Agents Chemother.* 25 juill 2017;61(8):e00776-17.

84. Čižman M, Plankar Srovin T. Antibiotic consumption and resistance of gram-negative pathogens (collateral damage). *GMS Infect Dis.* 2018 Aug 9;6:Doc05.

ANNEXES

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus phage M102]	Streptococcus phage M102	562	562	100%	0.0	100.00%	273	YP_002995476.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	541	541	100%	0.0	95.60%	273	WP_215000745.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	531	531	100%	0.0	93.77%	273	WP_002287206.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	530	530	100%	0.0	92.67%	273	WP_088616357.1
<input checked="" type="checkbox"/> lysin [Streptococcus phage smHBZ8]	Streptococcus phage smHBZ8	530	530	100%	0.0	92.31%	273	QKE60410.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	529	529	100%	0.0	92.31%	273	WP_168739721.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus phage APCM01]	Streptococcus phage APCM01	528	528	100%	0.0	93.77%	272	YP_009220170.1
<input checked="" type="checkbox"/> TPA: MAG TPA: Cpl_1 lysin [Siphoviridae sp.]	Siphoviridae sp.	527	527	100%	0.0	92.31%	273	DAS11643.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	525	525	100%	0.0	91.21%	273	WP_002309235.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	522	522	100%	0.0	90.84%	273	WP_168753281.1
<input checked="" type="checkbox"/> lysozyme [Streptococcus mutans N66]	Streptococcus mutans N66	516	516	100%	0.0	90.88%	274	EMC14867.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus mutans]	Streptococcus mutans	516	516	100%	0.0	90.84%	273	WP_065868595.1
<input checked="" type="checkbox"/> TPA: MAG TPA: Cpl_1 lysin [Siphoviridae sp.]	Siphoviridae sp.	326	326	96%	1e-108	59.48%	296	DAG27373.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein [Lachnospiraceae bacterium oral taxon 082]	Lachnospiraceae bacterium oral taxon 082	331	331	97%	4e-108	58.27%	474	MBS6929217.1
<input checked="" type="checkbox"/> TPA: MAG TPA: Cpl_1 lysin [Siphoviridae sp.]	Siphoviridae sp.	323	323	96%	1e-107	58.74%	296	DAI55166.1
<input checked="" type="checkbox"/> lysin [Streptococcus phage P5641]	Streptococcus phage P5641	323	323	96%	2e-107	56.82%	299	ARU13371.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Streptococcus phage CHPC982]	Streptococcus phage CHPC982	323	323	96%	2e-107	56.82%	299	AZF92801.1
<input checked="" type="checkbox"/> peptidoglycan endolysin [Streptococcus alactolyticus]	Streptococcus alactolyticus	323	323	96%	3e-107	58.74%	296	MBM6697502.1

Annexe 1 : Liste des protéines présentant des alignements significatifs avec la séquence ORF 19 via Protein Blast NCBI

Conserved domains on [gi|242345590|ref|YP_002995476|] View Concise Results

hypothetical protein M102_gp19 [Streptococcus phage M102]

Graphical summary Zoom to residue level [show extra options](#)

Query seq. active site

Superfamilies **GH25_muramidase superfamily**

[Search for similar domain architectures](#) [Refine search](#)

Name	Accession	Description	Interval	E-value
GH25_muramidase super family	cl10448	Endo-N-acetylmuramidases (muramidases) are lysozymes (also referred to as peptidoglycan ...	8-197	3.24e-75

References:

- Marchler-Bauer A et al. (2017), "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", *Nucleic Acids Res.* **45**(D)200-3.
- Marchler-Bauer A et al. (2015), "CDD: NCBI's conserved domain database.", *Nucleic Acids Res.* **43**(D)222-6.
- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.* **39**(D)225-9.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.* **32**(W)327-331.

Annexe 2 : Domaines conservés de la séquence peptidique dans NCBI protein blast

https://aps.unmc.edu/design/improve

University of Nebraska
Medical Center

APD3
ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE

Antimicrobial Peptide Designer

- Antimicrobial Peptide Database
- About
- AMP Database Search
- Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor
- Antimicrobial Peptide Designer**

Your input: DYFIDVSGYQP
Your input has 11 residues
D- Y- F- I- D- V- S- G- Y- Q- P-
Total Hydrophobic Ratio = 27%
Total Net Charge = -2
The Ile ratio = 9%
The Val ratio = 9%

CAUTION:

System found that your sequence has negative charge. The peptide which has net negative charge [has very little chance](#) to be an antimicrobial peptide.

If you want to improve the antimicrobial activity of your peptide, you have several options:

1. Add some positive charged amino acids (K, R, H). Usually, K and R are more common than H.
2. Remove some negative charged amino acid (E, D)
3. Do Both

[Modify the peptide and input the sequence again](#)

Annexe 3 : Résultats de l'analyse de prédiction antimicrobienne : il faut modifier le peptide pour espérer avoir une activité antimicrobienne

Suivi de la croissance ou du transcriptome de *S. mutans* en milieu TS avec une concentration élevée d'un peptide antimicrobien

Souche 3 ATCC
Souche 2 02BD'3
Souche 1 11MM2

Pré-requis :

Préparer du TS

Mettre en culture overnight la suspension bactérienne à tester dans du TS

Préparer 30mL de solution stock de Minilysine (4mg/ml) soit 120mg de poudre de Minilysine pour 30ml de TS

- Mettre 3mL de la culture overnight de *S. mutans* à tester ($DO_{600nm} = 0.2$) dans le tube pour spectrophotomètre
- Ajouter 3mL de de solution stock de Minilysine
- Faire le blanc avec TS sans rien
- Mesurer la DO_{600nm} immédiatement après (en veillant à bien vortexer le tube)
- Incuber le tube à une température de 37°C puis mesurer sa DO_{600nm} à T= 3h, 6h, 8h puis 24h
- Les tests devront être faits en triplicata (trois tubes pour chaque suspension bactérienne)
Ne pas oublier de faire un témoin pour chaque souche (3mL TS sans rien + 3mL de suspension bactérienne)

Cette partie n'est à faire que si le transcriptome est à étudier

6. Stopper les cultures à 3h, 6h, 8h et 24h en les mettant à une température de 4°C pour récupérer les ARNm postérieurement

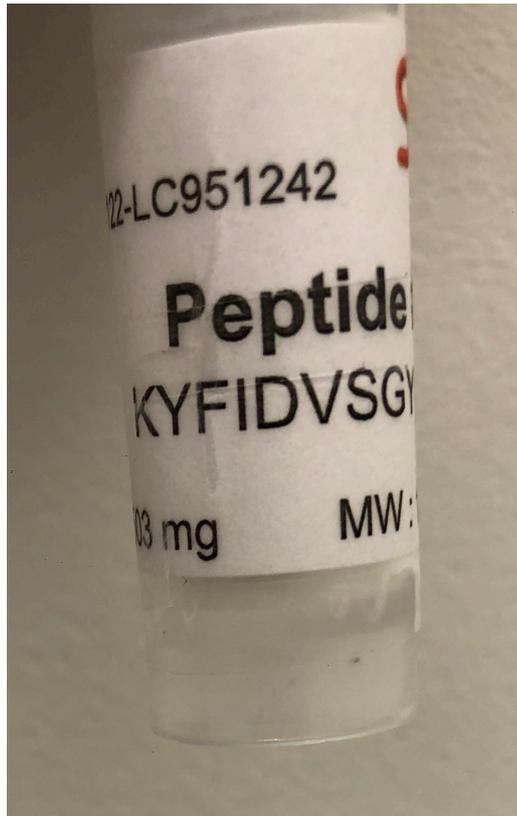
$DO_{600nm} = 0.1$ équivalent 10^{3-4} UFC/mL (Lozano et al. 2019)

Les tubes utilisés seront préférentiellement les tubes pour la lecture spectrophotométrique.

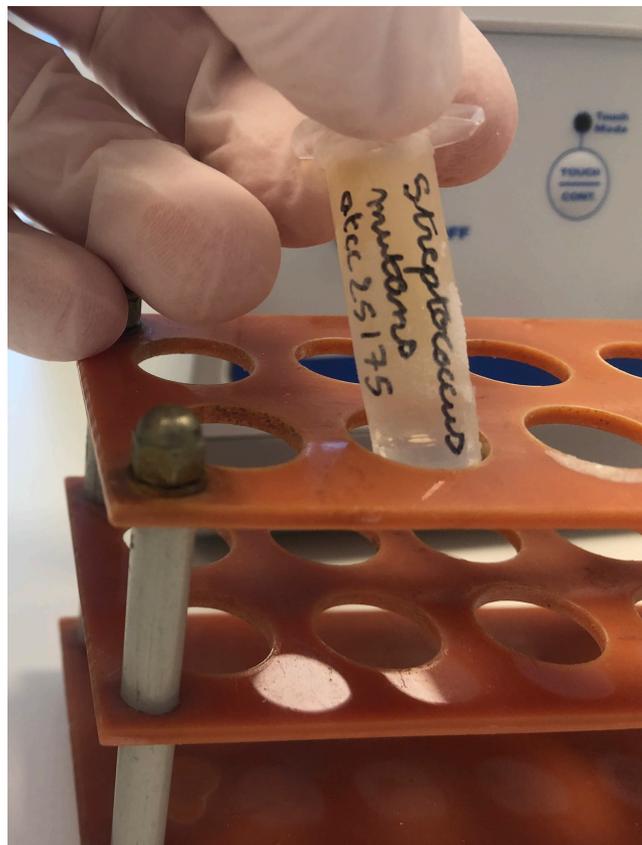
Un tube utilisé pour une lecture à une heure donnée ne pourra pas être utilisé à une autre heure.

Prévoir les tubes en conséquence.

Annexe 4 : Protocole 1



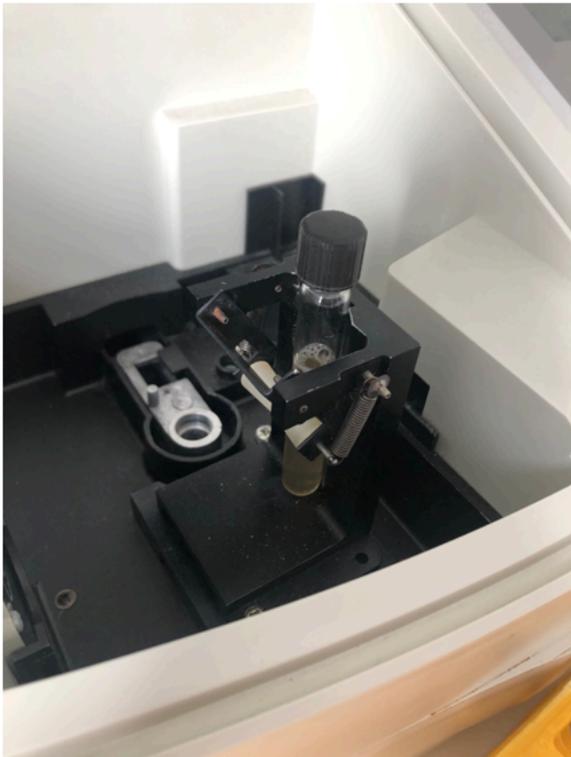
Annexe 5 : Peptide synthétisé en poudre



Annexe 6 : Extrait de souches ATCC 25175



Annexe 7 : Mise à l'étuve pour culture overnight



Annexe 8 : Passage des échantillons et relevé des mesures au spectrophotomètre

Collège des Sciences de la Santé

UFR des Sciences Odontologiques

Serment

En présence de mes Maîtres et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de l'art dentaire.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un honoraire au-dessus de mon travail. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Mes connaissances et mon état ne serviront ni à diffuser des propos non avérés, ni à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des conditions de croyance, de nation et de race viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je promets et je jure de conformer strictement ma conduite professionnelle aux principes et aux règles prescrites par le code de déontologie.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.



Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Titre : Production d'un peptide dérivé d'une endolysine de bactériophage et évaluation de sa toxicité sur un modèle de biofilm monoespèce de *Streptococcus mutans***Résumé :**

La prévention dans la maladie carieuse utilise actuellement des moyens de lutte non-spécifiques aux bactéries impliquées dans son développement telles que *Streptococcus mutans* pour limiter l'action des biofilms pathogènes. D'autre part, l'incidence accrue de résistances bactériennes aux antibiotiques incite les scientifiques à limiter leur utilisation dans les pathologies infectieuses et avoir recours à des alternatives telles que la phagothérapie. Cette thérapie utilise les propriétés des bactériophages, virus infectant uniquement les bactéries, pour éliminer les populations impliquées dans les infections bactériennes. Quelques bactériophages spécifiques à *S. mutans* ont été isolés dans la salive humaine ; ces phages pourraient être une biothérapie efficace dans la lutte contre la maladie carieuse. A côté du phage complet, des équipes utilisent des protéines dérivées de ces phages comme les endolysines. L'objectif de cette étude est de tester l'efficacité antimicrobienne d'un peptide produit à partir d'une endolysine de bactériophage dirigé contre *S. mutans*, dont la séquence est disponible dans la littérature.

Mots clés : bactériophages, endolysine, streptococcus mutans, oral, biofilm

Title : Production of a peptide derived from a bacteriophage endolysin and evaluation of its toxicity in a monospecies biofilm model of *Streptococcus mutans***Abstract :**

Prevention in the carious disease currently uses means of fighting that are not specific to the bacteria involved in its development, such as *Streptococcus mutans*, to limit the action of pathogenic biofilms. On the other hand, the increased incidence of multidrug resistant bacteria prompt scientists to limit their use in infectious pathologies and to resort alternatives such as phage therapy. This therapy uses the properties of bacteriophages, viruses that only infect bacteria, to eliminate the populations involved in bacterial infections. A few bacteriophages specific to *S. mutans* have been isolated from human saliva; these phages could be an effective biotherapy in the fight against the carious disease. Alongside the complete phage, teams use proteins derived from these phages such as endolysins. The objective of this study is to test the antimicrobial efficacy of a peptide produced from a bacteriophage endolysin directed against *S. mutans*, the sequence of which is available in the literature.

Key words : bacteriophages, endolysin, streptococcus mutans, oral, biofilm