



**HAL**  
open science

# Biomatériaux céramiques et lutte contre les infections nosocomiales en chirurgie ostéo-articulaire

Franck Bouchart

► **To cite this version:**

Franck Bouchart. Biomatériaux céramiques et lutte contre les infections nosocomiales en chirurgie ostéo-articulaire. Biomatériaux. Université Polytechnique Hauts-de-France, 2023. tel-04291352v1

**HAL Id: tel-04291352**

**<https://uphf.hal.science/tel-04291352v1>**

Submitted on 17 Nov 2023 (v1), last revised 13 Mar 2024 (v2)

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**  
**de**  
**L'UNIVERSITÉ POLYTECHNIQUE HAUTS-DE-FRANCE**

**Biologie, médecine et santé**  
**Sciences de la vie et de la santé**

**Présentée et soutenue par Franck BOUCHART.**

**Le 17/11/2023, à CAMBRAI**

Laboratoire de Matériaux Céramiques et de Mathématiques (CERAMATHS)

**Biomatériaux céramiques et lutte contre les infections nosocomiales**  
**en chirurgie ostéo-articulaire**

**JURY**

**Président du jury**

- COURTOIS Christian, professeur, directeur du laboratoire CERAMATHS. Université polytechnique des Hauts-de-France.

**Rapporteurs**

- BONTEMPS-GALLO Sébastien, chargé de recherche. CNRS/UMR9017 Institut Pasteur de Lille.

- COMBES Christèle, professeure, Toulouse INP-ENSIACET.

- LECLERE Valérie, professeure, BioEcoAgro, joint Research Unit/UMR transfrontalière INRAE 1158, Institut régional Charles Viollette, Université de Lille.

**Examineurs**

- HORNEZ Jean-Christophe, professeur, CERAMATHS, Université polytechnique des Hauts-de-France.

**Référents de recherche**

- LACROIX Jean-Marie, professeur, responsable de groupe. CNRS/UMR8576. Université de Lille

# Sommaire

I. Parcours personnel et professionnel.....	10
1. Parcours de formation .....	10
2. Parcours professionnel.....	10
3. Encadrements étudiants.....	12
4. Publications Scientifiques .....	13
5. Communications.....	15
II. Activités d'enseignements .....	18
1. Activités pédagogiques .....	18
a. Enseignements en Master Nutrition, Sciences des Aliments.....	19
b. Enseignements en Licence Sciences de la vie. ....	20
c. Enseignements effectués en qualité de Moniteur de 2002 à 2005. ....	21
d. Prestation de formation en entreprise.....	22
2. Présentations synthétiques des enseignements .....	23
3. Responsabilités, animation et montage de formations.....	23
a. <i>Responsabilités pédagogiques</i> .....	23
b. <i>Président de jury</i> .....	24
c. <i>réfèrent du dispositif ASTEP au sein de l'ISTV et INSA</i> .....	24
III. Activités administratives.....	24
1. Chargé de mission .....	24
2. Direction de département.....	25
3. Activités institutionnelles .....	26
4. Comité de recrutement et jury de thèse.....	27
5. Contrats de recherche et projets.....	27
IV. Activités de recherche.....	27
1. Création du laboratoire de biologie du centre universitaire de Cambrai (annexe du CERAMATHS). ....	28
2. Recherches menées au sein du laboratoire CERAMATHS .....	28
a. Introduction.....	28
a.1. Matériaux céramiques à base de phosphate tricalcique et à base d'Hydroxyapatite. ....	29
a.2. Les Biofilms.....	31
a.3. Les bactériophages et la phagothérapie .....	34
b. Biomatériaux et phagothérapie. ....	36

b.1. Efficacité des biomatériaux céramiques à base d'hydroxyapatite ou de phosphate tricalcique dopés en bactériophage. ....	36
b.2. Effet de l'alginate sur la désorption des phages à partir de substituts osseux en céramique $\beta$ -TCP. ....	39
b.3. Biocéramique imprimée par imprimante 3D pour la phagothérapie contre les infections nosocomiales osseuses.....	46
c. Biomateriaux et agents non viraux anti-infectieux.....	63
3. Activités de recherche en collaboration avec le laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille UGSF (UMR8576/CNRS). ....	63
a. Historique des recherches menées.....	63
b. projet de recherche en cours (convention recherche avec l'UGSF UMR8576 CNRS): .....	66
V. Projet de recherche au sein du CERAMATHS. ....	68
1. Biomateriaux et lutte contre les biofilms installés de structure homogène et hétérogène.....	68
2. Biomateriaux et agents non viraux anti-infectieux .....	70
3. Suivi en temps réel des biofilms exposés ou non aux bactériophages par système ultrasonore (collaboration avec le laboratoire IEMN, CNRS, Dorothee Callens-Debavelaere, Emmanuel Moulin, Julien Carlier) .....	71
VI. Références bibliographiques .....	74

## **Table des figures**

<b>Figure 1</b> : comparaison des structures minérales d'un os spongieux avec la structure macroporeuse artificielle d'un matériau à bas d'hydroxyapatite .....	29
<b>Figure 2</b> : Image SEM (de gauche à droite) (PS : pores sphériques, 3D : Stéréolithographie, FC : freeze casting). Barres d'échelle : 0,5 mm.....	30
<b>Figure 3</b> : Images SEM des échantillons de $\beta$ -TCP et prolifération/différenciation cellulaire (PS : pores sphériques, 3D : Stéréolithographie, FC : freeze casting).....	31
<b>Figure 4</b> : Vue d'ensemble du processus de formation de biofilm. ....	32
<b>Figure 5 [24]</b> : Représentation schématique des facteurs affectant l'interaction phage-biofilm .....	34
<b>Figure 6</b> : Modélisation d'un bactériophage .....	34
<b>Figure 7</b> : Cinétique de lyse causée par les pastilles d'hydroxyapatite ou de TCP dopées aux bactériophages sur la croissance en milieu liquide de la bactérie Escherichia coli K12. La croissance est appréciée par mesure de la densité optique à 620nm.....	37
<b>Figure 8</b> : Activité lytique des pastilles céramiques chargées de phages $\lambda$ sur E. coli K12 après lavage pendant 6, 18, 24, 48, 72 et 144 h. ....	38
<b>Figure 9</b> : Schéma présentant la préparation de pastilles céramiques enrobés par un gel alginate-CaCl <sub>2</sub> . ....	40
<b>Figure 10</b> : Observations SEM de la surface des pastilles recouvertes d'alginate. (a) Vue d'ensemble micrographie des pastilles de contrôle ; (b–d) micrographies à différentes échelles des pastilles recouvertes d'alginate à 1% de CaCl <sub>2</sub> .....	41
<b>Figure 11</b> : Pastilles $\beta$ -TCP macroporeux produits par impression 3D. (a) Conception des pastilles et pastilles imprimées 3D (b).....	42
<b>Figure 12</b> : Cinétique de lyse sur cultures bactériennes en présence de pastilles de $\beta$ -TCP chargées de phages recouvertes de différentes concentrations d'alginate après 3 h de lavage en LB (37 °C, 170 tr/min) (n = 3 × 2). *, Groupes de résultats significativement similaires et **, Groupes de résultats significativement différents avec p-value < 0,05. La cinétique grise correspond aux résultats de la culture témoin d'E. coli. ....	43
<b>Figure 13</b> : Évolution des concentrations de phages dans des pastilles de $\beta$ -TCP témoins et chargées à 1 % de CaCl <sub>2</sub> –alginate-hydrogel après lavage du bouillon LB à 37 °C, sous agitation à 170 tr/min pendant deux semaines. *, Groupes de résultats significativement différents avec p-value < 0.05. ....	44
<b>Figure 14</b> : A : Photo d'un échantillon de matériau $\beta$ -TCP. Microscopie électronique à balayage (MEB) de l'état de surface des matériaux $\beta$ -TCP : les vues ont été obtenues avec un FEG SU5000-Hitachi avec des grossissements (B) X100, (C) X500 et (D) ×1000 après revêtement d'or. ....	47
<b>Figure 15</b> : Analyse par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) d'une surface céramique recouverte de bactériophages Remus. Images du haut, réflexion par diode laser 405 nm de la surface de la céramique recouvert (à droite) ou non (à gauche) de bactériophages non marqués. Images du bas, excitation par diode laser à 488 nm de la surface de la pastille céramique recouvert de bactériophages marqués Alexa Fluor™488 (à droite) ou de milieu marqué Alexa Fluor™488 (à gauche) .....	49
<b>Figure 16</b> : Co-culture de souches de S. aureus et E. coli. Les deux souches bactériennes ont été co-inoculé dans du milieu LB avec des pastilles TCP et incubé à 37 °C avec agitation. Les astérisques représentent l'instant du dénombrement.....	50

**Figure 17** : Effet des pastilles TCP chargées d'un cocktail de phages Remus/Lambda sur la croissance de *S. aureus* et *E. coli* co-cultivés. Les astérisques représentent l'instant des dénombrements. .... 51

**Figure 18** : Effet des pastilles TCP chargées de phages Remus ou Lambda sur la croissance de *S. aureus* et *E. coli* co-cultivés. Les deux souches bactériennes ont été co-inoculées en LB milieu avec des pastilles TCP non chargées (A), chargées avec (B) le phage Lambda ou (C) le phage Remus et incubées à 37 ° C sous agitation. Les astérisques représentent l'instant des dénombrements. .... 53

**Figure 19** : Formation de biofilm à partir de *S. aureus* en présence de matériaux TCP chargés ou non de phages Remus. Les pré-cultures bactériennes ont été diluées (1:100) dans du milieu LB etensemencé dans les puits (Well) sans TCP, avec TCP (TCP) ou avec des pastilles TCP chargées de phages Remus (Remus phage TCP). Après 24h de croissance à 37 ° C, les cellules bactériennes planctoniques ont été mesurées par O.D.620nm et la formation de biofilm a été mesurée par ATPmétrie. \*\* indiquer  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  entre pg ATP/surface ou densité optique (620 nm) obtenus pour des expériences par rapport à TCP ou TCP chargé Remus phage. .... 54

**Figure 20** : Microscopie électronique à balayage (MEB) de l'état de surface des matériaux  $\beta$ -TCP après la formation d'un biofilm de 24 h : les images ont été obtenues avec un FEG SU5000-Hitachi avec des grossissements (A,E)  $\times 2000$ , (B,F)  $\times 4000$ , (C,G)  $\times 10000$ , (D)  $\times 50000$  et (H)  $\times 20000$  après revêtement d'or. Biofilm à *S. aureus* PS47 24 h sur TCP matériel sans phages chargés (A, B, C, D). Biofilm à *S. aureus* PS47 de 24 h sur du matériel TCP avec des phages chargés (E, F, G, H). .... 55

**Figure 21** : Evolution d'un biofilm de 24h à *S. aureus* en présence de matériaux TCP chargés ou non de phages Remus. Les pré-cultures bactériennes ont été diluées (1:100) dans du milieu LB etensemencé dans les puits d'une plaque de microtitration pendant 24 h à 37 ° C permettant la formation de biofilm. Les pastilles TCP chargées de phages Remus (Remus phage TCP) ou non (TCP) ont été ajoutés aux puits. Après 24 h et 96 h d'incubation supplémentaire à 37 ° C, les cellules bactériennes planctoniques ont été mesurées par O.D.620nm et la formation de biofilm a été mesurée par ATPmétrie. \*\* indique  $p < 0,01$ , \*\*\* indique  $p < 0,001$  entre pg ATP/surface ou densité optique (620 nm) obtenue pour les expériences par rapport au TCP chargé de phage Remus ou TCP sans phage (24 h ou 96 h d'incubation). .... 56

**Figure 22** : Prolifération des ostéoblastes MC3T3-E1 cultivés sur des matériaux TCP. Les ostéoblastes ont été incubés dans du DMEM additionné de 10 % de sérum bovin foetal à 37°C dans des plaques à 12 puits contenant des pastilles TCP avec ou sans phage Remus chargé. La densité des cellules eucaryotes a été mesurée après 6 h, 24 h et 48 h de croissance. (A) Densité de cellules eucaryotes par cm<sup>2</sup> du fond des puits + pastilles de TCP avec (phage) ou sans (contrôle) phages chargés. (B) Comme dans (A) mais la mesure a été effectuée sur les cellules cultivées uniquement sur la surface des pastilles. \* indiquent  $p < 0,05$  entre la densité cellulaire.cm<sup>-2</sup> obtenue sans phages. .... 58

**Figure 23** : Images MEB de la surface d'une pastille de TCP après culture de cellules ostéoblastiques : Temps de culture : 48 h. Barres d'échelle : (Surface) A :  $\times 100$ , B :  $\times 2000$ . 58

**Figure 24** : Protection des cellules eucaryotes pré-ostéoblastes MC3T3-E1 contre les cellules bactériennes *S. aureus* par le phage Remus chargé sur des matériaux TCP. Les ostéoblastes étaient incubés dans du DMEM additionné de 10 % de sérum bovin foetal à 37°C dans des plaques à 12 puits contenant des pastilles de TCP avec ou sans phages Remus chargés et avec ou sans bactérie *S. aureus* ( $10^6$  UFC/mL). La densité cellulaire eucaryote par cm<sup>2</sup> a été mesurée après 14 h de croissance dans différentes conditions : (A) en fond de puits + Pastilles TCP (contrôle), avec des bactéries ajoutées (bactéries), avec des phages chargés (phages)

et avec des bactéries et des phages chargés (phages & bactéries). (B) Comme dans (A) mais la mesure a été effectuée sur des cellules cultivées uniquement sur la surface de la pastille. (C) Dans les deux conditions contenant des bactéries, (bactéries) et (phages et bactéries) comme dans (A) et (B), la densité des cellules bactériennes a également été mesurée par dénombrement de *S. aureus* après 14 h d'incubation. La mesure de la croissance bactérienne dans du DMEM supplémenté seul a été effectuée comme témoin (milieu). \*\*\* indiquer  $p < 0,001$  entre la densité cellulaire  $\cdot \text{cm}^{-2}$  ou les UFC/mL obtenus pour les expériences par rapport à l'échantillon non traité ou au milieu de contrôle..... 60

**Figure 25** : poudre apatitique synthétisée à froid en présence de bactériophage ..... 69

**Figure 26** : Synthèse de poudre apatitique en présence de bactériophage. .... 70

**Figure 27** : protocole d'analyse des biofilms ..... 71

**Figure 28** : Evolution du coefficient de décorrélation en fonction du temps d'incubation pour : A : échantillon témoin sans biofilm, B : Lors de la formation de biofilm, avec différentes fenêtres temporelles :  $0\mu\text{s}-5\mu\text{s}$ ,  $3\mu\text{s}-8\mu\text{s}$ ,  $5\mu\text{s}-10\mu\text{s}$ ,  $16\mu\text{s}-21\mu\text{s}$  (bande de fréquence 9MHz-11MHz) ; C : présente la cinétique de la formation de biofilm de *S. aureus* sur un substrat en acier inoxydable..... 72

## **Tables des tableaux**

<b>Tableau 1:</b> Nombre de phage retenu sur les pastilles $\beta$ -TCP.....	42
<b>Tableau 2 :</b> Nombre de phages retenus sur les céramiques $\beta$ -TCP. ....	48



**« La grandeur des actions humaines se  
mesure à l'inspiration qui les fait naître »**

**Louis Pasteur**

Je remercie les professeures Christèle Combes et Valérie Leclère ainsi que le docteur Sébastien Bontemps-Gallo d'avoir accepté d'évaluer cette HDR et de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury.

Je suis de même très honoré de la présence du professeur Christian Courtois et du professeur Jean-Christophe Hornez pour avoir accepté d'examiner ce travail et de siéger au sein de ce jury.

Je tiens également à remercier le professeur Jean-Marie Lacroix pour m'avoir guidé dans mes travaux de recherche et d'avoir accepté d'être mon référent pour cette HDR.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement, de par leur expertise à l'aboutissement de tous les travaux exposés dans cet ouvrage.

A mon épouse,

A mes enfants,

A ma famille,

A mes ami(e)s.

## I. Parcours personnel et professionnel

### 1. Parcours de formation

- 2006** : **Doctorat** en sciences de la vie et de la santé : mention très honorable et félicitation du jury, Université des Sciences et Technologies de Lille (Univ. Lille 1),
- 2001-2002** : **DEA** des sciences de la vie et de la santé, option : Structure et expression des génomes ; mention : Bien, Université des Sciences et Technologies de Lille (Univ. Lille 1),
- 2000-2001** : **Maîtrise** de Biologie Cellulaire et Physiologie Cellulaire ; mention : Bien , Université des Sciences et Technologies de Lille (Univ. Lille 1),
- 1999-2000** : **Licence** de Biologie Cellulaire et Physiologie Cellulaire ; mention : Bien, Université des Sciences et Technologies de Lille (Univ. Lille 1),
- 1998-1999** : **DEUG** Science de la Vie, Filière Biologie ; mention : Bien, Université des Sciences et Technologies de Lille (Univ. Lille 1),
- 1998-1997** : **PCEM1**, validation de la 1<sup>ère</sup> année de médecine, Université de droit et Santé (Univ. Lille 2).
- 1996** : **Baccalauréat scientifique** option SVT (science de la vie et de la terre), Lycée de L'Escaut 59300 Valenciennes.

### 2. Parcours professionnel

- **Depuis le 1<sup>er</sup> février 2008**

Maître de conférences Hors classe en section CNU64 au sein de l'Université Polytechnique des Hauts de France (ex-Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis) et délégué à l'INSA HdF (Institut National des Sciences appliquées des Hauts de France de 59313 VALENCIENNES).

- *Coordinateur pédagogique des formations en Sciences de la vie / biotechnologies et agroalimentaire depuis 2020 (INSA/UPHF)*
- *Directeur du département biotechnologies et agroalimentaire ISTV/UPHF de 2007/2020*
- *Membre suppléant élu au sein du conseil de l'institut de formation des soins infirmiers de Valenciennes, Maubeuge et Cambrai depuis aout 2018.*
- *Membre élu au Conseil d'administration de l'UPHF (2015/2019)*
- *Membre élu au conseil d'institut de l'ISTV (2010/2015) et (2015/2019)*
- *Membre suppléant élu du conseil de discipline de l'IFSI depuis novembre 2018*

- *Chargé de mission, Responsable du centre universitaire « la Forêt » de Cambrai de novembre 2010 à septembre 2016*
- *Directeur des études du Master Nutrition, Sciences des aliments parcours Maîtrise de qualité et des Risques pour les BPF dans le secteur Agroalimentaire (par apprentissage) depuis 2006.*
- *Membre élu au Conseil des Études et de la Vie Universitaire et au comité des formations du personnel de l'UVHC (2007/2012)*
- *Formation en 2012 en génétique microbienne pour l'entreprise agroalimentaire Ajinomoto située sur Nesle (80) (amélioration métabolique et rendement de production de biomolécules).*

### **Enseignements :**

- *Enseignement de microbiologie, microbiologie alimentaire, chimométrie, génétique, immunologie, biologie moléculaire et biotechnologies en Licence Sciences de la vie parcours biotechnologies et Agroalimentaire et parcours santé*
- *Enseignement de biochimie alimentaire et d'hygiène et sécurité sanitaire en Master nutrition et Sciences des aliments,*
- *Enseignement de biologie à l'IUT pour la licence Pro CoQua (contrôle qualité).*
- *Enseignement de microbiologie et génétique en L3P parcours LAS*
- *Enseignement de biologie en DU Tremplin*
- 

### **Recherche actuelle :**

Laboratoire des matériaux céramiques et des procédés avancés LMCPA EA2443 / UPHF Maubeuge : équipe des biomatériaux

- *Synthèse des matériaux à base d'hydroxyapatite et TCP (phosphate tricalcique)*
- *Tests biologiques des biomatériaux, étude des biofilms sur les biomatériaux*
- *Fonctionnalisation biologique des biomatériaux.*
- *Phagothérapie*

#### **- Du 1<sup>er</sup> septembre 2007 au 31 janvier 2008**

Enseignant contractuel au sein de l'ISTV (Institut des sciences et techniques de Valenciennes). Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis. 59313 VALENCIENNES.

#### **- Du 1<sup>er</sup> octobre 2005 au 31 août 2007**

Contrat d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche au sein de l'ISTV. Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis. 59313 VALENCIENNES.

- *192 heures/an d'enseignement en Licence Sciences pour l'Ingénieur (SPI) parcours IUP Agroalimentaire et Master Professionnel Agroalimentaire, enseignement sur les méthodes d'analyses physico-chimique en agro-alimentaire, enseignement en Hygiène et Sécurité alimentaire, génie génétique et biotechnologie en agro-alimentaire.*

- *Responsable de Stage L3 SPI parcours agroalimentaire et 3<sup>ème</sup> année IUP Génie des Systèmes Agro-Industriels.*
- *Participation à l'obtention de l'habilitation du Master professionnel agroalimentaire régional (Mise en place de la maquette pédagogique).*

- **2001-2006**

Préparation du Diplôme d'Études Approfondies et Doctorat (allocataire de recherche) en Biologie-Santé au laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle de Lille (UGSF) au sein de l'équipe de Génétique des enveloppes bactériennes. UMR8576 CNRS/USTL 59655 Villeneuve d'Ascq.

Sujet: Impact des mutations OPG sur la virulence de *Erwinia Chrysanthemi*: Recherche de suppresseurs et analyse protéomique des mutants.

- **Années 2002 à 2005**

Contrat de Monitorat au sein de l'université des sciences et technologie de Lille. 59655 Villeneuve d'Ascq.

- *96 heures/an d'enseignement en travaux pratiques de génétique bactérienne, génétique des eucaryotes unicellulaires et de protéomique en licence et maîtrise de biochimie et biologie cellulaire.*

### 3. Encadrements étudiants

- **Diplôme de doctorat d'université :**

**Maxime Decodts 2021/...** : **Intitulé de thèse** : Biomatériaux et lutte contre les biofilms installés de structure homogène et hétérogène.

**Shaan Chamary 2014/2017** : **Intitulé de la thèse** : Influence d'une architecture poreuse en biocéramique sur la colonisation, prolifération et activité cellulaire.

**Hélène Philippot 2015/2017** : **Intitulé de thèse** : Imprégnation de biocéramiques phosphocalciques avec des bactériophages afin de lutter contre les infections /nosocomiales en chirurgie osseuse.

- **Stage de laboratoire de L3 Sciences de la vie au laboratoire CERAMATHS :**

**Driss ELAROUSSI 2019 (2 mois) L3 SV :**

**Sujet I :** Estimation de la Concentration Minimale Inhibitrice CMI, des trois huiles essentielles (Copaïba, Arnica, Arnica + argent)

**Sujet II :** Recherche d'un mutant responsable de restaurer la pellicule (phénotype : virulence) chez la souche bactérienne mutante *Dickeya dadantii*.

**Charlotte Debus 2020 (2 mois) L3 SV :**

Étude de la formation de pellicule chez *Dickeya dadantii* dans différents contextes génétiques : analyses par q-PCR et recherche de révertants de souches OPG – déficientes en *rscC*.

**Benjamin Planquais 2021 (2 mois) L3 SV:**

Optimisation du dopage par les bactériophages d'un biomatériau céramique

**Chris Bouthemy 2022 (2 mois), L3 SV:**

Lutte contre les biofilms matures par utilisation de poudre TCP chargé en phage encapsulée.

**Mila Maréchal, 2022 (1 mois), Etudiante 1ere année ingénieur polytech'Lille**

Lutte contre les biofilms par utilisation de poudre chargée en nisine et phage

**Carlos Gomez Parra 2023 (2 mois), L3 SV :** Détermination de la CMI de la nisine vis-à-vis d'une souche d'*Escherichia coli* et d'une souche de *Bacillus subtilis* en vue du dopage de poudre TCP.

**Sarah IBRAHIM, 2023 (2 mois), L3 SV :** Etude de l'implication du système phosphorelais Rcs dans la formation de pellicule chez *Dickeya Dadantii*.

**Cégolène Béthourné, 2023 (1 mois), L3 PC :** Etude du relargage au cours du temps de bactériophages d'une poudre apatitique synthétisée à froid en milieu statique et agité.

## 4. Publications Scientifiques

### a. Articles dans revues internationales à comité de lecture

Clémence Cochard, Marine Caby, Edwige Madec, Peggy Gruau, Chrystelle Le Danvic, Michael Marceau, Jérôme Lemoine, Franck Bouchart, Sébastien Bontemps-Gallo, and Jean-Marie Lacroix, *Emergence of the Dickeya genus involved duplication of the OmpF porin and adaptation of EnvZ-OmpR signaling network*. *Accepted chez Microbiology Spectrum 07/2023*.

Shaan Chamary, Liliana Grenho, Maria Helena Fernandes, Franck Bouchart, Fernando Jorge Monteiro, Jean Christophe Hornez. *Influence of a macroporous  $\beta$ -TCP structure on human mesenchymal stem cell proliferation and differentiation in vitro*. *Open Ceramics*, volume 7, September 2021, 100141

Rached Ismail, Natalia D. Dorighello Carareto, Jean-Christophe Hornez, and Franck

Bouchart. *A Localized Phage-Based Antimicrobial System: Effect of Alginate on Phage Desorption from  $\beta$ -TCP Ceramic Bone Substitutes*. *Antibiotics*. 2020, Sep; 9(9): 560.

Franck Bouchart, Olivier Vidal, Jean-Marie Lacroix, Shaan Chamary, Annie Brutel, and Jean-christophe Hornez. *3D printed bioceramic for phage therapy against bone nosocomial infections*. 2020. *Materials Science & engineering. C, Materials for Biological Applications*, 12 Mar 2020, 111:110840

E. Meurice, F. Bouchart, J.C. Hornez, A. Leriche, D. Hautcoeur, V. Lardot, F. Cambier, M.H. Fernandes, F. Monteiro. *Osteoblastic cells colonization inside beta-TCP macroporous structures obtained by ice-templating*. *Volume 36, Issue 12, September 2016, Pages 2895–2901*.

J.C. Hornez, F. Bouchart, E. Meurice, M. Descamps and A. Leriche. *Synthesis and fabrication of porous calcium phosphate ceramics for antibacterial bone substitutes*. *MATEC Web of Conferences 7:04019 · November 2013*

Ahmed Bachar, Georges Nassar, Cyrille Mercier, Franck Bouchart, Claudine Follet, Rachid Amrousse, Michel Kazan. *High frequency ultrasound measurements on a translucent thin bioglass, based on Si, Ca, Na: Study of the distribution of elastic modulus*. *Optical Materials, november 2013 Volume 36, Issue 1, p. 75-79*.

Edwige Meurice, Emmanuelle Rguitti, Annie Brutel, Jean-christophe Hornez, and Franck Bouchart. *New antibacterial microporous CaP materials loaded with phages for prophylactic treatment in bone surgery*. (2012) *October 2012, Volume 23, Issue 10, pp 2445-2452, journal of materials science: materials in medicine*.

Edwige Meurice, Anne Leriche, Jean-Christophe Hornez, Franck bouchart, Emmanuelle Rguiti, Laurent Boilet, Michel Descamps, and Francis Cambier. *Functionalisation of porous hydroxyapatite for bone substitutes*. *Journal of the European ceramic society, Volume 32, Issue 11, August 2012, Pages 2673–2678*.

Franck Bouchart, Gilles Boussemart, Anne-France Prouvost, Virginie Cogez, Edwige Madec, Olivier Vidal, Brigitte Delrue, Jean-Pierre Bohin,, and Jean-Marie Lacroix. *The Virulence of a Dickeya dadantii 3937 Mutant Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans Is Restored by Inactivation of the RcsCD-RcsB Phosphorelay*. *Journal of Bacteriology, July 2010, p. 3484-3490, Vol. 192, No. 13*

Franck Bouchart, Aurélie Delangle, Jérôme Lemoine, Jean-pierre Bohin, Jean-Marie Lacroix. *Analysis of the proteome alterations in osmoregulated periplasmic glucan mutant of the phytopathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi*. *Microbiology, 153 (2007) p760-767*.

Anne Bohin, Franck Bouchart, Colette Richet, Osarath Kol, Yves Leroy, Philippe Timmerman, Guillemette Huet, Jean-Pierre Bohin and Jean-Pierre Zanetta. *GC/MS identification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives*. *Analytical Biochemistry, 340 (2005)*

p231-244.

- **Ouvrages individuels**

Franck BOUCHART. Impact des mutations OPG chez *Erwinia Chrysanthemi*. Editions Universitaires européennes

Franck BOUCHART. Impact des mutations OPG chez *Erwinia chrysanthemi* : Recherche de suppresseurs et analyse protéomique des mutants. Thèse 2006.

- **Actes publiés de conférences internationales**

Franck Bouchart, Francine Monchau, philippe Hivart, Jean-christophe Hornez, and Michel Descamps. *Low temperature synthesis of hydroxyapatite by wet precipitation method*. 9<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 2012.

A. Leriche, J-C Hornez, F. Bouchart, E. Rguitti, L. Boilet, E. Meurice, M. Descamps, and F. Cambier. Functionalization of porous hydroxyapatite for bone substitutes. 12<sup>th</sup> conference of the european ceramic society- ECerS XII, Stockholm, Sweden – 2011.

## 5. Communications

Rached Ismail, Natalia Carareto, Jean-Christophe Hornez, Franck Bouchart, *Impact of alginate as an overlayer for bacteriophage loaded  $\beta$ -TCP ceramic bone substitutes on the delay of phagic desorption*, 3<sup>rd</sup> BIOMAT congress Materials for health 2019, 3-7 juin 2019, La grande Motte, France.

F. Bouchart, Biomatériaux et phagothérapie, atelier de biotechnologies, Eurasanté, 15 novembre 2018, Lille

A.Leriche, J.C.Hornez, F.Bouchart, E.Meurice, D.Hautcoeur, V.Lardot, F.Cambier. "Influence of porous scaffolds structure on their mechanical properties and cell colonization ability" 39<sup>th</sup> international conference on Advanced ceramics and composites - Daytona 26-30 janvier 2016

F. Bouchart, Biomatériaux et phagothérapie, réseau bactériophage France, 5 février 2015, institut Pasteur Paris

H. Philippot, J.-C. Hornez, E. Meurice, S. Chamary, A. Hanafia, A. Leriche, F. Bouchart, Bacteriophage loading of calcium phosphate bio-ceramics : a tool against infections in bone surgery, colloque *interactions Phages-Bactéries: du fondamentale à l'appliquée*, (colloque IPB), Montpellier, 19-20 novembre 2015.



Dominique Hautcoeur, Shaan Chamary, Edwige Meurice, Franck Bouchart, Jean-Christophe Hornez, Anne Leriche, Véronique Lardot, Francis Cambier, Maria Helena Fernandes and Fernando Monteiro "Influence of macroporosity architecture on human cell invasion inside ceramic scaffolds". *Conférence ECERS14 Toledo juin 2015*

S.Chamary, E.Meurice, D.Hautcoeur, J-C.Hornez, F.Bouchart, A.Leriche, M-H.Fernandes, F.Monteiro.  $\beta$ -TCP porous scaffolds : part 2. Relation between structure and cell invasion, *2015 BCers annual meeting, October 26, 2015, Mons, Belgium*.

S.Chamary, E.Meurice, D.Hautcoeur, J-C.Hornez, F.Bouchart, A.Leriche, M-H.Fernandes, F.Monteiro, Impact of macroporous phosphate calcium architecture on cell invasion: an in vitro study of cell invasion of freeze casted samples, *NEWGEN MP1301 Workshop, October 13-14, 2015, Sofia, Bulgaria*.

A.Leriche, Y. Lorgouilloux, C.Courtois, , E.Meurice, F.Bouchart and JC Hornez, ,D. Hautcoeur, S.Hocquet, V. Lardot, F. Cambier, M.H.Fernandes, F.Monteiro, B. Nait-Ali, D. Smith, M.Gonon « Process methods for close controlled pore size and morphology in ceramics" *EUROMAT 2015 Warsaw 21-24 septembre*

A.Leriche, Y.Lorgouilloux, C.Courtois, E.Meurice, F.Bouchart and JC Hornez, D.Hautcoeur, S.Hocquet, V.Lardot, F.Cambier, M.H. Fernandes, F.Monteiro, Univ.Porto, B. Nait-Ali, D. Smith, M. Gonon, , UMons "Processing of Macro and Microporous Ceramics for Bone Substitutes and Functional Composites Applications". *11<sup>th</sup> Pacific Rim Conference of ceramic Societies – Jeju, Corée, 30 août au 4 septembre 2015*

E.Meurice, F.Bouchart, J.C. Hornez, A.Leriche, D. Hautcoeur, S.Hocquet, V. Lardot, F. Cambier, BCRC, M.H.Fernandes, F.Monteiro. « Osteoblastic cell colonization inside beta-TCP macroporous structures obtained by ice-templating.Loading and release of bacteriophages" *Advanced Research Workshop Engineering Ceramics 2015 Materials for Better Life May 10-14, 2015 Smolenice,Slovaquie*.

E. Meurice, J.-C. Hornez, F. Bouchart, A. Leriche, D. Hautcoeur, V. Lardot, F. Cambier, M.-H. Fernandez, F. Monteiro, *Characterization of osteoplastic and endothelial cells invasion of macroporous b-TCP ceramic developed by ice-templating-REDEOR Conference, 24-27/03/2015, Venise*.

A.Leriche, JC. Hornez, F.Bouchart, E.Meurice "Influence of porous architecture of scaffolds obtained from different routes on the cell colonization" *NEWGEN COST meeting Malta 26 février 2015*

Franck Bouchart, Biomatériaux et bactériophages, *réseau bactériophage, institut Pasteur, 5 février 2015, Paris*.

A. Leriche; J. Hornez; F. Bouchart; E. Meurice; D. Hautcoeur; V. Lardot; F. Cambier *Influence of porous scaffolds structure on their mechanical properties and cell colonization ability ICACC2015, Daytona Beach (USA), du 24 au 31 janvier 2015*

F. Bouchart, Modèle de Biomatériaux conjugués à des bactériophages, GEEPHAGE, Projet bactériophages antistaphylocoques et infections ostéo-articulaires, CHU Pitié Salpêtrière PARIS le vendredi 10 janvier 2014

J.C Hornez, F. Bouchart, E. Meurice, M Descamps, A Leriche, Hydroxyapatite porous scaffold and phage therapy for bone surgery. THERMEC'2013 International Conference on Processing and Manufacturing of advanced materials, 2-6 décembre 2013, Las Vegas, (USA).

J.-C. HORNEZ, F. BOUCHART, E. MEURICE, M. DESCAMPS, A. LERICHE. Synthesis and fabrication of porous calcium phosphate ceramics for antibacterial bone substitutes. SF2M Annual Meeting 2013. 29-31 octobre 2013, Ecole Centrale de Lille, Villeneuve d'Ascq.

JC Hornez, F. Bouchart, A Leriche, From powder to macroporous phosphocalcic spherical granules with biological functionalization. Third International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials. 3-7 march 2013, Sorrento, Italy.

A. Leriche, JC Hornez, F. Bouchart, E. Meurice, M. Descamps, D. Hautcoeur, V. Lardot, F. Cambier. Fabrication methods of macro and microporous hydroxyapatite scaffolds for phage therapy. MIME Materials in medicine international conference. October 8 -11, 2013 | Faenza, Italy

A.Bachar, G.Nassar, C.Mercier, F.Bouchart, C.Follet High frequency ultrasound measurement in a thin bioglass element, based on Si, Ca, Na, versus different technological parameters: Study on the dispersion of the mechanical properties International conference on Advanced Materials for Photonics, Sensing and Energy Conversion Applications (AMPSECA) 2012, El Jadida, Maroc, 5-7th december 2012

F.Bouchart, F.Monchau, P.Hivart, J-C.Hornez, M.Descamps "Low temperature synthesis of hydroxyapatite by wet precipitation method." 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 2012

J.C.Hornez, F.Bouchart, A.Leriche, E.Constantin-Rguiti, M.Descamps. "Chemical and biological functionalization of porous calcium phosphate blocks and spherical granules." THERMEC'2011 Québec city, Canada - August 1 – 5, 2011

A.Leriche, J.C.Hornez, F.Bouchart, E.Rguiti, L.Boilet, E.Meurice, M.Descamps, F.Cambier Functionalization of porous hydroxyapatite for bone substitutes 12th Conference of the European Ceramic Society, Stockholm (Sweden), 19-23 Juin 2011

A.Leriche, J.C.Hornez, F.Bouchart, E.Meurice, M.Descamps "Functionalization of macro and microporous calcium phosphate ceramics" IV Portuguese-Spanish Congress on Ceramics and Glasses, 16-18 november 2011 – Aveiro (Portugal)

A.Leriche, J.C.Hornez, F.Bouchart, E.Meurice, M.Descamps "Porous calcium phosphate ceramics and their functionalisation for bone substitutes" PAC RIM 9 - 10-14 July 2011 - Cairns (Australie)

A. Bachar, C. Mercier, C. Follet, A. Tricoteaux, A. Leriche, F. Bouchart, M. Saadi Influence de l'azote sur les propriétés des bioverres oxyfluoronitrurés, Proceedings of XIIIème Congrès bisannuel de la Société Française de Génie des Procédés. Des procédés au service du produit au coeur de l'Europe, SFGP 2011 du 29 Novembre au 1er Décembre, Lille Grand Palais.

C. Mercier, C. Follet, A. Tricoteaux, A. Leriche, F. Bouchart et M. Saadi « Influence de l'azote sur les propriétés des bioverres oxyfluoronitrurés » XIIIème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Lille, 29 novembre-1 décembre 2011

C. Mercier, A. Bachar, C. Follet, A. Tricoteaux, A. Leriche, F. Bouchart et M. Saadi. « Elaboration, propriétés de nouveaux bioverres dopés à l'azote ». Matériaux 2010, Nantes , 22-24 Octobre 2010.

J.C. Hornez\_, M. Descamps, F. Bouchart, E. Constantin-Rguiti, F.Chai, H. F. Hildebrand, A. Leriche "FROM SYNTHESIS TO THE FUNCTIONALIZED PHOSPHOCALCIC CERAMIC." 4RIPT-3S2TS Lille, France - December 2-4, 2009.

6<sup>ème</sup> congrès national de la Société Française de microbiologie (SFM), Bordeaux, 10,11 et 12 mai 2004 et 4<sup>ème</sup> Journée André Verbert, Lille octobre 2004 ↪ Des mutations suppressives restaurant la virulence des mutants dépourvus de Glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Erwinia chrysanthemi*.

**Journée de Microbiologie moléculaire**, Membranes et sécrétion, Institut Pasteur Paris, 4 mars 2004 : ↪ Suppression génétique du phénotype induit par l'absence d'OPG chez *Erwinia chrysanthemi*

**20<sup>ème</sup> Journée Française de spectrométrie de masse (JSFM)**, Toulouse, 15-19 septembre 2003

↪ Impact of the absence of osmoregulated periplasmic glucans on the proteome of *Erwinia chrysanthemi*.

## II. Activités d'enseignements

### 1. Activités pédagogiques

Mes enseignements sont essentiellement scientifiques et pluridisciplinaires. Mes interventions concernent plus particulièrement la licence Sciences de la vie parcours biotechnologies et agro-alimentaire puis le master Nutrition et Sciences des aliments

parcours maîtrise de la qualité et des risques pour les bonnes pratiques de fabrication en industrie agroalimentaire. Cette formation est assurée au sein de l'Institut national des Sciences appliquées des Hauts-de-France, composante de l'université polytechnique des Hauts de France. Cette formation de Licence /Master est le fruit de la transformation de l'IUP (institut universitaire professionnalisé) en Génie des Systèmes Agro-Industriels créé en 1998. Suite à la suppression des IUP au niveau national en 2005, j'ai modifié et créé la formation en vue de suivre le dispositif LMD. Cette formation s'inscrit dans le respect du cahier des charges des parcours IUP qui était défini par l'ADIUP (association des directeurs d'IUP). J'enseigne également en licence professionnelle parcours CoQua de l'IUT Mesures physiques. Je suis à l'origine de la création de chaque enseignement dont j'ai la responsabilité. Chaque support de cours est transmis en ligne aux étudiants via la plateforme Doodle.

#### *a. Enseignements en Master Nutrition, Sciences des Aliments*

Le module de **biochimie alimentaire** (responsable UE : F. BOUCHART) est une unité d'enseignement commune à tous les masters en nutrition et sciences des aliments de la région Hauts de France. En effet, ce master découle d'une collaboration très étroite entre les 4 universités de la région (Université polytechnique des Hauts de France, Université d'Artois, université du Littoral et côte d'Opale ULCO et de l'université de Lille). Le programme est commun à toutes les universités et l'évaluation du module se réalise par le biais d'un examen régional. Responsable de cette UE au sein de l'UPHF, je participe à l'élaboration du programme et du sujet d'évaluation. Le contenu du cours de biochimie alimentaire a pour objectif d'apporter des connaissances sur les structures des polysaccharides, des protéines et des lipides alimentaires, puis de comprendre leurs propriétés fonctionnelles tout en intégrant les réactivités entre ces molécules dans les diverses réactions de brunissement. Le contenu du programme est accessible en ligne via la fondation UNIT à l'adresse suivante : <http://biochim-agro.univ-lille1.fr>, les étudiants ont la possibilité de réviser leur cours et de s'autoévaluer par le biais de QCMs disponibles sur la plateforme numérique. Chaque partenaire a participé de manière équivalente à l'élaboration de cet enseignement.

Le module en **Hygiène et sécurité alimentaire** (responsable UE : F. BOUCHART) a pour objectif d'élargir la connaissance des étudiants au niveau des dangers présents au sein des industries agroalimentaires et des restaurations collectives (dangers biologique, chimique et physique) tout en étant capable d'entreprendre une démarche de maîtrise de ses dangers et d'évaluer leurs risques. Pour cela, la notion de toxoinfection alimentaire collective ou non est étudié sur la base de données publiées par l'INVS (institut de veille sanitaire), les étudiants doivent être capable d'entreprendre une démarche de prévention au sein de leurs entreprises respectives. En effet, le master nutrition et sciences des aliments est une formation par apprentissage, ce qui permet d'effectuer un enseignement interactif par échange des expériences

respectives de chaque étudiant dans la démarche et méthodologies de sécurité sanitaire des aliments. Au sein de ce module d'enseignements, la méthode HACCP (Hazard analysis critical control point) ainsi que les Guides de bonnes pratiques d'hygiène GBPH sont utilisés afin de comprendre la démarche de prévention au travers des prérogatives de sécurité sanitaire des aliments. Ce qui permet, par la suite, aux étudiants de mieux entreprendre la notion de dangers sur ligne de production et d'être plus réactifs en cas de gestion de crises.

#### *b. Enseignements en Licence Sciences de la vie.*

- Enseignement en **microbiologie générale** (responsable UE : F. BOUCHART) : Cet enseignement a pour objectif de présenter la classification du monde microbien, après cette présentation générale, le contenu s'attarde plus particulièrement sur la bactériologie (structure des bactéries et fonctions des différents constituants cellulaires) puis sur la présentation des cellules unicellulaires eucaryotes (structures, fonctions) et le cours se termine par une partie en virologie (structure /fonctionnalité des virus eucaryotes et bactériophages). A la suite de ce module d'enseignement, les étudiants suivent des travaux pratiques en bactériologie (manipulation stérile, observation microscopique, coloration Gram, dénombrement cellulaire, suivi de croissance en milieu solide et liquide).
- Enseignement en **microbiologie alimentaire** (responsable UE : F. BOUCHART) : Cet enseignement a pour objectif d'acquérir des connaissances approfondies sur les différentes propriétés fermentaires des microorganismes, de maîtriser les techniques de détection des microorganismes dans un produit intermédiaire, fini et dans l'environnement de production alimentaire tout en respectant les normes d'analyse microbiologique utilisées en IAA. A la suite de cet enseignement, les étudiants sont capables de créer un laboratoire de contrôle microbiologique en entreprise et de respecter les règles d'hygiène et sécurité au travers de leur infrastructure. Un cours plus synthétique et simplifié de cette discipline est assuré en licence professionnelle CoQua de l'IUT Mesures physiques regroupant des étudiants de disciplines antérieures variées et pour certains avec un manque de baguage en biologie.
- Enseignement en **biotechnologies et génie génétique** (responsable UE : F. BOUCHART) : Cet enseignement a pour objectif de comprendre les règles de l'hérédité génétique chez les eucaryotes selon la génétique mendélienne et non mendélienne, de connaître et de maîtriser les différents échanges génétiques chez les procaryotes afin d'acquérir des compétences dans la création de microorganismes génétiquement modifiés en biotechnologie blanche, rouge, ... Une partie du cours est également focalisée sur la notion des OGM chez les organismes supérieurs notamment chez les plantes afin d'en connaître les bénéfices et les risques liés sur l'environnement et la santé.

- Enseignement en **chimométrie** (responsable UE : F. BOUCHART) : L'objectif principal de cet enseignement est de maîtriser les outils statistiques permettant de comparer des méthodes physico-chimiques. Pour cela les étudiants acquièrent des connaissances sur la robustesse d'un résultat d'une analyse, sur l'incertitude du résultat, sur les analyses inter et intra-laboratoire, sur la fidélité et la justesse d'une méthode, sur l'étalonnage des méthodes d'analyses afin de garantir leur linéarité.
- Enseignement en **biologie moléculaire** (responsable UE : F. BOUCHART) : Les structures et les fonctions des acides nucléiques sont enseignées au cours de cet enseignement afin d'acquérir les techniques de clonage, d'amplification, d'expression des acides nucléiques au sein des cellules transformées. La plasticité de l'ADN est donc exposée et les analyses génomique/protéomique sont également exposées. Les étudiants sont également capables d'utiliser les outils informatiques d'analyses afin de pouvoir travailler sur leur méthode de clonage par bio-informatique préalablement avant d'appréhender toutes manipulations pratiques.
- Enseignement en **immunologie** (responsable EC : F. BOUCHART) : L'objectif principal de cet enseignement est de comprendre le fonctionnement global du système immunitaire passant par le fonctionnement des différents organes impliqués dans l'immunité ainsi que d'obtenir une connaissance approfondie du fonctionnement des différentes cellules de l'immunité.
- Enseignement en **Embryologie** (responsable EC : F. BOUCHART) : L'objectif est d'obtenir une connaissance globale des différentes étapes du développement embryonnaire en passant par des exemples précis notamment chez l'Homme et la drosophile.
- Enseignement en **découverte du secteur biotechnologies et agroalimentaire** : En passant par la présentation du secteur des biotechnologies et de l'agroalimentaire, l'objectif de cet enseignement est de présenter les différents métiers de l'agroalimentaire et de la bio-industrie tout en présentant la conception de divers produits alimentaires (production) en introduisant la notion de danger et des risques liés. Ce module est destiné aux premières années en vue de préparer leur projet professionnel et d'obtenir des informations sur les possibilités de réorientation interne à l'université durant la L1. En effet, chaque filière présente les métiers liés à leur discipline.

### *c. Enseignements effectués en qualité de Moniteur de 2002 à 2005.*

Sous contrat de monitorat par l'intermédiaire du CIES (Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur) du Nord-Pas-de-Calais/Picardie, j'ai enseigné et encadré un effectif de 24 étudiants par séances de TP (Travaux Pratiques). Pendant mes 3 ans de monitorat, j'ai effectué 96h de TP par année pour les Unités de valeur suivantes :

- UV de bactériologie fondamentale et génétique bactérienne (responsable Pr. J.P. Bohin, 24h de TP en S5, licences de Biochimie ou Biologie Cellulaire).

Etude de l'effet de divers antibiotiques. Mutagenèse par Ultraviolet chez *Bacillus subtilis* : recherche de mutants d'auxotrophie et de sporulation. Analyse génétique par conjugaison bactérienne, transduction généralisée et spécialisée. Etude des bactériophages chez *Escherichia coli* : lysogénie et cycle lytique. Chaque séance de TP de Bactériologie fondamentale se clôturait par un contrôle des connaissances acquises pendant la séance précédente. J'ai ainsi corrigé et noté une partie de ces contrôles.

- UV de génétique des eucaryotes unicellulaires (responsable Pr.S. G. Ball, S5, licences de Biochimie ou Biologie Cellulaire).

Etude du système Killer chez *Saccharomyces cerevisiae* : notion d'hérédité maternelle (mitochondriale). J'ai participé à la correction des rapports rédigés par les étudiants sur cette étude.

- Travaux d'étude et de recherche en génétique bactérienne (responsable MCF J.-M Lacroix, 100h de TP en Master 1, filière de Génétique et Microbiologie). Analyse génétique et moléculaire du gène *btuB* codant le récepteur de la vitamine B12 chez *Escherichia coli*. Obtention de mutants, cartographie génétique, clonage moléculaire du gène, étude de sa régulation par fusions traductionnelles.

Travaux d'étude et de recherche de protéomique et pathogenèse bactérienne (25h de TP en Master 1, filière de Génétique et Microbiologie). J'ai participé activement à la conception de cet enseignement de TP, qui a pour objectif l'Analyse protéomique comparative du protéome de la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* cultivée dans différentes conditions. Les étudiants des TER devaient constituer un projet de recherche sur la mise en évidence de la fonction d'un gène et le défendre oralement devant un jury dans lequel j'ai participé.

#### *d. Prestation de formation en entreprise.*

En 2012, j'ai animé une formation d'une journée en génétique microbienne pour l'entreprise agroalimentaire Ajinomoto située sur Nesle (80) (amélioration métabolique et rendement de production de biomolécules). L'objectif de cette formation était de former le personnel du laboratoire aux techniques de génétique microbienne en vue d'augmenter la rentabilité de production d'un métabolite secondaire.



## 2. Présentations synthétiques des enseignements

Unité d'enseignement	Nature et volume	Niveau	Type de formation	Effectifs	Présentielle/distance
Biochimie alimentaire	25h CM et 25h TD	Master	Apprentissage, initiale, continue	30	présentielle
Hygiène et sécurité alimentaire	25h CM et 25h TD	Master	Apprentissage, initiale, continue	30	présentielle
Microbiologie alimentaire	16h CM, 14h TD, 16h TP	Licence 3	initiale	30	présentielle
Chimimétrie	12h CM, 16h TD	Licence 3	initiale	30	présentielle
Biotechnologies et génie génétique	16h CM, 16h TD, 20h TP	Licence 3	initiale	30	présentielle
Biologie moléculaire	18h CM, 16h TD, 12h TP	Licence 2	initiale	30	présentielle
Microbiologie générale	20h CM, 16h TD, 16hTP	Licence 2	initiale	30	présentielle
Immunologie	13h CM, 7h TD	Licence 2	initiale	30	présentielle
embryologie	10h TD	Licence 1	initiale	50	présentielle
Découverte du secteur des biotechnologies et agroalimentaire	16h TP	Licence 1	initiale	50	présentielle
Notion de biologie et microbiologie	20h TD	Licence PRO	Continue et initiale	20	présentielle

En complément à l'enseignement, j'ai également en charge le suivi d'étudiants de master qui sont en contrat d'apprentissage au sein de leur entreprise d'accueil. 3 visites/an sont effectuées afin de suivre au mieux les étudiants. En L3, un stage de 2 mois est également effectué au mois de janvier et février. Un rapport de stage en L3 et d'activité en master sont rédigés par les étudiants et qui sont évalués par un jury. A la suite de la restitution des rapports, une soutenance orale a lieu devant un jury composé d'universitaires et de professionnels. Je participe activement à tous les jurys de la formation de licence SV et de master NSA.

## 3. Responsabilités, animation et montage de formations

### a. Responsabilités pédagogiques

Depuis 2006, je suis **directeur des études du Master NSA** (nutrition et sciences des aliments) dont j'ai la responsabilité d'organiser les emplois du temps, l'alternance en apprentissage et le calendrier des sessions d'examens, ainsi que la gestion des recrutements des intervenants extérieurs à l'université au sein du master.



J'ai également la responsabilité du recrutement des étudiants de ce master.

Depuis 2020, j'ai également la responsabilité de la 1<sup>ère</sup> année de la licence sciences de la vie présentant 2 parcours : parcours biotechnologies et agroalimentaire et le parcours santé.

Pour ces 2 responsabilités, j'ai la responsabilité de la mise en place des maquettes de formation.

### *b. Président de jury*

Au sein des formations du département, je suis également **président de jury** des examens et des diplômes. Depuis 2018, je suis président du jury du parcours de la licence sciences de la vie de l'UPHF et de la licence SV de l'université catholique de Lille depuis 2019.

Depuis l'année universitaire 2022\_2023, j'ai également la présidence des jurys du master nutrition et sciences des aliments parcours recherche en innovation pour la santé, proposé par la faculté de médecine de l'université catholique de Lille.

### *c. référent du dispositif ASTEP au sein de l'ISTV et INSA*

Au sein de l'ISTV puis maintenant INSA, je suis également **référent pour le dispositif ASTEP** (accompagnement en Sciences et Technologies en Ecole Primaire) qui permet aux professeurs des écoles d'être accompagnés par un scientifique pour concevoir une séquence autour d'un projet scientifique ou technologique et la mettre en œuvre en classe en co-animation. J'ai pour rôle en lien avec l'inspection académique de communiquer sur le dispositif auprès des étudiants, de les accompagner, de les inscrire dans le dispositif, de les affecter en lien avec l'inspecteur dans les écoles demandeuses et de veiller au bon déroulement du dispositif. J'anime les réunions d'informations et j'organise les jurys d'évaluations du dispositif au sein de l'ISTV.

## III. Activités administratives

### 1. Chargé de mission

**Chargé de mission 2010 à 2016 : Responsable du centre universitaire de Cambrai**

De 2010 à 2016, j'ai été **chargé de missions** Responsable du centre universitaire de Cambrai (antenne de l'université polytechnique des Hauts de France (ex-UVHC)). J'avais pour mission de représenter le Président. J'étais l'interlocuteur institutionnel pour toutes affaires relatives à l'antenne universitaire de Cambrai. J'assurais l'interface entre l'antenne d'une part et le Président, le bureau et les services communs de l'Université d'autre part. Je veillais à l'application de la politique définie pour le site et je coordonnais l'action locale des différentes composantes de l'université sur le site, en lien avec les Directeurs respectifs. J'étais habilité à signer les actes nécessaires à l'exercice de mes fonctions et notamment les missions de coordination des services. A travers mes missions de responsable du centre universitaire, j'avais une délégation de signature afin d'engager les dépenses d'un montant inférieur à 4.000€ sur l'ensemble des centres de coûts relatifs au centre de gestion de Cambrai. En tant que responsable du centre, j'avais en charge un budget de fonctionnement de 200.000 euros. J'animais le conseil de gestion du centre universitaire avec la présence des présidents des 2 universités en présence. En effet, le centre universitaire de Cambrai est composé de 2 universités en étroite collaboration. Le centre universitaire de Cambrai accueille 900 à 1000 étudiants inscrits à l'université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis (représentant les 2/3 des étudiants du site) et à l'université de Lille 2 (représentant 1/3 des étudiants). J'avais également en charge la gestion du personnel du centre universitaire comprenant une dizaine d'agents Biatss. J'avais pour mission l'organisation de leur prise de poste et l'évaluation de leurs activités professionnelles.

Au titre de cette mission, j'étais également l'interlocuteur privilégié entre la communauté d'agglomération de Cambrai et l'université. J'avais pour rôle d'entreprendre des projets en vue d'améliorer la vie estudiantine du campus et de répondre aux besoins du territoire en étroite relation avec le président.

Au titre de cette mission, j'ai eu l'opportunité de créer un espace Foyer pour les étudiants en vue de concevoir un espace de convivialité tout en participant à la création d'une fédération étudiante au sein du site afin d'améliorer la vie universitaire sur l'antenne de Cambrai.

## 2. Direction de département

### **Directeur du département de biotechnologies et agroalimentaire de l'ISTV depuis 2007 :**

De 2007 à 2015, j'étais responsable de la filière agroalimentaire de l'ISTV et depuis le changement des statuts de l'ISTV, je suis directeur du département biotechnologies et agroalimentaire. J'ai pour mission l'organisation globale du plan de formation du département, d'accompagner les responsables pédagogiques du département dans leur mission, la gestion du budget de fonctionnement, le recrutement des vacataires extérieurs et le développement de nouvelle formation en fonction des besoins du tissu

économique tout en veillant à l'amélioration continue des formations. J'anime les Conseils de perfectionnement qui définissent l'orientation générale du département de formation dans les domaines pédagogiques et proposent des modifications de l'offre de formation pour tenir compte de l'évolution des besoins des professionnels, en tenant compte des impératifs et des orientations stratégiques de l'Université. J'anime également mensuellement un conseil de département qui met en œuvre les décisions du Conseil de perfectionnement, veille au bon fonctionnement et à l'organisation des formations du département.

J'ai également la responsabilité des activités du personnel biatss du département (un agent ATRF et un agent IgE).

### 3. Activités institutionnelles

Je m'investis également dans diverses instances de l'université ou de centre de formation extérieur comme membre élu dans divers conseils centraux :

- Membre élu au conseil d'administration de l'Université polytechnique des Hauts de France (ex-UVHC) de 2015 à 2020.
- Membre élu au CEVU de l'UVHC de 2007 à 2012
- Membre élu au conseil d'institut de l'ISTV de 2010 à 2019
- Membre élu au comité des formations du personnel de 2008 à 2012.
- Membre suppléant nommé par le président au sein du conseil de l'institut de formation des soins infirmiers de Valenciennes, Maubeuge et Cambrai depuis aout 2018.
- Membre suppléant élu du conseil de discipline de l'IFSI.

## 4. Comité de recrutement et jury de thèse

### **Participation à des comités de recrutement et jury de thèse :**

En 2016, j'ai participé à un comité d'expert pour le recrutement d'un Maître de conférences en 64<sup>ème</sup> section au sein de l'Institut national des Sciences appliqués (INSA) pour le département matériaux dirigé par Monsieur Jérôme Chevalier (PU)

2019, Participation au jury en tant qu'examineur de la soutenance de thèse de Madame Estelle Palierse intitulé « Development of a hybrid coating associating biomimetic hydroxyapatite and natural antibiotics with antibacterial properties » soutenue le 10 octobre 2019 à Sorbonne Université.

En 2020, j'ai participé à un comité d'expert pour le recrutement d'un Maître de conférences en 64<sup>ème</sup> section au sein de l'Institut Charles Violette, UMR transfrontalière INRAe n°1158 BioEcoAgro, TERRA Viollette, pour le département dirigé par le professeur Thierry Gard (PU).

## 5. Contrats de recherche et projets

- ARCir Biocéramiques fonctionnalisés (BIOCerMed) 2012 -2015.
- INTERREG IV : Biomatériaux (PRISTIMED) 2013-2014
- Participation au réseau européen COST NEWGEN sur les biomatériaux 2013-2015.
- ANR Stockage de la chaleur (Stock-Car) : 2019-2023.

## IV. Activités de recherche

Mes activités de recherche sont majoritairement focalisées sur l'étude des propriétés antimicrobiennes des biocéramiques phosphocalciques de type HA (Hydroxyapatite) ou de  $\beta$ -TCP par imprégnation/fonctionnalisation des matériaux à partir de bactériophages et/ou de molécules antimicrobiennes. Cette thématique est assurée au sein du laboratoire CERAMATHS.

Une partie de mes recherches concernent également l'étude des phosho-relais chez *Dickeya dadantii* dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes de régulation de sa virulence. Cette thématique de recherche (que j'avais initiée avec le

Pr Lacroix lors de ma thèse, voir P. 58-59) est issue d'une collaboration conventionnée avec le laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle de Lille UMR8576 CNRS dans le laboratoire du Pr. Jean-Marie Lacroix laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse. Celui-ci m'a demandé de collaborer à son travail pour effectuer certains types d'expérience dont je me suis rendu spécialiste par mon travail sur les relations céramiques/microbes.

## 1. Création du laboratoire de biologie du centre universitaire de Cambrai (annexe du CERAMATHS).

Lors de mon intégration au sein du laboratoire des matériaux céramiques et procédés associés (LMCPA, site universitaire de Maubeuge), les activités biologiques n'étaient pas réalisées au sein du laboratoire mais réalisées par le biais de collaborations avec des laboratoires extérieurs, ce qui engendraient des difficultés pour mener des tests préliminaires rapides afin de concevoir de nouveaux matériaux biologiquement fonctionnels.

En tant que responsable du centre universitaire de Cambrai (lieu de mes activités enseignements), il était nécessaire de soutenir la recherche au sein du centre universitaire de Cambrai car la distance entre les sites de Maubeuge et de Cambrai ne permettait pas d'effectuer des activités biologiques. Les activités biologiques demandent un suivi régulier surtout au niveau des cultures cellulaires et microbiennes (activité menée lors de mon arrivée).

A la suite de ces difficultés pour entreprendre des activités régulières, j'ai entrepris un projet de création d'une annexe du laboratoire en vue d'effectuer directement les manipulations microbiennes sur le même lieu que mes activités en enseignement. Suite à un échange avec la communauté d'agglomération de Cambrai, le soutien sur le projet a très rapidement été accepté et soutenu par les collectivités territoriales de Cambrai. Le projet a donc été soutenu financièrement à hauteur de 50% par la CAC et 50% par l'université pour un total de 120000 euros. Après avoir établi les plans de l'annexe et la partie budgétaire, le laboratoire a pu voir le jour en septembre 2015. Au sein de cette annexe, un laboratoire L1 et L2 ont été créés afin de mener des manipulations en microbiologie avec des germes du groupe 2 de sécurité ainsi que de mener des cultures en cellules eucaryotes humaines notamment ostéoblastiques. Depuis 2016, le laboratoire est pleinement fonctionnel.

Les activités biologiques de fonctionnalisation des biomatériaux du laboratoire ont donc véritablement débuté en 2016.

## 2. Recherches menées au sein du laboratoire CERAMATHS

### *a. Introduction*

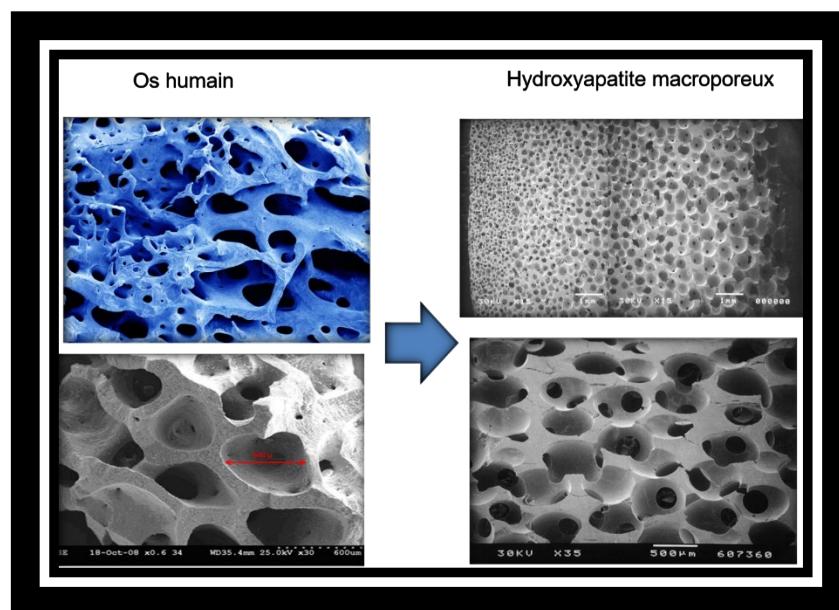
Mes travaux de recherche au sein du laboratoire CERAMATHS concernent la fonctionnalisation des biomatériaux par acquisition de propriétés antimicrobiennes afin

de lutter contre les agents bactériens responsable d'infection en chirurgie ostéo-articulaire sous la forme planctonique mais également sous la forme de biofilm.

En effet, 2 à 5 % des chirurgies impliquant des implants sont suivies d'une infection bactérienne, et dans le cas de fractures ouvertes, ce pourcentage peut atteindre 30 % [1].

#### a.1. Matériaux céramiques à base de phosphate tricalcique et à base d'Hydroxyapatite.

Depuis plusieurs décennies, les céramiques à base de phosphate de calcium (hydroxyapatite (**Figure 1**) et phosphate tricalcique  $\beta$ ) ont été utilisés comme substituts pour remplacer les défauts osseux en chirurgie ostéo-articulaire car leur composition minérale est similaire à celle des os et présentent une très bonne bio-activité puisque ces composés biocompatibles induisent les mêmes réponses biologiques que l'os [2,3]. Ils partagent également avec le tissu osseux des propriétés telles que l'ostéo-conduction et même l'ostéo-induction.[4,5].



**Figure 1** : comparaison des structures minérales d'un os spongieux avec la structure macroporeuse artificielle d'un matériau à bas d'hydroxyapatite

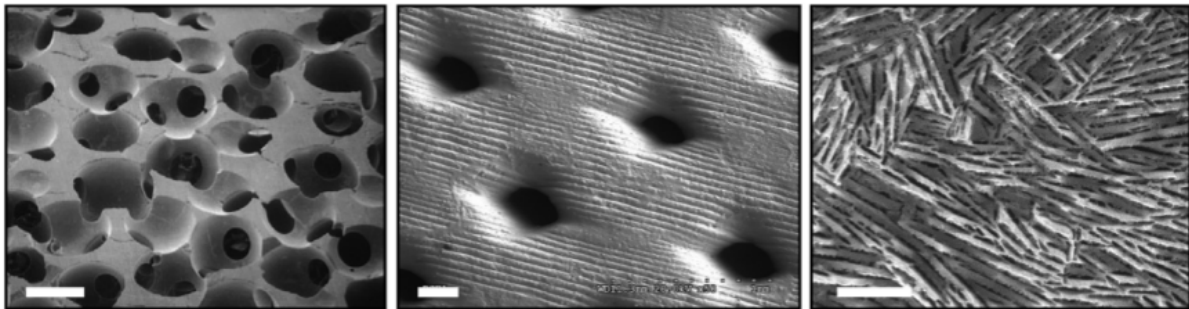
Les propriétés de bio-activité et d'ostéo-conduction sont largement utilisé pour réparer et reconstruire les parties endommagées du squelette humain et surtout comme substituts osseux dans le comblement des défauts osseux [6].

La pureté, la stœchiométrie, la composition chimique de ces biomatériaux et les caractéristiques granulaires des poudres utilisées pour la synthèse sont des

paramètres cruciaux pour obtenir des dispositifs aux propriétés physiques et biologiques optimales. Afin de contrôler ces différents paramètres, la synthèse de poudres d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique  $\beta$  s'effectue par précipitation en milieu aqueux. Ce procédé permet de maîtriser l'ensemble des paramètres de synthèse afin d'obtenir des poudres phosphocalciques stœchiométriques ou biphasiques (HA/TCP). Il est possible d'optimiser la microporosité des matériaux par frittage assisté.

Ces matériaux sont disponibles sous forme de ciments injectables, granulés et en solide dense ou macroporeux. Les granules de phosphate de calcium sont généralement sélectionnés pour le comblement osseux classique [7]. Cependant, les granules présentent des formes irrégulières et ne permettent pas le remplissage optimal de la cavité ou du défaut osseux. Pour surmonter le problème, l'adjonction d'un agent liant tel que la colle de fibrine peut stabiliser les granules dans le site d'implantation et produire un composite qui peut être moulé dans le défaut sans espaces vides [8].

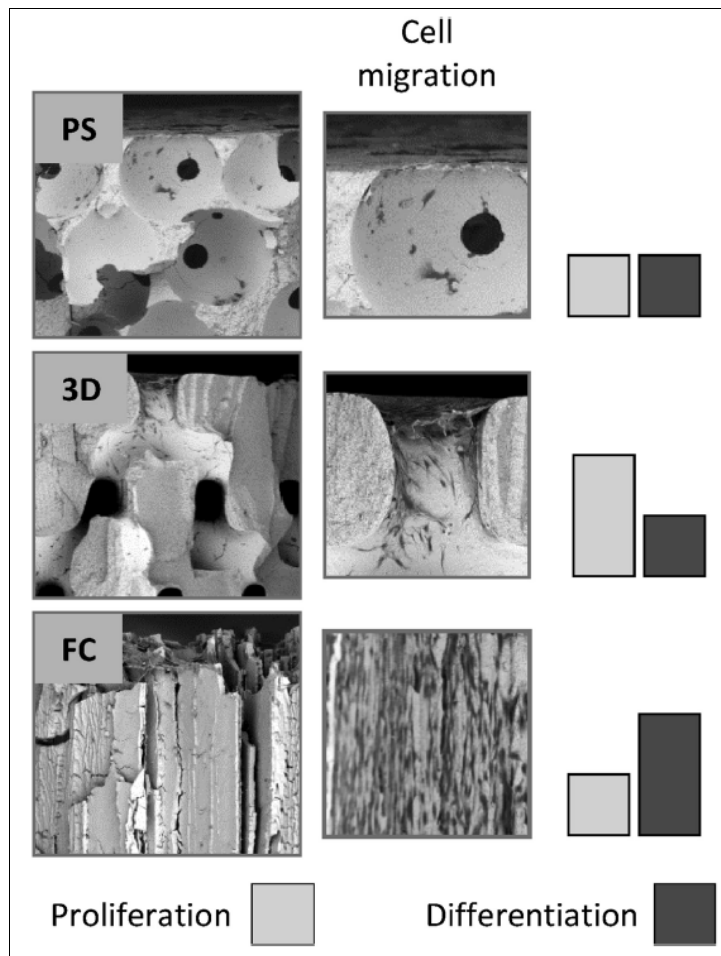
Les paramètres de synthèse sont optimisés au laboratoire afin d'avoir un produit répondant aux normes ISO 13175-3 (2012) et 13779-3 (2008). Trois méthodes de mise en forme sont mis au point pour leur aptitude à générer diverses macroporosités. L'imprégnation d'une structure polymérique de PMMA par une suspension aqueuse de poudre de HA ou  $\beta$ -TCP génère un réseau de pores sphériques (PS), la stéréolithographie génère des pores cubiques interconnectés (3D) et la congélation orientée pouvant produire un réseau de pores tubulaires ellipsoïdaux parallèles au sens de la congélation (Freeze casting FC) (**Figure 2**) [9].



**Figure 2:** Image SEM (de gauche à droite) (PS : pores sphériques, 3D : Stéréolithographie, FC : freeze casting). Barres d'échelle : 0,5 mm

Les propriétés d'ostéo-induction et de différenciation des cellules ostéoblastiques peuvent être améliorées en fonction de la structure géométrique de macropores intégrées dans les biocéramiques (**Figure 3**) [9]





**Figure 3 :** Images SEM des échantillons de  $\beta$ -TCP et prolifération/différenciation cellulaire (PS : pores sphériques, 3D : Stéréolithographie, FC : freeze casting).

De plus, grâce à ces structures microporeuse et macroporeuse, il est donc possible d'imprégner des éléments antimicrobiens à des concentrations différentes en fonction de la microporosité [10] mais également en intégrant des polymères organiques (ex : alginate) [11] à travers les macroporosités afin d'augmenter la rétention des biomolécules ou bactériophages notamment à travers le polymère tridimensionnel intégré.

## a.2. Les Biofilms

Les germes microbiens ont la faculté de produire une communauté multicellulaire lorsqu'ils se fixent sur des surfaces organiques ou inorganiques. Cette communauté est constituée de cellules ayant acquises la faculté d'adhérer entre elles mais également à une surface. Lorsque cette communauté mûrit, elle acquiert également la faculté de sécréter des exopolysaccharides aux propriétés de rétention d'eau et de protection aux forces de cisaillement et divers antibiotiques. Cette communauté prend alors le terme de biofilm.



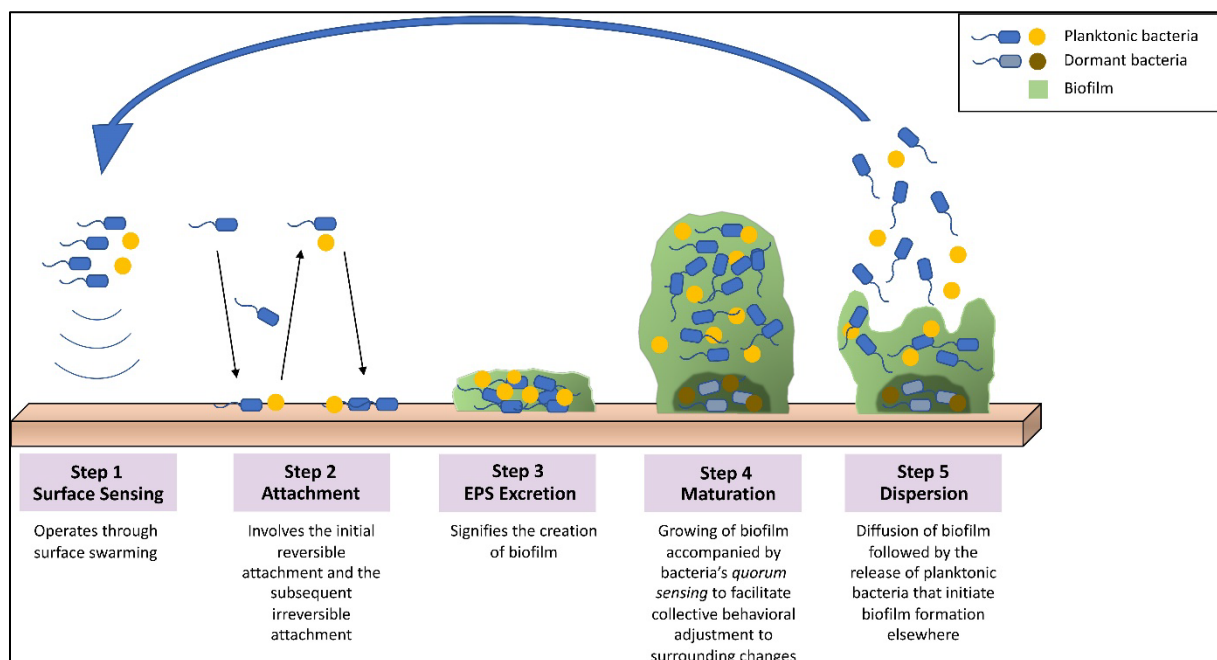
Le biofilm est une étape normale pour les bactéries qui n'ont pas la faculté de se mouvoir en milieu aqueux parce qu'elles ne sont pas dotées de système flagellaire. Elle adhère donc à une surface par décantation ou alors pour les germes motiles, le biofilm se met en place pour lutter le plus souvent contre un stress.

Un biofilm peut avoir différentes structures. Il peut être homogène quand il est composé d'une seule espèce microbienne ou il peut être hétérogène quand plusieurs règnes, familles, genres et espèces microbiennes sont associées (bactéries différentes, levures, moisissures, protozoaires).

Dans ce dernier cas, le biofilm peut être également caractérisé par une hétérogénéité structurelle comme une répartition géographique marquée en termes de populations d'organismes mais aussi au niveau des paramètres physicochimiques : gradients de pH, teneur en oxygène différente, structures diverses des polymères organiques sécrétés.

L'hétérogénéité d'un biofilm permet des synergies bactériennes qui améliorent sa résistance à certains facteurs de stress, dont les antibiotiques [12].

La mise en place d'un biofilm s'effectue en plusieurs étapes : l'adhérence, l'adhésion, la prolifération (colonisation) et la maturation du biofilm par sécrétion intense d'exopolysaccharide (EPS). Lorsque le biofilm mûrit, il peut coloniser d'autres surfaces par dispersion des cellules entraînées par les voies aqueuses ou aériennes (Figure 4) [13].



**Figure 4 :** Vue d'ensemble du processus de formation de biofilm.

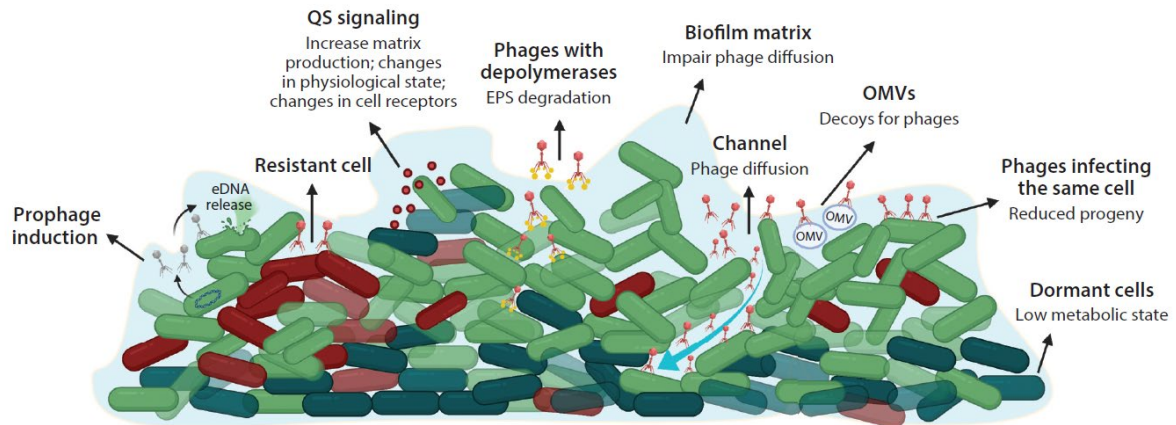
Les Biofilms peuvent acquérir des mécanismes de résistances principalement au cours de sa phase de maturation [14]. Les bactéries regroupées en biofilm peuvent devenir jusqu'à mille fois plus résistantes aux antibiotiques que celles des cellules

bactériennes planctoniques [15]. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer une telle résistance, comme le montre la limitation de la diffusion de l'antibiotique à travers la matrice EPS, la limitation de la diffusion des antibiotiques via l'ADN extracellulaire, l'activation des enzymes dégradant les antibiotiques dans la matrice, le transfert horizontal de gènes et les interactions multi-espèces [16].

Malgré les difficultés de lutte contre le biofilm en chirurgie post-opératoire, il existe des stratégies physiques antimicrobiennes qui se sont révélées partiellement efficaces. Wolcott et ses collaborateurs ont démontré l'utilisation de techniques de débridement pointu (action d'enlever des matières nécrotique, corps étrangers,... d'une plaies infectées) pour éliminer toute la structure du biofilm à son stade précoce de formation [17]. Alors que cette méthode de raclage physique entraînait une diminution de la résistance à la gentamicine dans le biofilm formé sur les plaies fraîches, la reprise de la résistance aux antibiotiques après la fenêtre thérapeutique de 24h ainsi que la limitation à fonctionner uniquement sur les régions infectées exposées, ont montré que cette méthode n'est pas pratique dans la plupart des cas [18].

La structure et la composition du biofilm peuvent également limiter l'efficacité des phages [19]. Il est bien connu que la matrice du biofilm contribue à limiter la diffusion des phages et de leur propagation agissant comme une barrière physique et par conséquent empêchant une infection efficace des bactériophages vis-à-vis des cellules bactériennes [20]., mais d'autres facteurs tels que la faible activité métabolique des cellules du biofilm, la présence de molécules sécrétées peuvent jouer le rôle de leurres phagiques, ou encore la présence de plus d'une espèce microbienne dans le biofilm peut également contribuer à une infection phagique inefficace [21].

Certains phages diffusent à travers les biofilms plus facilement mais les taux de diffusion des phages dans les biofilms sont influencés par plusieurs facteurs : la quantité de biomasse du biofilm, la sensibilité des souches bactériennes aux phages, la concentration en phages et la composition de la matrice de biofilm pouvant contenir des enzymes inactivant les phages ou des composants capables d'ancrer les phages [22]. Par exemple, on sait que les vésicules de la membrane externe (OMV) sécrétées par certaines espèces bactériennes peuvent engendrer le piégeage des phages dans les biofilms. Ces OMV peuvent contenir des récepteurs de phages, comme observé pour les espèces *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* [23], qui peuvent contribuer à une liaison irréversible des phages qui ne seront pas disponibles pour infecter les cellules du biofilm (**Figure 5**) [24].

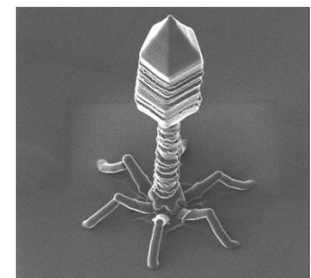


**Figure 5 [24]:** Représentation schématique des facteurs affectant l'interaction phage-biofilm

### a.3. Les bactériophages et la phagothérapie

Les bactériophages (**Figure 6**) sont des virus, découvert par F.W. Twort en 1915 [25], qui ont la particularité de n'infecter que les bactéries selon un mode de reconnaissance spécifique récepteur bactérien/bactériovirus. Ils sont donc incapables d'infecter les cellules animales et végétales.

Les phages peuvent avoir 2 types de cycle, soit le cycle lytique correspondant à une simple réplique de la charge virale allant jusqu'à la lyse et la mort de la bactérie, soit le cycle lysogène correspondant à l'intégration du génome du virus dans le génome de la bactérie. Le phage intégré dans le génome bactérien devient alors inactivé (état de dormance), se réplique et vit avec la bactérie jusqu'à ce qu'un stress vienne réactiver le virus pour enclencher le cycle lytique. Afin d'utiliser les bactériophages comme agent antibactérien à des fins thérapeutiques, il est nécessaire d'utiliser des bactériophages ayant perdu la capacité d'effectuer le cycle lysogène ou ayant un cycle lytique privilégié.



**Figure 6 :** Modélisation d'un bactériophage

Cependant, après la découverte de la pénicilline, l'utilisation des antibiotiques s'est généralisée en raison de leur grande efficacité sur un large spectre et de leur faible coût de production [26].

À ce moment-là, sauf dans certains pays d'Europe de l'Est, la phagothérapie était délaissée alors que l'ère des antibiotiques commençait [27,28]

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne comme les infections nosocomiales à bactéries multi-résistantes (ex : *Clostridium difficile*). Cette pratique a été étudiée pour la première fois par Félix D'Herelle en 1917 [29] lors de ses travaux

sur la dysenterie bacillaire. Il affirma que le phénomène qu'il avait remarqué était provoqué par un agent pathogène pour les bactéries. Il l'appela bactériophage et fit l'hypothèse qu'il s'agissait du phénomène naturel de la guérison [30]. La phagothérapie a une action rapide, quasi immédiate, dès que l'agent étiologique est identifié et que les phages sont administrés et sans effet néfaste sur la flore intestinale. L'utilisation de la phagothérapie est une solution originale pour faire face à l'émergence rapide des résistances aux antibiotiques.

En effet, l'incidence élevée des bactéries multirésistantes (MDR), nous amène à nous approcher de ce qui pourrait être une ère post-antibiotique en médecine [31]. Par conséquent, les propriétés et le potentiel thérapeutique des phages ont été redécouverts [32,33] et sont récemment devenus un domaine d'intérêt actif car ils ont montré de grandes promesses en tant que traitements alternatifs ou en combinaison avec une antibiothérapie [34].

Cependant, le manque d'investissements et de tests dans l'utilisation des phages en tant qu'agents thérapeutiques signifie que de nombreuses questions restent ouvertes concernant leur potentiel en tant que méthode de contrôle microbien et de traitement antimicrobien. Actuellement, la haute spécificité des phages peut être citée comme l'un des avantages les plus importants par rapport aux antibiotiques et, contrairement aux antibiotiques, ils ont une faible toxicité inhérente pour l'homme [35,36]. Récemment, plusieurs études ont même démontré la présence et le rôle protecteur des phages « endogènes » dans les organismes mammifères [37,38] confirmant l'hypothèse d'une action protectrice des phages contre les infections bactériennes non seulement dans l'intestin humain, mais aussi dans la lymphe et le sang. [39].

Normalement, les antibiotiques et, dans certains cas, les phages sont administrés par voie orale [40], intraveineuse ou intrapéritonéale dans le cadre d'un traitement antimicrobien préventif ou thérapeutique chez l'animal et l'homme [41]. La micro-encapsulation des phages a été proposée [42], notamment pour l'administration orale, car lors du passage des phages dans le tractus gastro-intestinal, ils sont exposés à un environnement chimique et biologique complexe qui pourrait affecter leur efficacité thérapeutique [43]. Néanmoins, dans le cas de la greffe osseuse, l'ingénierie des implants pour prévenir l'infection locale est un sujet d'étude actuel [34]. Pour cela, la phagothérapie par fonctionnalisation de substituts osseux est proposée par le laboratoire CERAMATHS.

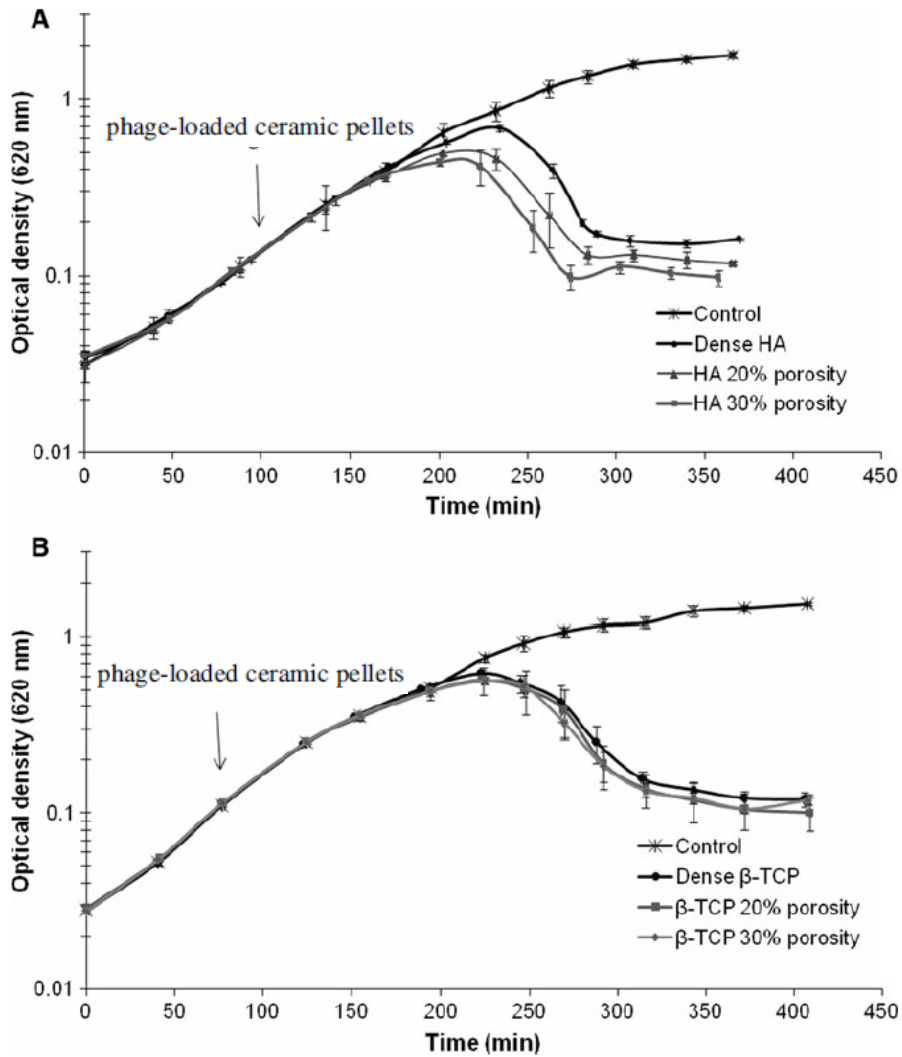
## *b. Biomatériaux et phagothérapie.*

### *b.1. Efficacité des biomatériaux céramiques à base d'hydroxyapatite ou de phosphate tricalcique dopés en bactériophage.*

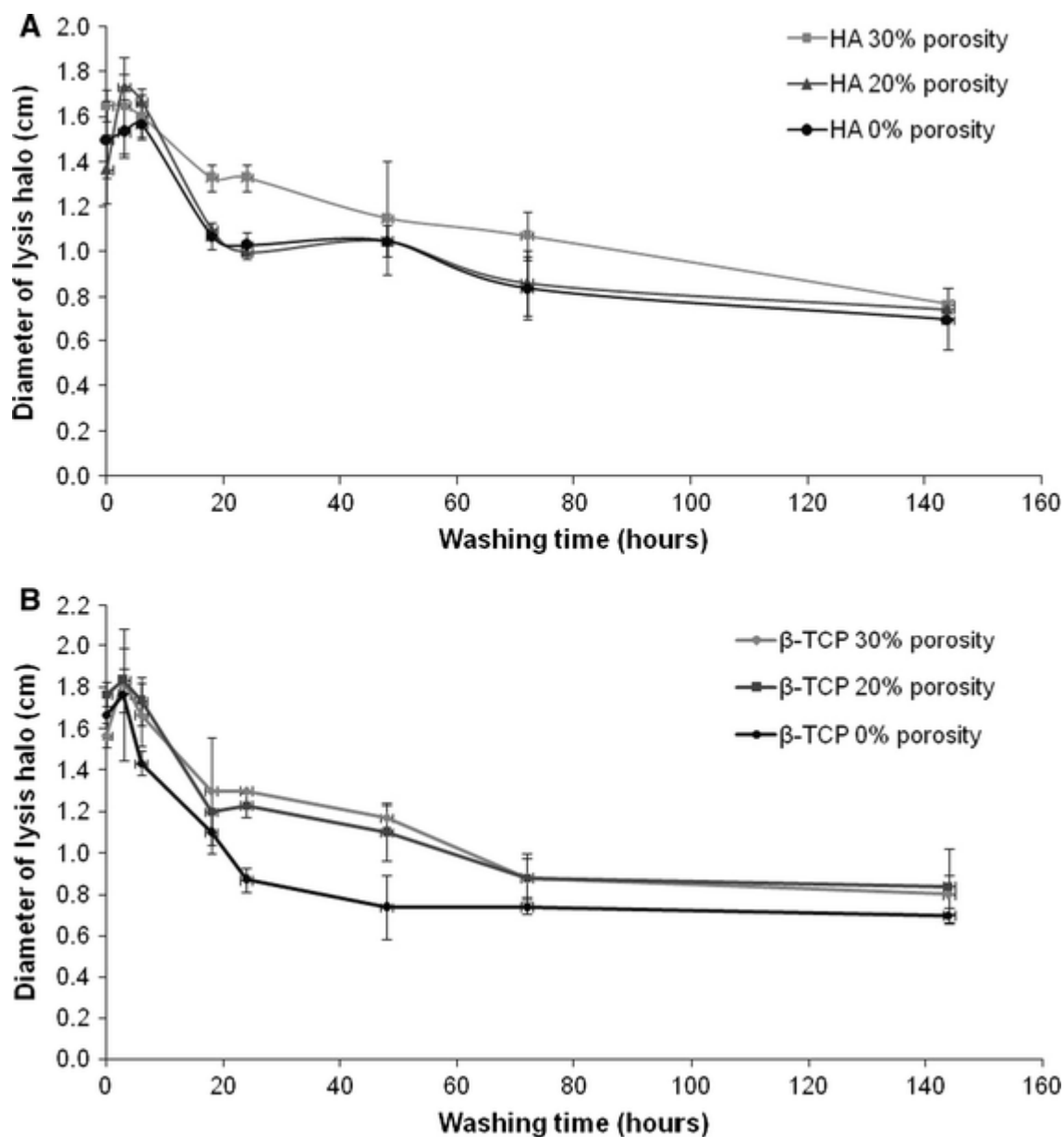
Les premières études, menées au laboratoire sur la phagothérapie, se sont focalisées sur l'utilisation du bactériophage de type Lambda *vir* (non lysogène) spécifique de la bactérie *Escherichia coli*. Ces bactériophages ont été intégrés par imprégnation au contact des matériaux à base d'hydroxyapatite HA ou à base de phosphate tricalcique TCP sous forme de pastilles de différentes densités. L'HA et le  $\beta$ -TCP ont des caractéristiques structurales et des compositions chimiques proches de celles du minéral de l'os qui permettent leur utilisation comme substituts osseux en chirurgie orthopédique et dentaire. En changeant les températures de frittage, nous avons pu réaliser la synthèse de pastilles TCP ou HA contenant dans leur structure différents taux de porosité.

Il a été constaté très rapidement que les bactériophages interagissent très efficacement avec les matériaux. En effet, les matériaux renaient les bactériophages dans leur structure après de multiple rinçage.

Les études effectuées ont permis de démontrer que les matériaux retiennent les bactériophages physiquement par leur structure mais cette rétention est certainement complétée par des interactions ioniques matériaux/capsides virales. En effet, plus de  $2 \cdot 10^4$  à  $1 \cdot 10^8$  bactériophages sont retenus par les pastilles (15 mm de diamètre, 2 mm d'épaisseur) de HA ou TCP en fonction du taux de microporosité engendré par l'application de différentes températures de frittage. Plus le taux de microporosité augmente plus la charge virale augmente. En effet, l'efficacité de lyse bactérienne par les matériaux fonctionnalisés augmente inversement avec la température de frittage employée lors de synthèse des biomatériaux. Les matériaux sont capables de retenir les bactériophages mais nous constatons également un relargage dans le temps. Les bactériophages libérés gardent leurs activités lytiques. Une pastille de 15 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur dopées par les bactériophages est capable de lyser une population de  $3 \cdot 10^9$  bactéries en moins de 3 heures en milieu liquide (**figure 7**). Nous montrons également que les matériaux fonctionnalisés à base hydroxyapatite sont plus efficaces que les matériaux à base de phosphate tricalcique indiquant une affinité plus grande pour les bactériophages pour l'hydroxyapatite. Les pastilles dopées sont bactériolytiques pendant plus de 6 jours (**Figure 8**).



**Figure 7 :** Cinétique de lyse causée par les pastilles d'hydroxyapatite ou de TCP dopées aux bactériophages sur la croissance en milieu liquide de la bactérie *Escherichia coli* K12. La croissance est appréciée par mesure de la densité optique à 620nm.



**Figure 8 :** *Activité lytique des pastilles céramiques chargées de phages  $\lambda$  sur *E. coli* K12 après lavage pendant 6, 18, 24, 48, 72 et 144 h.*

**Les pastilles céramiques chargées en bactériophages peuvent donc être utilisées comme traitement prophylactique.**

**L'utilisation de biomatériaux dopés aux agents viraux bactériens semble être une solution de lutte contre les maladies infectieuses nosocomiales émergentes des hôpitaux, engendrées lors de la mise en place de prothèses ou de substituts osseux en chirurgie ostéo-articulaire.**



Cependant, nous constatons que les pastilles dopées aux bactériophages perdent une grande partie de leur charge virale après les premières heures d'utilisation du dispositif. Il serait donc intéressant d'augmenter la durée de rétention des particules phagiques dans la structure du biomatériau afin de relarguer une charge constante dans le temps. L'utilisation d'un hydrogel pourrait ralentir le relargage. L'alginate semble être le meilleur choix puisqu'il est un agent gélifiant permettant de réaliser des gels à froid évitant ainsi la destruction thermique des phages.

## b.2. Effet de l'alginate sur la désorption des phages à partir de substituts osseux en céramique $\beta$ -TCP.

Les premières études du laboratoire ont donc démontré que l'utilisation de biomatériaux imprégnés de bactériophages peut être une alternative aux traitements prophylactiques antibiotiques. Il est montré que le phage  $\lambda$ vir a une bonne interaction in vitro avec les pastilles de céramique d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate tricalcique bêta ( $\beta$ -TCP). En tant que traitement prophylactique, il est important d'assurer une rétention élevée des phages dans les pastilles de céramique après une greffe osseuse. Cette stratégie permet l'introduction directe des phages sur le site d'implantation. Cependant, dès les premières heures d'utilisation, une grande concentration de phages est libérée des biomatériaux céramiques. Il est donc important d'améliorer le contrôle de leur libération dans le temps pour assurer un contrôle prolongé d'une éventuelle infection locale. A cet effet, une solution est proposée pour enrober les phages dans un hydrogel d'encapsulation.

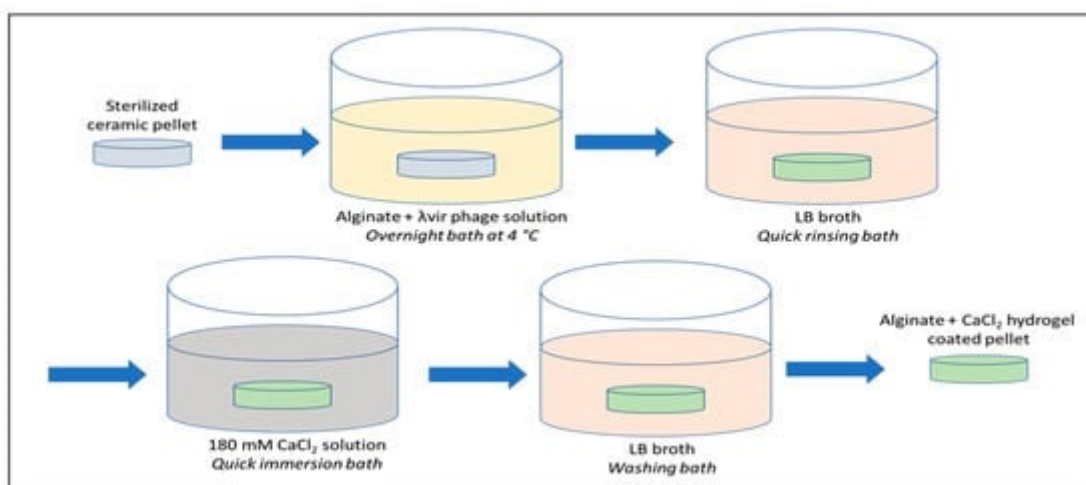
L'alginate est considéré comme un système courant d'encapsulation [44]. L'alginate est un polysaccharide naturel, un copolymère séquencé composé de résidus d'acide  $\alpha$ -L-gulonique et d'acide  $\beta$ -D-mannuronique, liés entre eux de manière linéaire [45]. Il peut être produit à partir de sources d'algues ou de bactéries. Les alginates disponibles dans le commerce sont principalement dérivés de différentes espèces d'algues brunes [44]. Il peut être isolé à partir de *Pseudomonas* ou d'*Azotobacter*, bien que les alginates de bactéries ne soient généralement pas économiquement viables pour des applications commerciales [46]. Lorsque des cations multivalents (par exemple,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Ba}^{2+}$ ) sont ajoutés à une solution aqueuse d'alginate, ils se lient aux chaînes d'alginate adjacentes, formant des ponts ioniques interchaînes qui provoquent une transition sol-gel rapide [47]. Cette capacité a permis à l'alginate d'agir comme agent naturel de micro-encapsulation cellulaire [48]. De plus, Barros et al ont démontré dans une publication récente [49] que les hydrogels formés par l'alginate combiné à la nano-hydroxyapatite améliorent l'activation ostéogénique et pourraient maximiser la régénération du tissu osseux.

Dans ce travail, nous nous proposons d'utiliser l'hydrogel alginate- $\text{CaCl}_2$  comme revêtement sur les céramiques  $\beta$ -TCP chargées de phages  $\lambda$ vir afin



d'améliorer la rétention des phages au sein du matériau et ainsi permettre une libération plus contrôlée (durable) et plus longue des phages

Des solutions d'alginate (Degussa Texturant Systems, France) + λvir phage à 0,5 % et 1,0 % (p/v) de concentration d'alginate ont été préparées en mélangeant la solution mère de λvir-phage avec une solution aqueuse stérilisée d'alginate à 2,0 % (p/v) en utilisant les proportions appropriées. Les culots ont été préalablement stérilisés par immersion dans un bain d'alcool éthylique (70% (v/v)) pendant 45 min puis séchés à l'air. Les pastilles de β-TCP ont ensuite été baignées dans des solutions d'alginate + λvir-phage pendant une nuit à 4 ° C (**Figure 9**).

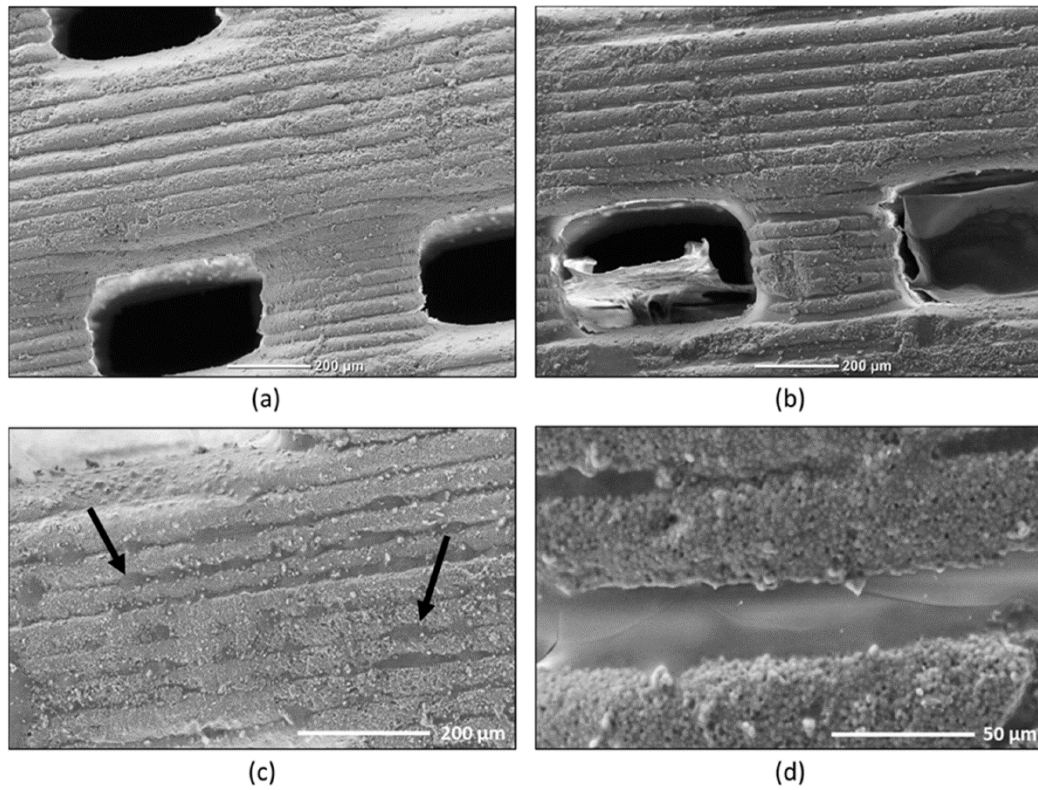


**Figure 9** : Schéma présentant la préparation de pastilles céramiques enrobées par un gel alginate-CaCl<sub>2</sub>.

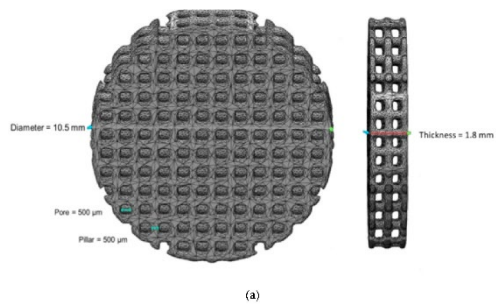
Après un rinçage au milieu LB, les pastilles céramiques ont ensuite été immergées dans une solution de chlorure de calcium 180 mM comme agent de prise du gélifiant à base d'alginate.

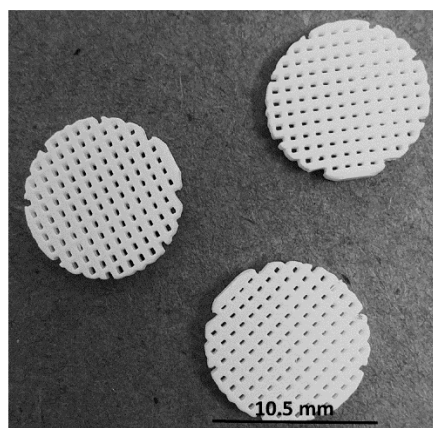
Des analyses SEM ont été menées pour vérifier la structure de surface des pastilles. Les figures 10 a, b présentent une micrographie d'ensemble du contrôle et des pastilles recouvertes d'alginate à 1 % de CaCl<sub>2</sub>. L'absence et la présence d'alginate sont bien représentées dans les deux figures 10 a, b, respectivement, dans les régions où les macropores sont visibles.

On peut noter sur la **figure 10b** l'hydrogel alginate rétracté + CaCl<sub>2</sub>. En fait, cette forme apparaît comme le résultat d'une dessiccation dès la préparation des échantillons à l'éthanol afin de les observer au microscope électronique.



**Figure 10 :** Observations SEM de la surface des pastilles recouvertes d'alginate. (a) Vue d'ensemble micrographie des pastilles de contrôle ; (b –d) micrographies à différentes échelles des pastilles recouvertes d'alginate à 1% de CaCl<sub>2</sub>.





(b)

**Figure 11** : Pastilles  $\beta$ -TCP macroporeux produits par impression 3D. (a) Conception des pastilles et pastilles imprimées 3D (b).

Les micrographies de la figure 10 a à d révèlent la présence de couches disposées en bandes régulièrement espacées sur la surface de la pastille. Indéniablement, le mouvement linéaire de l'imprimante à stéréolithographie (SLA) superpose les couches de suspension TCP pour créer la structure des pastilles.

Les figures 10 b à d montrent les micrographies d'une pastille recouverte d'un hydrogel à 1% d'alginate- $\text{CaCl}_2$ . L'alginate chargé négativement se combine avec le  $\text{Ca}^{+2}$  pour former un complexe insoluble [47]. En effet, la présence de ce complexe à la surface de la pastille est bien représentée, comme le montre la figure 10 c par les flèches noires.

Le nombre de phages chargés sur les pastilles de  $\beta$ -TCP (**figure 11**) a été déterminé par rinçage en milieu LB pendant 3h et plusieurs éluions en tampon phosphate.

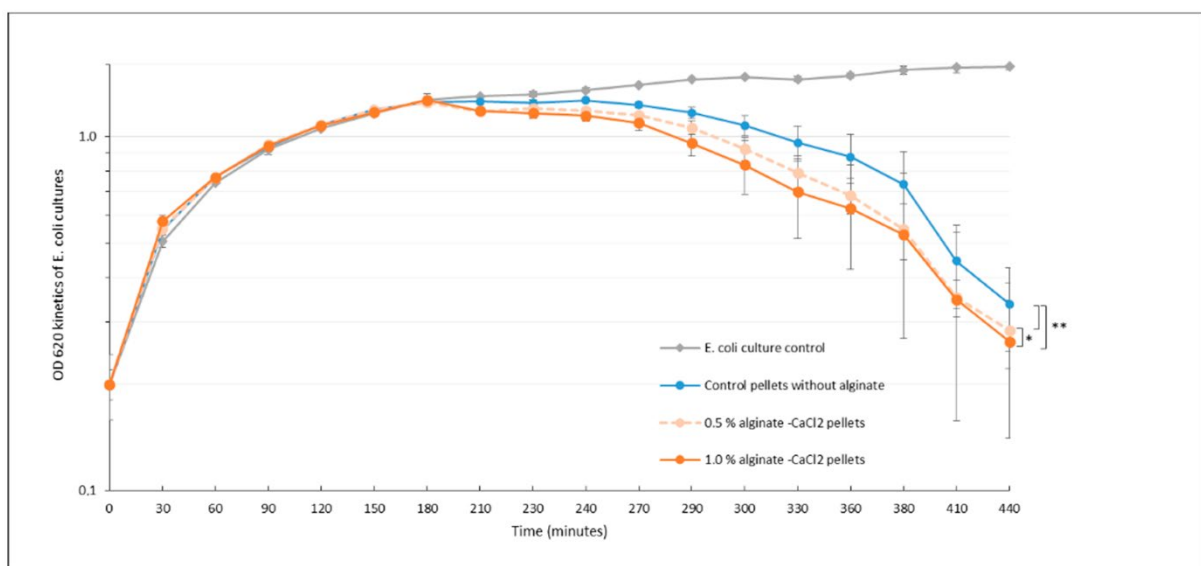
La quantité de phages chargés sur les pastilles (**tableau 1**) était significative en supposant la concentration initiale de phages ( $1 \times 10^{10}$  PFU/mL).

Pellets ( $n = 3 \times 2$ )	Phage Concentration ( $\pm$ standard deviation) (PFU/mL)
Control without alginate	$1.3 \times 10^6$ ( $\pm 0.2\%$ )
Coated with 0.5% alginate	$2.3 \times 10^6$ ( $\pm 0.5\%$ )
Coated with 1.0% alginate	$1.3 \times 10^7$ ( $\pm 0.6\%$ )

**Tableau 1**: Nombre de phage retenu sur les pastilles  $\beta$ -TCP.

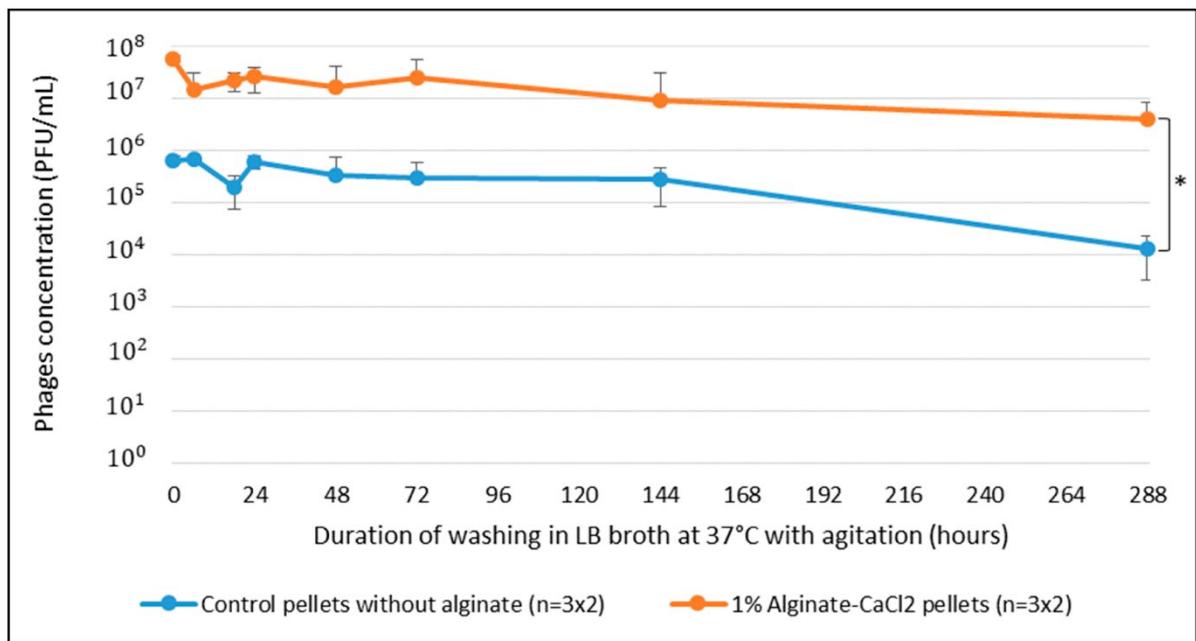
Comme prévu, l'hydrogel alginate-CaCl<sub>2</sub> a montré une influence positive sur la concentration initiale de phages dans les pastilles. En fait, l'hydrogel 1% alginate-CaCl<sub>2</sub> a permis une concentration de phage 1 log plus élevée que sur les pastilles témoins non enrobées.

Différents pourcentages de solutions d'alginate/phage ont été préparés pour évaluer l'effet de la concentration d'alginate sur la rétention des phages dans les culots. Ces pourcentages ont été choisis afin d'obtenir un film d'hydrogels d'alginate tout autour des pastilles de β-TCP sans effets d'encapsulation. Les résultats, illustrés à la **figure 12**, ont démontré qu'à t = 210 min, les pastilles revêtues d'hydrogel d'alginate-CaCl<sub>2</sub> ont commencé à générer une cinétique lytique bactérienne environ une heure avant les pastilles témoins sans alginate.



**Figure 12 :** Cinétique de lyse sur cultures bactériennes en présence de pastilles de β-TCP chargées de phages recouvertes de différentes concentrations d'alginate après 3 h de lavage en LB (37 °C, 170 tr/min) (n = 3 × 2). \*, Groupes de résultats significativement similaires et \*\*, Groupes de résultats significativement différents avec p-value < 0,05. La cinétique grise correspond aux résultats de la culture témoin d'E. coli.

L'impact de la rétention de l'hydrogel alginate-CaCl<sub>2</sub> sur la charge phagique des pastilles de β-TCP après une période de temps dans des conditions in vivo imitées (37°C, flux léger de bouillon nutritif) a été évalué pendant deux semaines. Les résultats sont affichés sur la **figure 13** et démontrent l'action de rétention du revêtement d'hydrogel alginate-CaCl<sub>2</sub> sur la concentration de phages chargés dans les pastilles en fonction du temps de lavage.



**Figure 13 :** Évolution des concentrations de phages dans des pastilles de  $\beta$ -TCP témoins et chargées à 1 % de CaCl<sub>2</sub>-alginate-hydrogel après lavage du bouillon LB à 37 °C, sous agitation à 170 tr/min pendant deux semaines. \*, Groupes de résultats significativement différents avec  $p$ -value < 0.05.

L'efficacité de rétention observée après 6 h de lavage des pastilles de  $\beta$ -TCP chargées de phage recouvertes d'alginate a été confirmée et maintenue pendant deux semaines. La capacité de l'hydrogel à maintenir une activité lytique plus élevée des biomatériaux chargés de phages vis-à-vis des cultures planctoniques bactériennes semble être durable à long terme. Bien que les pastilles de contrôle sans alginate aient montré une différence critique dès le début, l'activité lytique reste pendant 1 semaine de lavage mais a tendance à diminuer de manière plus significative après cette période, comme le montre la **figure 13**.

Ces résultats tendent également à montrer que le niveau d'activité lytique plus élevé des pastilles d'alginate pourrait s'expliquer par l'effet de rétention de l'hydrogel sur les phages.

Les pastilles de  $\beta$ -TCP chargées de phage  $\lambda$ vir avaient déjà démontré une activité lytique sur des cultures liquides d'*Escherichia coli* lors de travaux antérieurs. Cette étude s'est concentrée sur l'évaluation de la désorption de  $\lambda$ vir-phage à partir des pastilles. Les résultats ont montré une diminution de 2 log entre la charge initiale de phages et la charge titrée après 2 semaines pour les pastilles témoins sans hydrogels alginate-CaCl<sub>2</sub>. Cette désorption inhérente pourrait conduire à une diminution de l'efficacité et de la réponse lytique des pastilles de  $\beta$ -TCP chargées de phages  $\lambda$ vir dans le cas de traitements prophylactiques longs.

Ce travail démontre la pertinence de l'utilisation d'un hydrogel comme encapsulation protectrice des pastilles de  $\beta$ -TCP chargées de phages  $\lambda$ vir pour

contrôler la désorption des phages à partir des biocéramiques de phosphate de calcium. En effet, même s'il existe toujours une réduction de la charge initiale en phages, celle-ci est réduite à 1 log après 2 semaines pour les pastilles enrobées 1% alginate-CaCl<sub>2</sub>-hydrogel. La réduction de la désorption des phages chargés sur les biomatériaux pourrait conduire à un allongement de la durée des traitements pré- et postopératoires et donc à une diminution des risques d'infections.

**Ces premiers résultats montrent un impact prometteur de l'alginate en tant qu'hydrogel protecteur autour des biocéramiques chargées de phages. Les pastilles de  $\beta$ -TCP recouvertes d'alginate et chargées de phages  $\lambda$ vir ont non seulement montré une activité lytique plus rapide sur *E. coli* tout au long des deux semaines, mais ont également démontré une meilleure rétention des phages sur les pastilles, limitant ainsi la dispersion des phages dans l'environnement des pastilles.**

De plus, l'utilisation d'alginate n'a pas affecté l'activité lytique du phage et a conduit à une meilleure efficacité lytique de nos biomatériaux dès le départ. L'utilisation de cet hydrogel comme encapsulation de la biocéramique devrait être une perspective intéressante pour prévenir la colonisation bactérienne du matériau et la formation de biofilm sur la prothèse en augmentant la durée d'efficacité du biomatériau. A long terme, la biodégradabilité de l'alginate pourrait également permettre une protection de la prothèse et de son environnement immédiat en libérant progressivement les phages. Si l'encapsulation a déjà été étudiée, l'incorporation de phages dans une matrice biodégradable reste un travail exploratoire à poursuivre. Actuellement, plusieurs études récentes montrent des résultats intéressants avec des hydrogels uniquement comme ciments osseux. Cependant, l'utilisation exclusive d'hydrogels à des fins biomédicales conduit à des limitations technologiques car les milieux et le pH ont une grande influence sur la gélification et la stabilité des hydrogels [50].

**Les hydrogels composites alginate-céramique sont une perspective intéressante en tant que système de relargage [49]. Le revêtement d'hydrogel à base d'alginate sur les biomatériaux céramiques semble être un moyen prometteur de fournir des activités antimicrobiennes à base de phage.**

De plus, l'action des phages chargés à l'intérieur de ces biomatériaux combinés à l'alginate pourrait être renforcée en fournissant différents phages dans un cocktail [51] ou en les combinant en synergie avec des antibiotiques [52] et d'autres molécules antimicrobiennes chimiquement actives [53].



Permettant une activité antimicrobienne locale et immédiate contre les infections bactériennes ou offrant une protection à long terme contre les contaminations potentielles connues et la colonisation des biofilms, les biocéramiques recouvertes d'alginate-CaCl<sub>2</sub> sont des outils innovants et polyvalents qui pourraient conduire à des prothèses thérapeutiques contre les infections articulaires et osseuses postopératoires.

### b.3. Biocéramique imprimée par imprimante 3D pour la phagothérapie contre les infections nosocomiales osseuses.

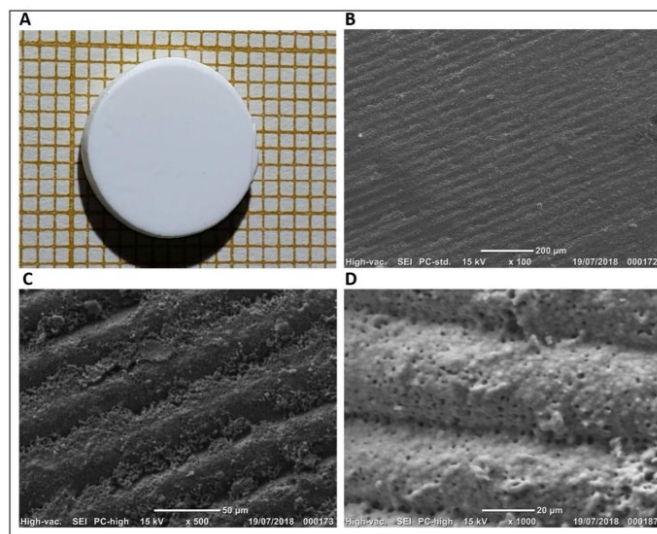
Après une chirurgie ostéo-articulaire, une des complications majeures est l'infection bactérienne. Pour éviter cette infection, une antibiothérapie prophylactique est souvent administrée par voie orale ou intraveineuse avant et après intervention chirurgicale [54]. Ce traitement aux antibiotiques est souvent inefficace en raison de leur diffusion limitée vers le site osseux. De plus, la formation de bactéries les biofilms sont à l'origine d'infections persistantes [55] et peuvent augmenter jusqu'à mille fois résistance bactérienne aux antibiotiques, contribuant à la chronicité des infections associées avec dispositifs médicaux implantés [56].

Depuis quelques années, l'incidence des infections nosocomiales a augmenté en raison de la multiplication des interventions de chirurgie osseuse (vieillesse de la population) et en raison de l'augmentation des souches bactériennes multirésistantes en particulier *Staphylococcus aureus* et dans une moindre mesure *Escherichia coli* [57]. Malgré les nombreuses avancées, le contrôle de l'infection articulaire prothétique reste un enjeu complexe dû à l'émergence considérable de la résistance antibactérienne. En France, les infections nosocomiales ont une prévalence estimée à 5,6% au cours de l'hospitalisation, représentant 750 000 infections nosocomiales, dont 158 000 infections bactériennes résistantes à de nombreux antibiotiques [58]. La phagothérapie pourrait être une alternative aux antibiotiques pour le traitement des infections chroniques et aiguës causées par le MRSA (*Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline) ou le VRSA (*Staphylococcus aureus* résistante à la vancomycine) [59]. De plus, la lyse des bactéries par les bactériophages in vivo n'augmente pas la réponse inflammatoire innée comparée à celle du traitement antibiotique [60]. Cependant, la recherche de nouveaux matériaux pouvant être utilisés comme vecteurs de médicaments, ouvre un nouveau champ pour la gestion de ces infections et viendra probablement en première ligne dans les prochaines années [61]. Aujourd'hui, les études se concentrent sur la production de matériaux à structures tridimensionnelles spécifiques, améliorant les propriétés mécaniques des céramiques et les propriétés de biofonctionnalisation de ces céramiques, qu'elles soient ostéoconductrices ou antibactériennes. Les céramiques à base de phosphate de calcium ont une composition minérale très proche à celui de l'os, ce qui en fait de bons substituts osseux, biocompatibles et résorbables. A travers les travaux précédents, nous avons montré que les céramiques de phosphate de calcium ont une capacité naturelle à 3 retenir et libérer les bactériophages jusqu'à 6 jours. Cette capacité de

rétenion et de la libération cinétique varient en fonction du taux de microporosité céramique [62,63].

Cette étude est basée sur la mise en place d'une céramique à base de phosphate de calcium dispositif synthétisé par stéréolithographie (3D) chargé d'un cocktail de phages permettant la lyse d'une population bactérienne hétérogène de *S. aureus* et *E. coli*. De plus, le dispositif a été vérifié pour son effet protecteur contre la synthèse du biofilm de *S. aureus*, pour son action destructrice sur les biofilms établis et pour la sécurité vis-à-vis des ostéoblastes et de leur colonisation sur les surfaces des biomatériaux céramiques.

Pour cette étude de la poudre  $\beta$ -TCP pure à 98% (présence de 2% d'hydroxyapatite) a été utilisée pour concevoir des pièces céramiques denses par stéréolithographie. L'analyse microscopique au SEM révèle un arrangement de stries parallèles régulièrement espacées (Fig. 14 B et C). Ces stries forment des bosses et des vallées correspondant aux différentes couches d'impression qui ont été réalisées perpendiculairement à la zone observée. La structure microporeuse de 1  $\mu$ m de la céramique observée a été révélée et enregistré au plus fort grossissement ( $\times$  1000) et a montré qu'une température de 1050 ° C ne permet pas une densification totale du  $\beta$ -TCP (Fig. 14 D).



**Figure 14** : A : Photo d'un échantillon de matériau  $\beta$ -TCP. Microscopie électronique à balayage (MEB) de l'état de surface des matériaux  $\beta$ -TCP : les vues ont été obtenues avec un FEG SU5000-Hitachi avec des grossissements (B) X100, (C) X500 et (D)  $\times$ 1000 après revêtement d'or.

Les bactériophages *Remus* et *Lambda* sont des phages caudaux de longueurs 204 nm et 150 nm, surmontés d'une tête de 90 nm et 30 nm de diamètre respectivement [64,65]. Ainsi, les diamètres de pores des céramiques préparées ici peuvent facilement accueillir les deux phages utilisés dans cette étude.



Pour un usage médical, le procédé doit être hautement reproductible ; par conséquent, la quantité et la variabilité du revêtement de phage *Remus* et *Lambda* (50 %/50 %) sur les pastilles de céramique ont été déterminées. Après enrobage sur pastilles TCP, les phages ne peuvent pas être énumérés in situ. Ainsi, les phages ont été désorbés des pastilles par plusieurs lavages à l'aide d'un tampon phosphate 1M et la quantité de phages libérés a été dénombrée classiquement et la quantité des phages *Lambda* ou *Remus* est présenté dans le **tableau 2**.

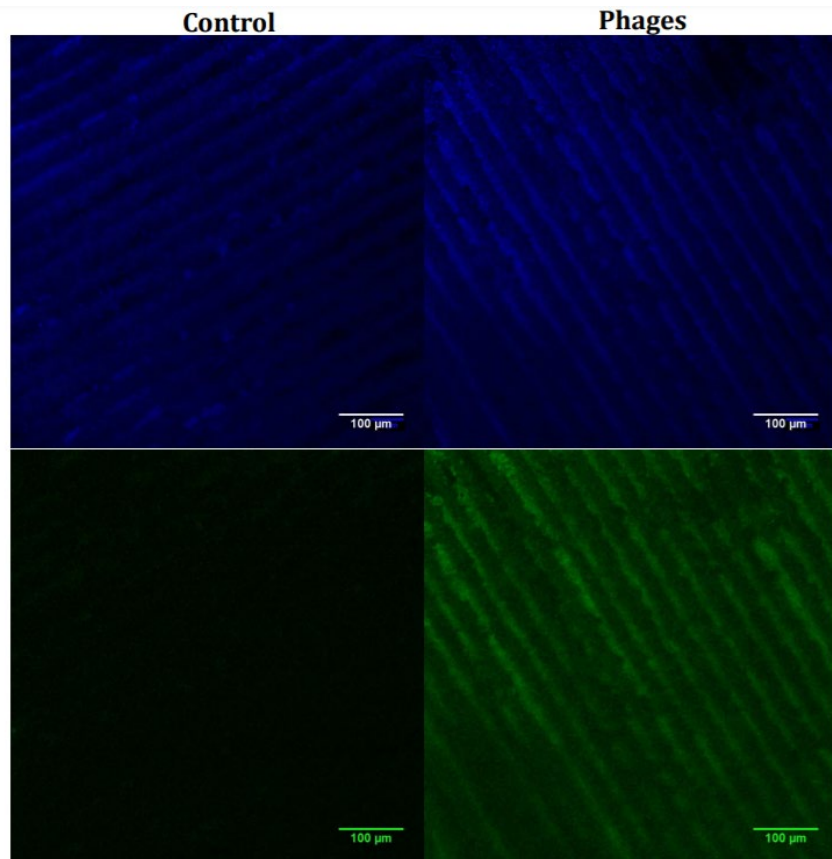
	<b>Pellets (24h incubation with phages at 4°C)</b>
<b>β-TCP (Remus)</b>	6.10 <sup>5</sup> Remus phages/pellet (+/- 0,25%)
<b>β-TCP (Remus 50% + phage 50%)</b>	1,22.10 <sup>4</sup> λ phages/pellet (+/- 1,7%) 1,58.10 <sup>5</sup> Remus phages/pellet (+/- 0,49%)

**Tableau 2** : Nombre de phages retenus sur les céramiques β-TCP.

La co-imprégnation des deux phages est remarquablement reproductible, avec 1,2 10<sup>4</sup> +/- 2,0 10<sup>2</sup> phages/pastille pour le phage *Lambda* et 1,6 10<sup>5</sup> +/- 7,7 10<sup>2</sup> phages/pastille pour le phage *Remus* conduisant à 93 % de phage *Remus* et 7 % de Phage *lambda*, indiquant des différences dans les capacités d'adsorption ou de rétention entre les phages.

La quantité de phage *Remus* seul retenue par la pastille céramique était plus élevée que lorsqu'il était co-imprégné (6,0 10<sup>5</sup> ± 1,0 10<sup>3</sup>) mais était proche des résultats observés avec le phage *Lambda* seul. Cela suggère que les propriétés d'interaction sur le matériel TCP affichent des différences entre les phages.

Pour évaluer la présence des bactériophages à la surface de la céramique, une suspension de bactériophage *Remus* (10<sup>10</sup> phages/mL) marquée avec le fluorochrome Alexa Fluor™488 a été déposée sur des pastilles de céramique, montées sur des lames de verre et analysées par microscopie confocale. L'analyse des images CSLM (**Figure 15**) ne montre aucune différence sur le profil de surface analysé en réflexion par diode laser 405nm pour les pastilles de céramique recouvertes de phages par rapport au milieu de contrôle.



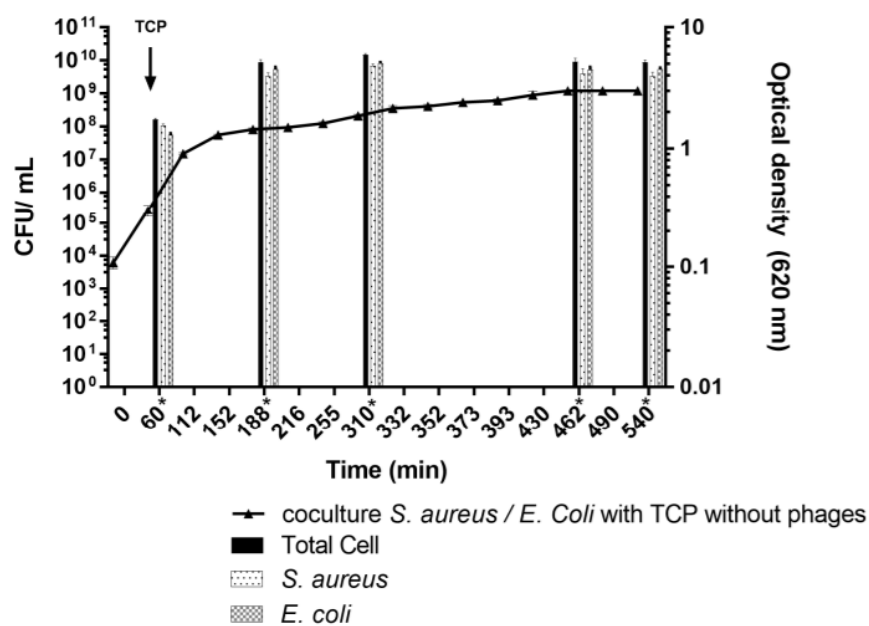
**Figure 15 :** Analyse par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) d'une surface céramique recouverte de bactériophages *Remus*. Images du haut, réflexion par diode laser 405 nm de la surface de la céramique recouvert (à droite) ou non (à gauche) de bactériophages non marqués. Images du bas, excitation par diode laser à 488 nm de la surface de la pastille céramique recouvert de bactériophages marqués Alexa Fluor™ 488 (à droite) ou de milieu marqué Alexa Fluor™ 488 (à gauche)

La surface de la céramique présente des sillons réguliers dus à l'impression 3D sans défaut particulier observable. L'excitation de fluorescence verte spécifique Alexa Fluor™ 488 affiche une fluorescence couvrant toute la surface (**Figure 15**) alors qu'aucune fluorescence ne peut être observée lorsque la céramique était recouverte par le milieu marqué seul. La petite taille du phage *Remus* le rend indétectable par CSLM. Par conséquent, parce que toute la surface est recouverte de fluorescence, cela indique simplement que la surface est recouverte de façon homogène par les phages. Cette observation valide la procédure d'imprégnation de phage sur la céramique.

Il est bien connu que les co-cultures de plusieurs espèces bactériennes peuvent avoir un effet néfaste (ex. sécrétion de toxines) d'une ou plusieurs espèces bactériennes sur la croissance et /ou la survie d'un autre. Cela pourrait conduire à une mauvaise interprétation des résultats lorsqu'un effet bactéricide est attendu. Parce que

les souches de *S. aureus* et *E. coli* doivent être cultivées ensemble et avec des échantillons céramiques, nous avons testé leur effet potentiel sur la croissance. Les souches de *S. aureus* et *E. coli* ont été cultivées après co-inoculation à une densité cellulaire similaire ( $1.10^7$  cellule/mL) avec ou sans pastilles de céramique. En phase exponentielle et jusqu'à la fin de la phase de croissance stationnaire, la densité de cellules viables a été mesurée.

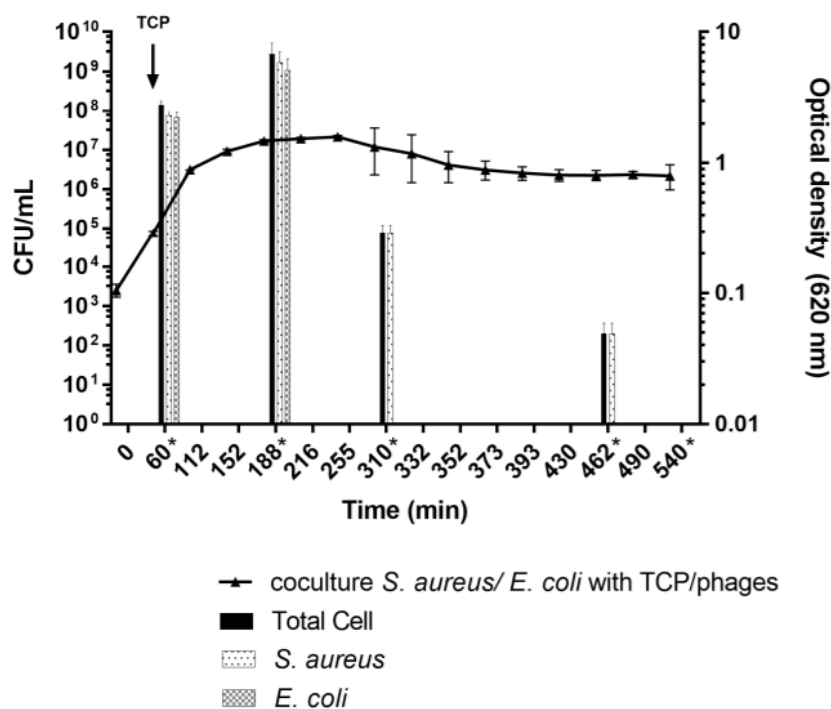
Un temps de génération similaire (30 min.  $\pm$  2 min.) a été observé. Le même temps de génération et une densité bactérienne deux fois plus élevée ont été observés lorsque les deux souches étaient cultivées seules, mais la viabilité est restée la même, indiquant qu'aucune perte de viabilité n'a été observée en co-culture pour les deux souches (**Figure 16**). Le double du rendement était attendu, puisque la disponibilité des nutriments est partagée avec l'autre souche dans des conditions de co-culture. Les mêmes résultats ont été observés lors de l'ajout de pastilles céramiques. Ces résultats indiquent qu'aucune synergie ni antagonisme n'a été observé entre les deux souches, avec ou sans matériel TCP ajouté.



**Figure 16** : Co-culture de souches de *S. aureus* et *E. coli*. Les deux souches bactériennes ont été co-inoculé dans du milieu LB avec des pastilles TCP et incubé à 37 °C avec agitation. Les astérisques représentent l'instant du dénombrement.

Pour tester l'efficacité lytique des deux phages contre le mélange des deux espèces bactériennes, des pastilles de céramique recouvertes de phages *Lambda* et *Remus* ont été testées (**Figure 17**). Les pastilles chargées ont été introduites au sein d'une co-culture en croissance exponentielle (après deux générations). Après divers temps d'incubation, *E. coli* et *S. aureus* ont été dénombrés (**Figure 17**). Après 188 min, aucune perte de viabilité bactérienne n'a pu être observée alors que les bactéries

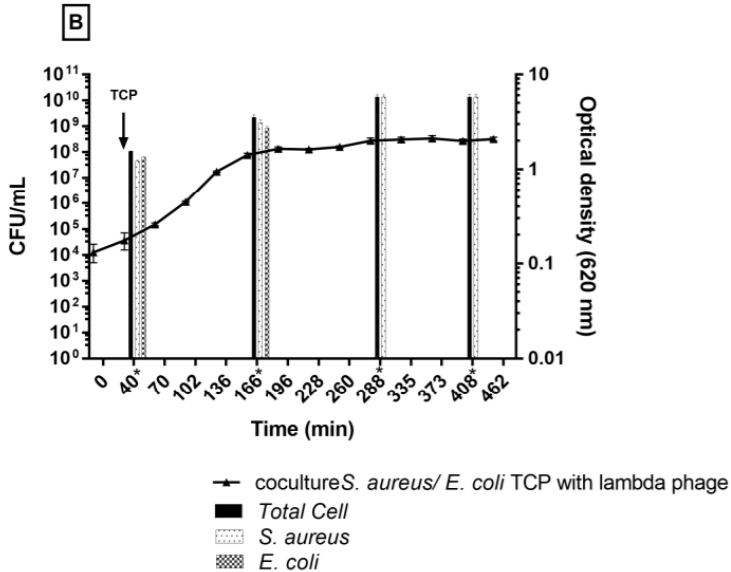
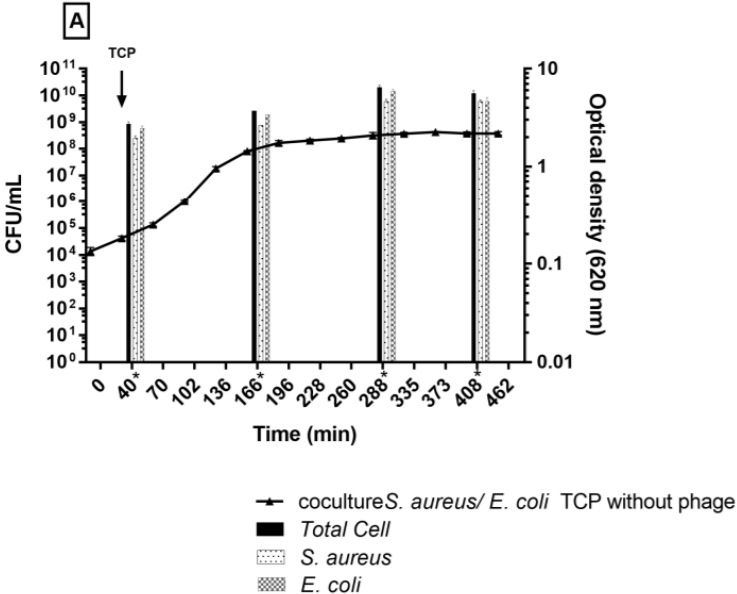
continuaient à se développer. Après 310 min d'incubation, les cellules d'*E. coli* ont été complètement lysées tandis que la viabilité des cellules de *S. aureus* a fortement diminué. Après 540 min, les cellules de *S. aureus* ont été complètement lysées. Le cocktail de phages chargé sur le dispositif TCP a permis une lyse rapide et efficace des deux populations de genres bactériens.

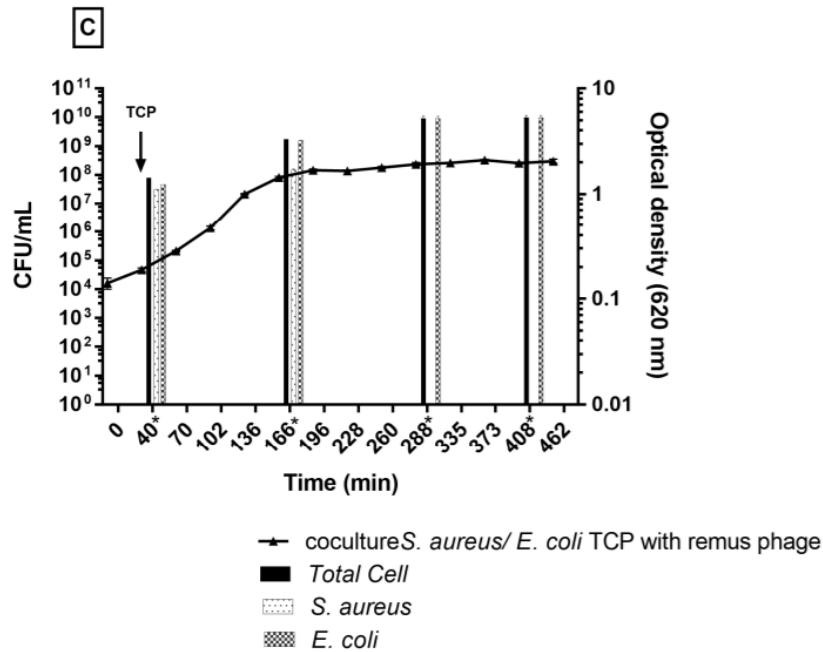


**Figure 17 :** Effet des pastilles TCP chargées d'un cocktail de phages Remus/Lambda sur la croissance de *S. aureus* et *E. coli* co-cultivés. Les astérisques représentent l'instant des dénombrements.

Aucune croissance bactérienne n'a été observée après trois jours, suggérant fortement que toutes les bactéries ont été tuées et qu'aucune résistance aux phages ne s'est produite. Pour vérifier la spécificité des espèces de phages chargées sur le dispositif TCP par rapport à la double population bactérienne (**Figure 18**), des cocultures bactériennes ont été testées sur des pastilles de céramique TCP chargées uniquement par le phage *Lambda* ou par le phage *Remus* (**Figures 18B et C respectivement**). Les résultats indiquent que le phage *Remus* chargé sur la céramique TCP n'a lysé que la souche *S. aureus* sans lyse de la souche *E. coli*. A l'inverse, le phage *Lambda* chargé sur céramique TCP est spécifique de la souche *E. coli*. Ainsi, la lyse d'espèces bactériennes spécifiques dans une population bactérienne hétérogène n'est associée qu'à la présence du phage spécifique du cocktail chargé sur les pastilles. Pris ensemble, ces résultats indiquent que malgré la forte différence de revêtement des deux phages sur les pastilles (10 fois plus de *Remus* que de phages

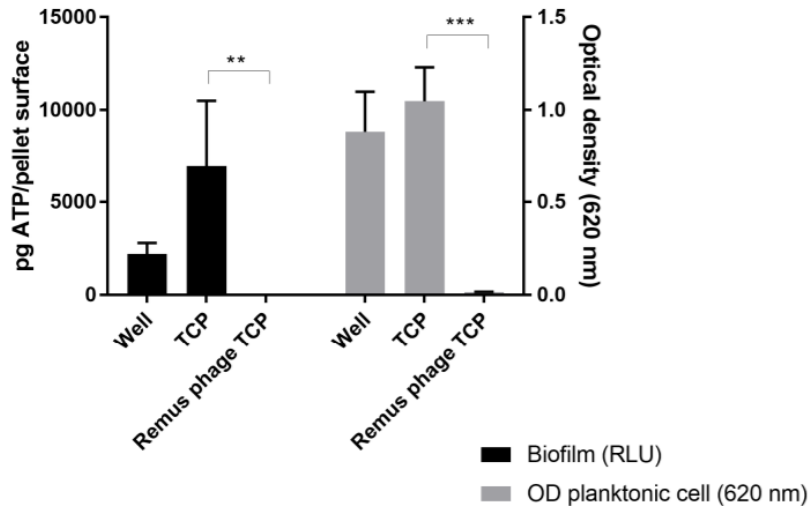
*Lambda* chargés, voir ci-dessus), les deux souches bactériennes ont été éliminées du milieu de culture.





**Figure 18** : Effet des pastilles TCP chargées de phages Remus ou Lambda sur la croissance de *S. aureus* et *E. coli* co-cultivés. Les deux souches bactériennes ont été co-inoculées en LB milieu avec des pastilles TCP non chargées (A), chargées avec (B) le phage Lambda ou (C) le phage Remus et incubées à 37 ° C sous agitation. Les astérisques représentent l'instant des dénombrements.

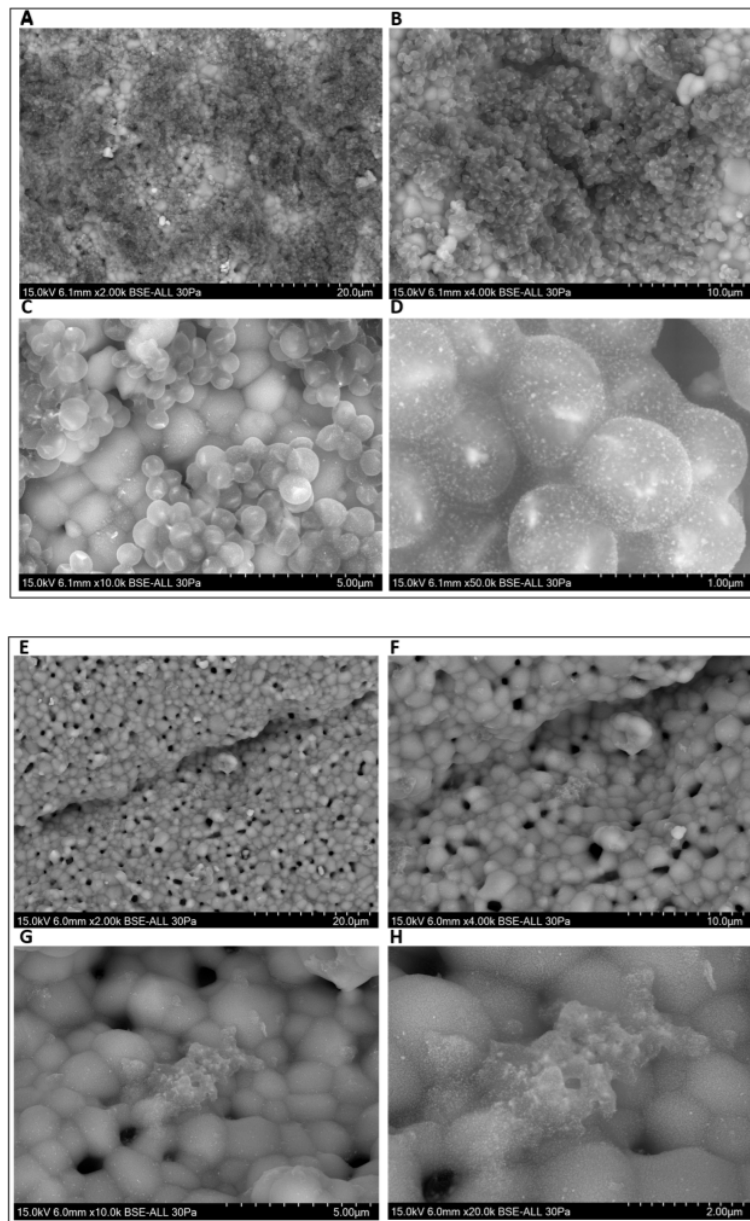
Il est bien connu que le biofilm est un mode de vie bactérien donnant lieu à une résistance aux agents chimiques délétères dont les antibiotiques en raison de son organisation structurale. Nous avons décidé de tester l'effet lytique du phage *Remus* chargé sur céramique TCP sur l'initiation d'un biofilm mais aussi sur des biofilms matures de *S. aureus* formés sur des puits en polystyrène de plaques de microtitration. *S. aureus* a été cultivé sur des plaques de microtitration à 24 puits à 37 ° C et les pastilles TCP avec ou sans phages *Remus* ont été ajoutées à des puits ne contenant pas de biofilm ou à des puits contenant un biofilm de 24 h (biofilm mature) de *S. aureus*. L'analyse des biofilms a été réalisée par ATPmétrie. Avant la formation du biofilm (**Figure 19**), on constate que la surface du substitut osseux TCP est un aussi bon support que le polystyrène pour la formation du biofilm en l'absence de phages. La densité optique des cellules planctoniques est presque identique dans le milieu avec la céramique TCP que sans, confirmant que le matériau TCP n'a aucun effet sur la croissance bactérienne.



**Figure 19** : Formation de biofilm à partir de *S. aureus* en présence de matériaux TCP chargés ou non de phages Remus. Les pré-cultures bactériennes ont été diluées (1:100) dans du milieu LB et ensemencé dans les puits (Well) sans TCP, avec TCP (TCP) ou avec des pastilles TCP chargées de phages Remus (Remus phage TCP). Après 24h de croissance à 37 ° C, les cellules bactériennes planctoniques ont été mesurées par O.D.620nm et la formation de biofilm a été mesurée par ATPmétrie. \*\* indiquer  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  entre pg ATP/surface ou densité optique (620 nm) obtenus pour des expériences par rapport à TCP ou TCP chargé Remus phage.

Lorsque des céramiques TCP chargées de phage *Remus* ont été ajoutées aux puits, aucune molécule ATP n'a pu être détecté après 24 h d'incubation, indiquant qu'aucun biofilm ne pouvait être construit par *S. aureus* dans ces conditions, quelle que soit la surface (**Figure 19**). Ce résultat a été confirmé par microscopie électronique à balayage (**Figure 20**).



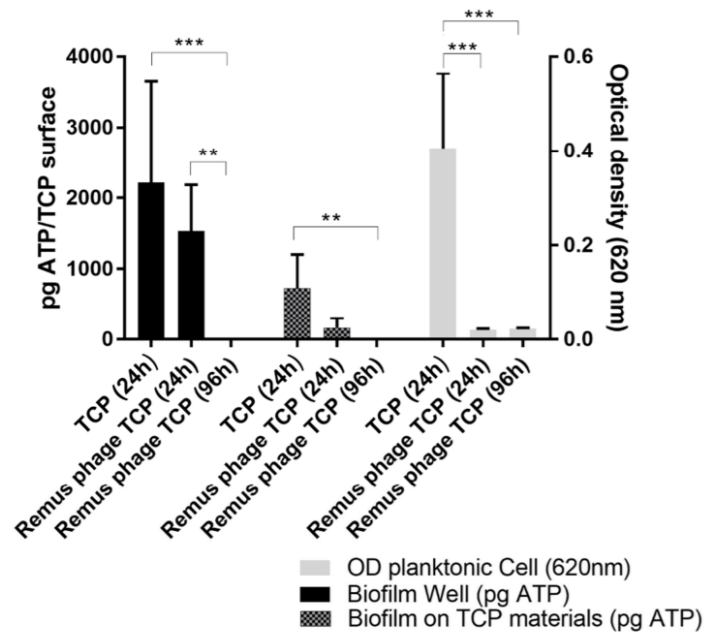


**Figure 20 :** Microscopie électronique à balayage (MEB) de l'état de surface des matériaux  $\beta$ -TCP après la formation d'un biofilm de 24 h : les images ont été obtenues avec un FEG SU5000-Hitachi avec des grossissements (A,E)  $\times 2000$ , (B,F)  $\times 4000$ , (C,G)  $\times 10000$ , (D)  $\times 50000$  et (H)  $\times 20000$  après revêtement d'or. Biofilm à *S. aureus* PS47 24 h sur TCP matériel sans phages chargés (A, B, C, D). Biofilm à *S. aureus* PS47 de 24 h sur du matériel TCP avec des phages chargés (E, F, G, H).

Après la formation du biofilm (**Figure 21**) lorsque des céramiques TCP chargées de phage *Remus* ont été ajoutées aux puits, un tiers du biofilm présent à la surface des puits a été éliminé par rapport au témoin (TCP sans phages) alors que dans le même temps toutes les cellules planctoniques ont été éliminées. Une colonisation significative par le biofilm a été observée sur la surface du témoin céramique TCP (TCP sans phage) tandis que les surfaces des céramiques TCP



chargées avec le phage *Remus* étaient également peu colonisées (25 % du témoin) par le biofilm. Ces résultats ont également été rapportés par Vandersteegen et al. [64]. Afin de suivre le devenir du biofilm en présence de phages, la mesure de l'ATP a également été effectuée après une période d'incubation prolongée (96 h). Comme après 24 h, toutes les bactéries planctoniques ont été éliminées. De plus, il n'y avait plus de biofilm ni sur les puits ni sur les surfaces de la céramique TCP (**Figure 21**), ce qui indique que même un biofilm mature peut être détruit par des phages chargés sur du TCP céramique.



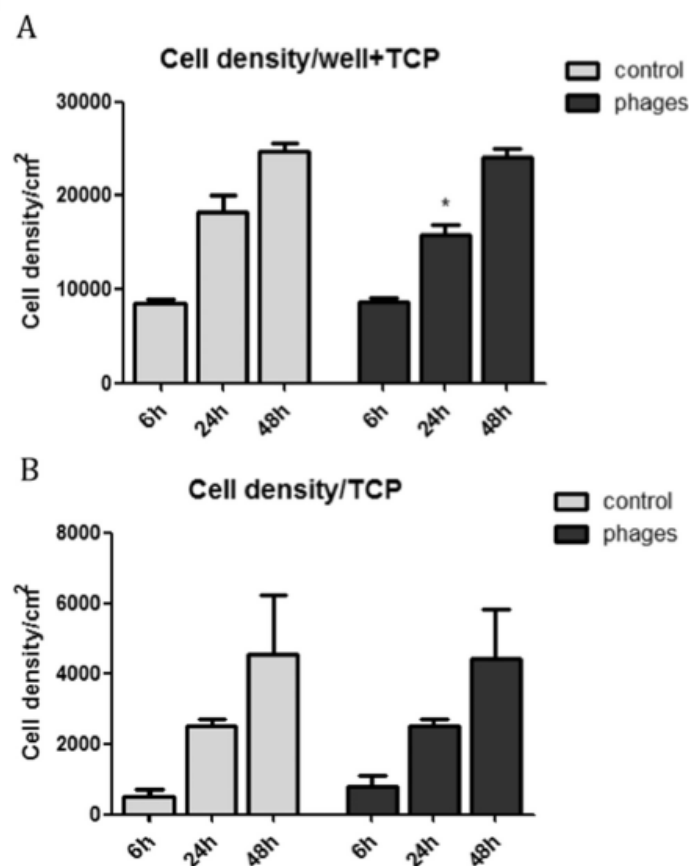
**Figure 21** : Evolution d'un biofilm de 24h à *S. aureus* en présence de matériaux TCP chargés ou non de phages *Remus*. Les pré-cultures bactériennes ont été diluées (1:100) dans du milieu LB et ensemencé dans les puits d'une plaque de microtitration pendant 24 h à 37 °C permettant la formation de biofilm. Les pastilles TCP chargées de phages *Remus* (*Remus phage TCP*) ou non (*TCP*) ont été ajoutés aux puits. Après 24 h et 96 h d'incubation supplémentaire à 37 °C, les cellules bactériennes planctoniques ont été mesurées par O.D.620nm et la formation de biofilm a été mesurée par ATPmétrie. \*\* indique  $p < 0,01$ , \*\*\* indique  $p < 0,001$  entre pg ATP/surface ou densité optique (620 nm) obtenue pour les expériences par rapport au TCP chargé de phage *Remus* ou TCP sans phage (24 h ou 96 h d'incubation).

L'objectif final de cette étude était d'évaluer l'efficacité de protection des phages chargés sur du matériel TCP contre les bactéries pathogènes en présence de cellules humaines. Ainsi, un pré-requis était de tester l'absence de toxicité phagique vis-à-vis des cellules humaines ostéoblastiques. La croissance des cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1 a été évaluée par comparaison de la prolifération cellulaire dans les 2 jours d'incubation à 37 °C dans une atmosphère de CO<sub>2</sub> (5%), dans du DMEM avec 10%

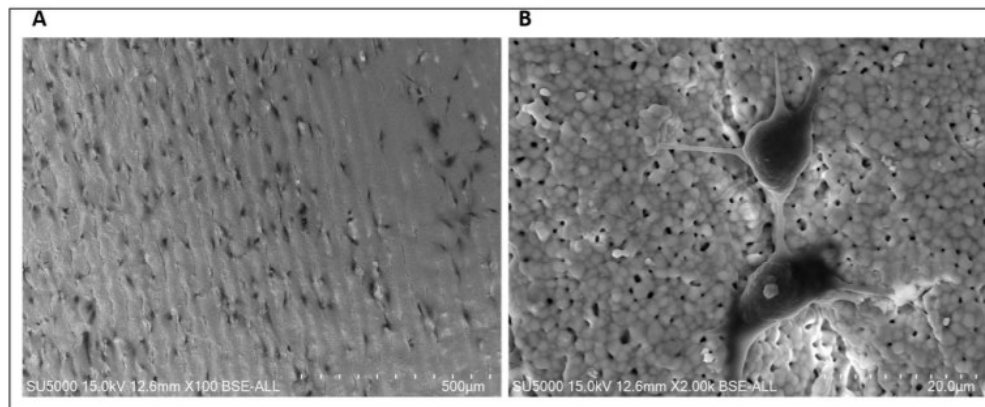
de FCS, dans des plaques à 12 puits contenant une pastille de céramique chargée de phages ou non chargée comme contrôle.

Après 6 h, 24 h et 48 h d'incubation, les cellules ont été détachées des pastilles céramiques et des puits. Les densités cellulaires ont été obtenues par comptage direct des cellules eucaryotes. Pour les surfaces totales colonisées par les ostéoblastes, après 6 h de colonisation, la densité cellulaire pour le contrôle et les puits contenant des pastilles de céramique recouverts de phages était similaire. Pendant la période d'incubation, la densité cellulaire a augmenté dans la même mesure, à la fois pour les puits témoins et pour les puits contenant des pastilles de céramique chargées de phages (**Figure 22A**). La densité cellulaire était à peine différente entre les témoins et les puits contenant la céramique chargée de phages à 24 h et est restée similaire après 48 h (**Figure 22A**).

Pour la surface des pastilles céramiques colonisées par les ostéoblastes après 6 h de colonisation, la croissance cellulaire était légèrement supérieure pour les céramiques chargées de phages par rapport aux céramiques témoins (**Figure 22B**). La croissance cellulaire sur céramique n'a pas été plus affectée par la présence de phages, ni à 24 h ni à 48 h (**Figures 22B, 23**). Pris ensemble, ces résultats démontrent que la survie et la prolifération des cellules ostéoblastes sont restées inchangées en présence de céramiques ou de céramiques chargées de phage *Remus*.



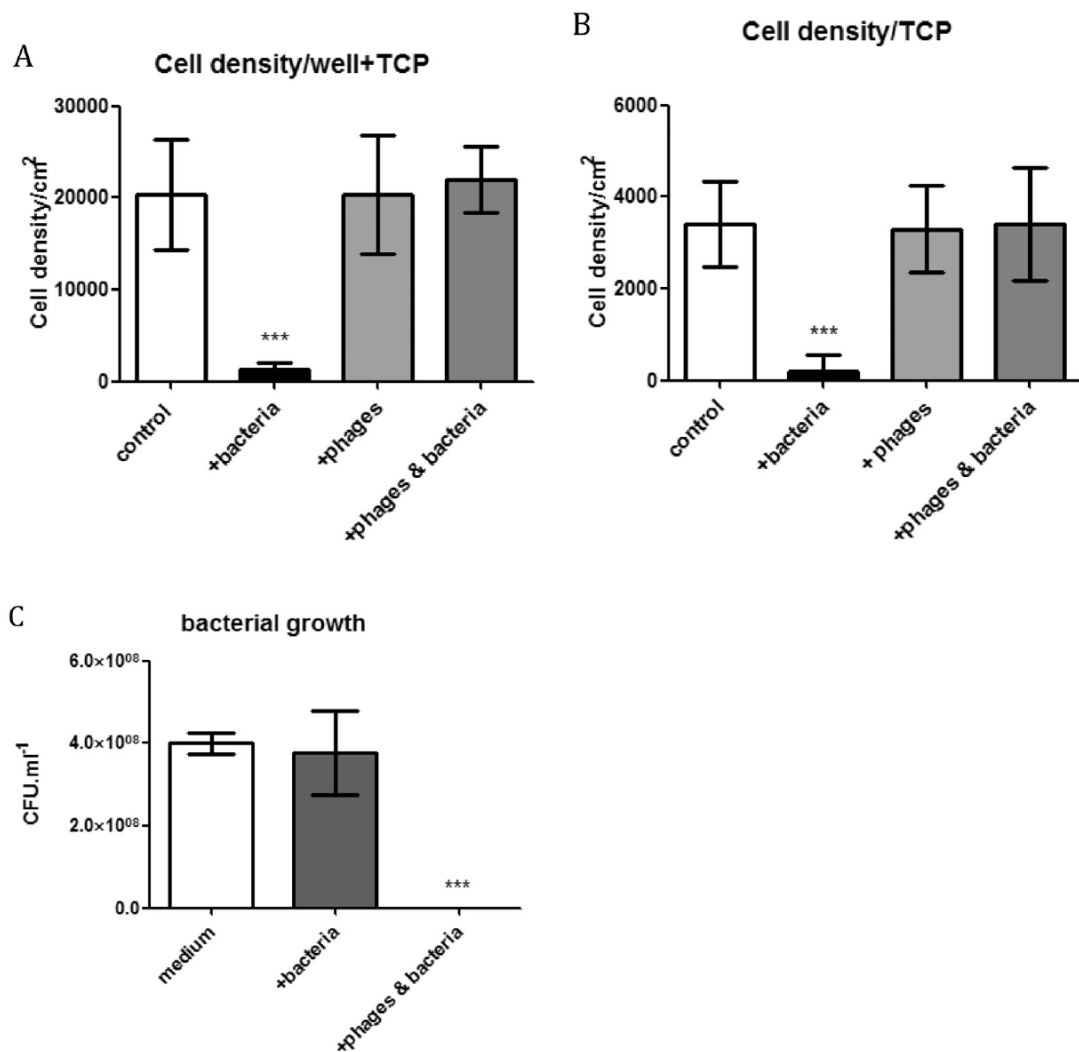
**Figure 22 :** Prolifération des ostéoblastes MC3T3-E1 cultivés sur des matériaux TCP. Les ostéoblastes ont été incubés dans du DMEM additionné de 10 % de sérum bovin fœtal à 37°C dans des plaques à 12 puits contenant des pastilles TCP avec ou sans phage Remus chargé. La densité des cellules eucaryotes a été mesurée après 6 h, 24 h et 48 h de croissance. (A) Densité de cellules eucaryotes par cm<sup>2</sup> du fond des puits + pastilles de TCP avec (phage) ou sans (contrôle) phages chargés. (B) Comme dans (A) mais la mesure a été effectuée sur les cellules cultivées uniquement sur la surface des pastilles. \* indiquent  $p < 0,05$  entre la densité cellulaire.cm<sup>-2</sup> obtenue sans phages.



**Figure 23 :** Images MEB de la surface d'une pastille de TCP après culture de cellules ostéoblastiques : Temps de culture : 48 h. Barres d'échelle : (Surface) A : ×100, B : ×2000.

Comme l'imprégnation de la céramique par des phages *Remus* est parfaitement sûre pour les cellules ostéoblastes, il était intéressant d'évaluer s'il pouvait fournir une bonne protection des ostéoblastes contre une infection à *S. aureus in vitro*. Les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 ont été cultivés pendant 24 h avant l'infection par 10<sup>6</sup> UFC/mL de *S. aureus* suivis d'une incubation supplémentaire de 14 h. La densité des cellules ostéoblastiques de toutes les surfaces colonisées (puits plus céramique) et du culot de céramique ont été quantifiées ainsi que la concentration bactérienne dans le milieu (**Figure 24A, B, C**). Après 14 h d'infection à *S. aureus*, la densité de cellules eucaryotes colonisant toutes les surfaces était équivalente pour les puits témoins contenant des pastilles de céramique non revêtues et pour les puits contenant des pastilles de céramique revêtues de phage non infectées par *S. aureus* (**Figure 24A**). Les puits contenant des pastilles céramiques non chargées infectées par 10<sup>6</sup> UFC/mL de *S. aureus* présentaient une colonisation de surface très différente avec environ vingt fois moins d'ostéoblastes, indiquant que la présence de la bactérie pendant 14 h au voisinage de la cellule induit un détachement et/ou une lyse cellulaire (**Figure 24A**). Les puits contenant des pastilles de céramique chargées de phages et infectés par *S. aureus* présentaient une densité cellulaire similaire aux témoins (**Figure 24A**). Les mêmes types de résultats ont été obtenus pour la quantification des cellules ostéoblastes à partir de la colonisation de la surface céramique (**Figure 24B**). Aucune différence de densité cellulaire pour le contrôle n'a été observée après 14 h d'incubation, par rapport aux céramiques chargées de phage en présence ou en

l'absence de bactéries. Les pastilles céramiques non chargées, exposées aux bactéries, présentaient une faible colonisation par les ostéoblastes par rapport au témoin (**Figure 24B**). Au cours de cette incubation de 14 h, *S. aureus* s'est développé de manière significative dans les puits contenant des pastilles céramiques non revêtues colonisées par des ostéoblastes atteignant la densité bactérienne obtenue dans le milieu témoin sans pastille (**Figure 24C**). La présence de phages sur les pastilles céramiques a entraîné une réduction significative de la densité des cellules bactériennes dans le milieu, puisqu'il ne restait que  $8,1 \pm 6,1 \times 10^1$  cellules/mL (**Figure 24C**). Ces données montrent que la présence des phages *Remus* au sein de la pastille céramique protège efficacement les cultures de cellules ostéoblastiques contre l'infection à *S. aureus*. En effet, les phages ont pu lyser la suspension bactérienne avant l'infection des cellules ostéoblastiques sans affecter leur croissance et leur colonisation sur supports.



**Figure 24 :** Protection des cellules eucaryotes pré-ostéoblastes MC3T3-E1 contre les cellules bactériennes *S. aureus* par le phage Remus chargé sur des matériaux TCP. Les ostéoblastes étaient incubés dans du DMEM additionné de 10 % de sérum bovin foetal à 37°C dans des plaques à 12 puits contenant des pastilles de TCP avec ou sans phages Remus chargés et avec ou sans bactérie *S. aureus* (10<sup>6</sup> UFC/mL). La densité cellulaire eucaryote par cm<sup>2</sup> a été mesurée après 14 h de croissance dans différentes conditions : (A) en fond de puits + Pastilles TCP (contrôle), avec des bactéries ajoutées (bactéries), avec des phages chargés (phages) et avec des bactéries et des phages chargés (phages & bactéries). (B) Comme dans (A) mais la mesure a été effectuée sur des cellules cultivées uniquement sur la surface de la pastille. (C) Dans les deux conditions contenant des bactéries, (bactéries) et (phages et bactéries) comme dans (A) et (B), la densité des cellules bactériennes a également été mesurée par dénombrement de *S. aureus* après 14 h d'incubation. La mesure de la croissance bactérienne dans du DMEM supplémenté seul a été effectuée comme témoin (milieu). \*\*\* indiquer  $p < 0,001$  entre la densité cellulaire·cm<sup>-2</sup> ou les UFC/mL obtenus pour les expériences par rapport à l'échantillon non traité ou au milieu de contrôle.

Lorsque l'infection survient après une chirurgie ostéo-articulaire, plusieurs espèces bactériennes peuvent se trouver sur le site infectieux, plus précisément des bactéries du genre *Staphylococcus* et de souches de l'espèce *Escherichia coli*. Dans ce travail, les matériaux céramiques TCP ont été chargés par un cocktail à deux phages, *Remus* et *Lambda*, afin de lutter contre une population de deux bactéries : *S. aureus* et *E. coli*

**Cette étude a montré que les matériaux TCP peuvent être chargés avec ce cocktail de phages permettant la désorption des deux phages dans le milieu de croissance au cours de la prolifération bactérienne conduisant à la lyse des deux espèces bactériennes.**

Étonnamment, malgré le fait que des pastilles céramiques aient été immergées dans une suspension de phage avec un rapport égal, plus de 90 % des phages désorbables étaient des phages de *Remus*. Ainsi, le faible nombre de phages *lambda* désorbables n'a pas empêché la lyse de toutes les bactéries cibles. On peut considérer que la méthode de comptage des phages ne conduit pas au nombre total de phages adsorbés sur les céramiques mais les phages actifs sur les bactéries ne sont probablement que les phages désorbables dont le nombre est donné par notre méthode.

**Cette étude montre également que les phages Remus chargés sur du matériel TCP empêchent l'initiation du biofilm et détruisent complètement le biofilm préformé de *Staphylococcus aureus* après 96 heures d'incubation en présence des phages.**

Le bactériophage *Remus* est certainement capable de diffuser à travers la matrice du biofilm pour atteindre les bactéries cellulaires. Dans un travail antérieur, Vandersteegen et al a montré que le phage *Remus* était capable de dégrader partiellement un biofilm mature de *S. aureus* après une incubation de 24h [64].

Pour valider cette approche, l'un des objectifs de cette étude a été de vérifier que les phages ne perturbent pas la colonisation des cellules osseuses à la surface des matériaux TCP et permet la protection de cette colonisation lors d'une infection à *Staphylococcus aureus*.

**Cette étude a montré que les phages chargés sur les pastilles de céramique n'affectent pas la prolifération cellulaire et protègent ostéoblastes d'infections à *S. aureus in vitro*. Nos matériaux TCP chargés de phages pourraient être un bon dispositif prothétique pour limiter les infections bactériennes en chirurgie ostéo-articulaire et en protégeant contre de telles infections, puis permettre la prolifération et la colonisation des cellules ostéoblastiques sur le support inorganique après implantation.**

Le risque d'infection sur prothèse postopératoire après remplacement d'une prothèse de hanche ou de genou est de 0,5% à 2%. Pour les prothèses d'épaule et de coude, le risque est plus élevé, environ 3 à 4%. Après les deux premières années, le risque d'infection transmissible par le sang est de 2,3 infections par 1000 prothèses. Avec le traitement actuel, une chirurgie appropriée et une antibiothérapie sont associées à un taux de réussite d'au moins 80-90%. En cas d'échec, l'amputation est le dernier recours possible [57]. Les biofilms sont une cause importante d'implant orthopédique persistant infections [55] et génèrent une résistance physiologique aux antibiotiques [56] s'accumulant avec la résistance génétique (souches MDR).

Aujourd'hui, l'intérêt pour les thérapies alternatives est renforcé par l'émergence de souches multirésistantes (MDR) et par les difficultés croissantes à lutter contre ces infections bactériennes multirésistantes avec antibiotiques [65]. De plus, la faible accessibilité de certains antibiotiques au site infectieux est un problème supplémentaire durant les infections postopératoires de chirurgie osseuse. Cette étude montre que la phagothérapie peut résoudre soit l'accessibilité et/ou la résistance aux antibiotiques (résultant de la MDR et/ou biofilms) et que plusieurs espèces bactériennes peuvent être combattues en même temps par la phagothérapie.

**Il est indispensable d'utiliser un phage ou un cocktail de phages ciblé contre les germes situés sur le site infectieux du patient. La relation phage/espèce bactérienne étant spécifique, il est important d'avoir identifié au préalable l'étiologie de la ou les causes infectieuses et cela reste un problème non résolu faisant de cette méthode un curative plutôt qu'une thérapie préventive à ce jour.**

Le travail mené ici n'est pas de substituer la phagothérapie à l'antibiothérapie en chirurgie osseuse, mais plutôt d'offrir aux soignants une nouvelle méthode alternative puisque le dispositif utilisé dans cette étude ne peut pas être utilisé en thérapie préventive mais plutôt curative.

En effet, les bactériophages étant spécifiques de leur cellule hôte. Il est primordial de connaître les souches présentes sur les sites infectieux afin d'utiliser les phages adaptés à la prophylaxie. Les avancées en recherche sur les bactériophages pourraient permettre à l'avenir l'utilisation de cocktails de bactériophages à large spectre utilisable en phagoprophylaxie permettant la lutte contre plusieurs genres bactériens pour être utilisés en thérapie préventive. C'est un sujet de recherche important pour étendre l'utilisation de cette thérapie prometteuse.

### c. Biomatériaux et agents non viraux anti-infectieux

## 3. Activités de recherche en collaboration avec le laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille UGSF (UMR8576/CNRS).

### a. Historique des recherches menées

Lors de ma thèse, le laboratoire de génétique des enveloppes bactériennes s'intéressait à l'étude des glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) présents au sein de l'espace périplasmique de la majorité des bactéries à Gram négatif.

Le rôle exact des OPG n'est toujours pas élucidé. Le phénotype pléiotrope induit par le défaut de biosynthèse des OPG chez *E. chrysanthemi*, semble découler d'une perturbation générale de son enveloppe. Il apparaît ainsi que les OPG pourraient participer au maintien de l'intégrité structurale de l'enveloppe des protéobactéries.

Lors de mon travail de thèse co-encadré par M Jean-Pierre Bohin et de M Jean-Marie Lacroix, sur l'impact des OPG chez *E. chrysanthemi* (thèse soutenue le 21 juin 2006), j'ai eu pour objectif de mieux comprendre le phénotype des mutants Opg- par 2 stratégies :

- a. une analyse protéomique comparative entre un mutant Opg- et la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* dans le but de rechercher les gènes qui présentent une altération d'expression induite par l'absence d'OPG
- b. une stratégie de recherche de supprimeurs des mutations *opg* dont le but est d'obtenir des mutations permettant de supprimer le défaut induit par l'absence d'OPG. Ce type de mutations va nous permettre d'obtenir un éventail de gènes en relation étroite avec les OPG qui devrait conduire à préciser leur fonction.

L'analyse protéomique, nous a révélé des informations nouvelles et surprenantes sur l'impact induit par l'absence d'OPG. En effet, l'absence des OPG engendre non seulement une perturbation générale de l'enveloppe mais également des perturbations d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme intermédiaire. L'analyse protéomique indique une augmentation des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras insaturés et impliquées dans le



catabolisme des sucres. Cette analyse a également permis de mettre en évidence une augmentation de protéines impliquées dans la dégradation et la conformation des protéines souvent induites en réponse à divers stress. Ce défaut d'OPG est donc ressenti comme un dommage important pour la cellule qui y répond en induisant la réponse générale aux stress. Ainsi, la perte de virulence du mutant *Opg-* chez *E. chrysanthemi* est le résultat d'une altération des structures de l'enveloppe et d'une modification du métabolisme cellulaire.

Parallèlement, j'ai travaillé en collaboration avec l'équipe du professeur Jean-Pierre Zanetta sur l'analyse qualitative et quantitative des constituants spécifiquement bactériens à base de glycolipides par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS [66]. Ces travaux ont permis de montrer que l'analyse par chromatographie GC/MS des composés libérés par méthanolyse comme les dérivés heptafluorobutyriques permet la détermination qualitative et quantitative simultanée des pentoses ; des désoxy-hexoses, des hexoses, des hexosamines, des acides uroniques, du Kdo (acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique), des acides muramiques, de l'heptose (L-glycéro-D-mannoheptose) et de l'acide neuraminique aussi bien que la plupart des acides gras. Une partie de ces travaux sont en accord avec ceux obtenus en analyse protéomique. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation des acides gras insaturés chez le mutant *Opg-* qui est ainsi corrélé avec l'augmentation d'expression de leurs gènes de biosynthèse révélée par l'analyse protéomique. Ces travaux ont permis de démontrer que le métabolisme intermédiaire des mutants *opg-* est totalement perturbé.

A partir de la deuxième stratégie, différents types de mutants (suppresseurs) ont été obtenus chez lesquels les différentes propriétés phénotypiques d'un mutant *opg-* (motilité, sécrétion et biosynthèse des exoenzymes, aspect muqueux des colonies et la résistance aux sels biliaires) sont plus ou moins restaurées. Aucune des mutations testées ne restaure la virulence sur feuilles d'endives. L'analyse génétique de ces mutants, probablement ponctuels, a d'abord consisté dans la recherche d'insertions de transposons cotransductibles avec l'allèle sauvage de la mutation suppressive, puis de déterminer la fréquence de cotransduction avec l'allèle suppresseur. Alors il devenait possible de séquencer les séquences au voisinage du site d'insertion du transposon, de positionner l'élément sur le chromosome, puis de séquencer la ou les région(s) correspondant à la mutation suppressive. Ce travail a été long et fastidieux, mais il a permis d'obtenir des informations que la stratégie classique d'interruption n'aurait pas permise. En effet, l'une des mutations suppressives a été localisée dans le gène *rscC*. Ce gène code le capteur d'un système à deux composants qui répond à divers stress environnementaux [67].

Chez les bactéries, les systèmes à deux composants détectent des changements de l'environnement permettant à la bactérie de s'y adapter rapidement et, sont nécessaires à l'élaboration du pouvoir pathogène des bactéries. Ces systèmes à deux composants sont constitués d'un complexe capteur/régulateur où le capteur, le plus souvent transmembranaire, perçoit le signal et transmet l'information au régulateur, le plus souvent transcriptionnel. Le capteur est une protéine kinase

composée d'un domaine capteur qui perçoit le signal et d'un domaine transmetteur, s'auto-phosphorylant sur un résidu d'histidine spécifique. Le régulateur possède deux domaines, le domaine récepteur qui contient un résidu aspartate spécifique phosphorylé et le domaine régulateur, responsable de la reconnaissance des zones régulatrices des gènes cibles. Le régulateur est phosphorylé ou déphosphorylé par le capteur. La variation de phosphorylation du régulateur permet la modulation de l'activité des gènes cibles. Le système Rcs, quoique de structure atypique, fait partie de cette famille. Il a été initialement caractérisé chez *Escherichia coli* comme un régulateur positif de la synthèse de la capsule d'exopolysaccharides gouvernée par les gènes *rcsC* et *rcsB* [68]. Le régulateur transcriptionnel RcsB est activé par le transfert de phosphate en provenance de la protéine captrice RcsC [69], via un phosphotransmetteur (histidine-containing phosphotransmitter – hpt) présent sur la protéine RcsD (précédemment appelée YojN) [70]. Chez *E. coli* et d'autres bactéries entériques, l'activation des gènes de la synthèse des exopolysaccharides par le système Rcs, requiert un cofacteur, RcsA. RcsB et RcsA forment un hétérodimère qui en se fixant sur des sites spécifiques de l'ADN active la transcription [71]. Ce même système RcsCDBA régule également mais négativement l'opéron maître *flhDC* [72] codant les produits nécessaires à l'expression des gènes impliqués dans la synthèse flagellaire indispensable à la motilité et au chimiotactisme. RcsCDB régule négativement l'opéron *tolQRA* chez *Escherichia coli* [73]. Cet opéron code un complexe protéique impliqué dans le maintien de l'intégrité structurale de l'enveloppe et indispensable pour l'entrée des colicines et des phages filamenteux dans la bactérie. Par contre, RcsCDB régule positivement les gènes de division cellulaire *ftsA* et *ftsZ* nécessaires à la formation du septum [74] et le gène osmorégulé *osmC* codant une protéine transmembranaire de fonction inconnue [75]. Cet éventail de gènes cibles est non exhaustif mais semble intervenir dans les fonctions altérées chez le mutant Opg-. De plus, le système Rcs est impliqué dans la virulence des bactéries pathogènes. Il est suggéré que les bactéries pathogènes diminuent l'expression de certains gènes durant l'infection parce que l'expression de tels gènes peut être incompatible avec le déploiement de leur arsenal de virulence [76]. Chez *Salmonella enterica*, ce système réprime la production de flagelline et de protéines d'invasion en réponse aux changements de l'osmolarité du milieu [77]. De plus, lorsque le système est activé de manière constitutive, il engendre une atténuation de sa virulence [78]. Les mutants constitutifs *rscC* de *S. enterica* sont phagocytés très efficacement par les macrophages, sont déficients dans l'invasion des cellules non-phagocytaires, survivent dans les macrophages et ils protègent la souris contre un rappel de la souche sauvage. La surproduction de la protéine chaperon DjlA [79], une mutation dans le gène *igaA* codant une protéine transmembranaire de fonction inconnue, essentielle pour *S. enterica* [80;81] ou une mutation dans le gène *mdoH* impliqué dans la biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés [82], activent de manière constitutive le système Rcs.

Ainsi, le système Rcs serait un facteur commun de virulence des bactéries pathogènes pour les plantes et pour les animaux. La mutation que j'ai isolée dans le gène *rscC*, nommée *rscC2* (A463V), affecte la partie cytoplasmique de la protéine

RcsC en dehors du domaine histidine kinase. Lorsque la mutation *rscC2* a été placée dans un contexte Opg+, elle a pour effet d'augmenter la virulence sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive et la résistance aux sels biliaries (100% de survie en présence de 16g/L de sels biliaries). De plus, ces mutants *rscC2* présentent une diminution de 60% de synthèse des OPG par rapport à la souche sauvage.

**En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en évidence une relation fonctionnelle entre les OPG et le système à deux composants Rcs**

[b. projet de recherche en cours \(convention recherche avec l'UGSF UMR8576 CNRS\):](#)

### **Induction des systèmes phosphorelais de la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* durant les différentes étapes de l'infection de la plante**

*D. dadantii* est une entérobactérie phytopathogène nécrotrophe responsable de la maladie de la pourriture molle sur un large spectre d'hôtes. Elle va toucher une très grande partie des dicotylédones dont l'endive et la pomme de terre, principaux modèles d'étude au laboratoire. Suite au réchauffement climatique, cette bactérie, à l'origine tropicale, est de plus en plus présente en Europe. Depuis 2002, elle fait partie du Top10 des agents phytopathogènes [83]. Elle détruit jusqu'à 25% de la production de pomme de terre en Europe et Israël [84] (soit 32,5 millions de tonnes par an, environ 6,5 milliards d'euros de perte, source : Food and Agricultural Organization of the United Nations). L'infection de la plante va se faire en plusieurs étapes au cours desquels la bactérie va être soumise à de nombreux stress. Le processus débute par la phase de vie épiphyte durant laquelle la bactérie, présente à la surface de la plante, cherche à y entrer, elle se protège en construisant un biofilm en attendant de pouvoir pénétrer dans la plante. Pour cela, la bactérie a besoin d'une blessure de la plante. La plante blessée va produire de l'acide jasmonique, molécule d'alerte et première défense de la plante [85]. Reconnue par *D.dadantii*, cette molécule permet à la bactérie de, se diriger puis de rentrer dans la plante par la blessure. La phase asymptomatique débute alors.

La bactérie colonise l'apoplaste, espace localisé entre les cellules végétales. J'ai participé à la démonstration récente (Cochard *et al.* Accepté à Spectrum Microbiol.) que *D. dadantii* se retrouve dans un milieu acide permanent durant toute l'infection. C'est l'un des multiples stress auxquels la bactérie va alors être confronté alors qu'elle débute sa croissance puisque dès l'entrée de la bactérie, la plante détecte l'intruse et active ces systèmes de défense. à savoir, pour les principaux, des ROS (radicaux libres oxygénés), entraînant un stress oxydatif, des peptides antimicrobiens et des phytoalexines (composés phénoliques) [86]. Si la plante gagne la bactérie arrête sa multiplication. Par contre, lorsque la bactérie parvient à surmonter ces attaques,

elle se multiplie rapidement puis passe à la dernière phase de l'infection : la phase symptomatique. Durant cette phase, la bactérie va sécréter des enzymes (cellulases, pectinases, protéases) qui vont hydrolyser les différents composants de la paroi végétale et conduire à la lyse des cellules végétales ce qui permet à la bactérie de se nourrir, de se multiplier et de disséminer de proche en proche, contaminant ainsi les tissus sains de la plante. La macération (pourriture de la plante), signe visible de l'infection, s'étend à travers la plante jusqu'à sa mort.

Durant toute sa colonisation, la bactérie devra percevoir son nouveau milieu, la plante, particulièrement la nature des stress qu'elle doit combattre mais aussi les éléments nutritifs dont elle pourra profiter si elle veut s'y adapter. Pour que la virulence soit optimale, une régulation coordonnée, précise et minutée des gènes bactériens est donc essentielle pour répondre aux variations physico-chimiques rencontrées dans la plante. Ainsi, l'adaptation de nombreux facteurs rentrent en compte tels que l'ajustement du métabolisme, la motilité ou la réponse aux stress qui ne pourra se faire sans la détection des variations par des capteurs dédiés appelés phosphorelais ou systèmes à deux composants (voir description page 58). Chaque phosphorelais perçoit une gamme de stimuli environnementaux limités ce qui implique que divers phosphorelais soient présents chez les bactéries en relation avec la diversité des stimuli auxquels elles doivent répondre. On comprendra que plus l'espèce bactérienne fréquente de milieux différents, plus elle possèdera de ces systèmes. *D. dadantii* en possède 32. A ce jour, 6 de ceux-ci sont impliqués dans la virulence. Bien qu'il semble peu probable que tous aient un rôle dans la virulence, ce chiffre paraît un peu faible face à l'étendue des stimuli auxquels doit répondre la bactérie durant l'infection. Notre but est de définir quels les systèmes participant à la virulence parmi les 32 phosphorelais. Des mutants inactivant chacun des 32 phosphorelais ont été générés et 14 (dont les 6 déjà caractérisés) d'entre eux affectent, à des degrés divers, la virulence.

Le but du projet est donc de dresser le profil de phosphorylation *in planta* des 8 phosphorelais essentiels restant impliqués dans le phénomène de virulence durant la progression de l'infection dans l'endive et à quel moment de l'infection ils interviennent. Pour cela, la technique du PhosTag *in vivo* va être utilisée. Cette technique unique a été mise au point dans notre laboratoire afin de suivre la variation quantitative de la phosphorylation des régulateurs tout au long de l'infection. En parallèle, des phénotypes majeurs associés à la virulence seront testés (ROS, enzymes de dégradation, phytoalexines, motilité...). Nous pourrions ainsi associer à chaque phosphorelais son ou ses stimulus directement et pouvoir préciser, en comparant les résultats *in vivo* et *in planta* le moment de l'infection où la bactérie est soumise à ce stress.

Au-delà de la virulence, la bactérie a une vie de saprophyte en dehors de la plante. C'est ainsi que nous testerons pour les 32 phosphorelais d'autres phénotypes pour leur assigner un rôle dans le cycle de vie complet de la bactérie (biofilms, pellicule, durée de vie dans la terre, dans l'eau), caractéristiques négligées par rapport à la

virulence mais essentielles puisqu'elles conditionnent la durée de vie de la bactérie entre chaque infection et donc sa potentielle virulence ultérieure.

Notre objectif est donc de décrypter le(s) rôle(s) des 32 TCS de *D. dadantii* dans son cycle de vie multiple de la vie en saprophyte à la virulence. Pour cela, mes compétences en matière de biofilms et de RT qPCR seront mises à profit par le laboratoire Lillois.

## V. Projet de recherche au sein du CERAMATHS.

### 1. Biomatériaux et lutte contre les biofilms installés de structure homogène et hétérogène.

Actuellement mes travaux de recherche se poursuivent sur l'utilisation des biomatériaux en phagothérapie. L'objectif est d'optimiser le dispositif Matériaux/phage dans la lutte contre les biofilms homogènes et hétérogènes.

Actuellement, la phagothérapie n'est pas autorisée en pratique traditionnelle mais connaît un essor d'intérêt en vue de remplacer ou de compléter les antibiotiques dont l'utilisation intensive a engendré l'apparition de bactéries multi-résistantes. En France, les infections nosocomiales ont une prévalence estimée à 5.6% pendant les hospitalisations, représentant 750000 des infections nosocomiales dont 158000 des infections sont causées par des bactéries multi-résistantes, ce qui complique considérablement le traitement curatif par les antibiotiques connus [58]. Ces infections nosocomiales engendrent la formation de biofilm dense et complexe (hétérogène) au sein du site infectieux et accolés aux prothèses lorsqu'une opération a engendré l'installation d'un tel dispositif. Ces biofilms sont très souvent constitués en grande partie de *S. aureus* mais également de multiples bacilles à Gram – et +.

La phagothérapie peut donc être une solution curative efficace pour éradiquer les bactéries nosocomiales multi-résistantes en utilisant des bactériophages spécifiques des germes impliqués. Il sera donc nécessaire d'effectuer un traitement personnalisé vis-à-vis de l'infection considérée. La phagothérapie a une action rapide, quasi immédiate, dès que l'agent étiologique est identifié et que les phages sont administrés, puis sans effet néfaste sur la flore intestinale.

Au sein du laboratoire des matériaux céramiques et des procédés associés, des études ont montré que les céramiques à base de phosphate de calcium (TCP, HA) ont la faculté d'adsorber les bactériophages à leurs surfaces et que la quantité de particules virales adsorbées dépend de la surface spécifique, de la microporosité et macroporosités. En effet, plus de  $10^4$  à  $10^8$  bactériophages sont retenus par les pastilles (15 mm de diamètre, 2 mm d'épaisseur) de HA ou TCP en fonction du taux de microporosité engendré par l'application de différentes températures de frittage [10]. Il a été montré également que les biomatériaux pouvaient être fonctionnalisés par un cocktail de phage et capable de s'attaquer à une population hétérogène bactérienne en culture planctonique *in vitro* (*Escherichia coli*/ *Staphylococcus aureus*). Ces biomatériaux chargés en bactériophages ont également la faculté d'éradiquer en

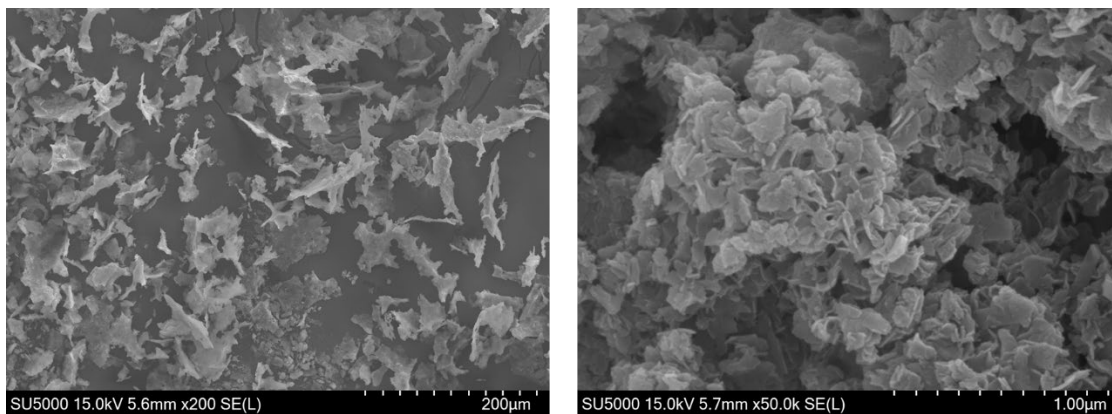
96h un biofilm mature de *Staphylococcus aureus* installé depuis 24h sur polystyrène à l'aide de biocéramique imprégné de bactériophages *Remus* [51].

Avant de mener des essais in vivo, nous souhaitons optimiser le relargage dans le temps afin d'obtenir une charge virale forte durant les premières semaines d'utilisation du dispositif. Il est constaté en effet, que la charge virale était relarguer fortement dans les premières 24h en suite cette charge a une tendance à la baisse. Nous avons démontré que l'utilisation d'un hydrogel à base d'alginate pouvait améliorer la rétention et de relarguer à plus long terme les bactériophages dans le milieu de culture testé.

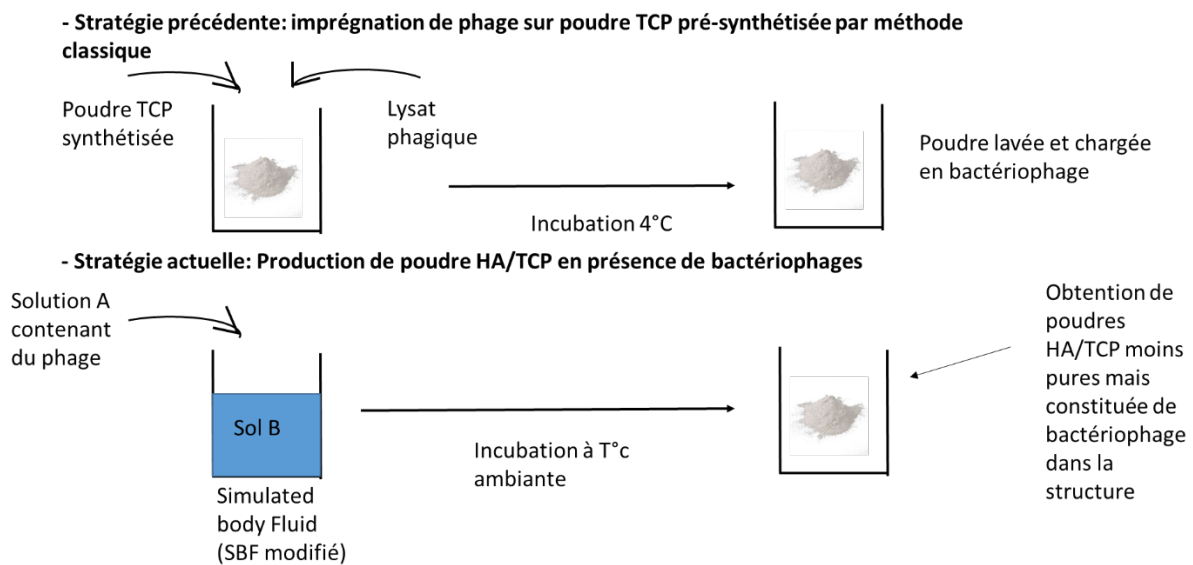
Nous nous proposons de synthétiser des substituts TCP/HA différemment à la méthode classique employé au laboratoire qui utilise des conditions non propices à la survie des bactériophages (pH élevé, température de calcination, température de frittage). Nous nous proposons de synthétiser de la poudre apatitique par réaction aqueuse mais en employant des conditions compatibles avec la survie des bactériophages.

Pour cela, de la poudre apatitique (**Figure 25**) est synthétisée en présence des bactériophages dans le bain réactionnel. Cette méthode chimique à froid emploi des conditions de pH et de température compatible avec les conditions physiologiques propice aux bactériophages (conditions de synthèse des poudres : pH 7, température 4°C). Nous souhaitons par cette méthode incorporer directement les bactériophages dans la masse de poudre apatitique (**Figure 26**).

Ceci devrait permettre de retenir plus de phage dans sa structure par séquestration et adsorption.



**Figure 25** : poudre apatitique synthétisée à froid en présence de bactériophage



**Figure 26 :** Synthèse de poudre apatitique en présence de bactériophage.

Nous nous proposons de vérifier l'efficacité d'un cocktail de bactériophages chargés dans la poudre apatitique fonctionnalisée sur un biofilm installé de 1 jour à 7 jours. L'utilisation d'une poudre synthétisée à froid en présence de bactériophage pourrait faciliter la diffusion des phages à travers la couche polysaccharidique des biofilms permettant ainsi de favoriser le rapprochement des particules virales aux enveloppes bactériennes. En effet, certains bactériophages ne diffusent pas naturellement à travers la capsule des biofilms bactériens. La synthèse des biocéramiques par procédés à froid afin d'intégrer les phages dans la masse du biomatériau pourrait permettre de ralentir le relargage dans le temps des particules virales. Ces particules seraient ainsi libérées lors de décomposition naturelle du biomatériau résultant de leur parfaite bio-activité. Cette intégration des bactériophages dans la structure des poudres pourrait également sauvegarder nos bactériophages vis-à-vis de notre système immunitaire. Une étude *in vivo* devra être envisagée dans le futur si les conditions *in vitro* démontrent une grande efficacité sur les biofilms matures.

## 2. Biomatériaux et agents non viraux anti-infectieux

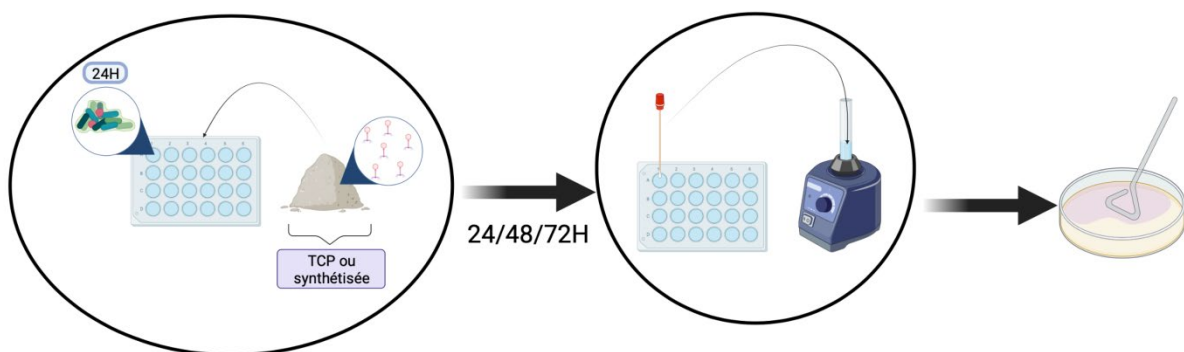
Au sein du laboratoire nous recherchons d'autres molécules anti-infectieuses affines aux matériaux à base de phosphate de calcium comme des huiles essentielles, peptides antimicrobiens, extraits de végétaux permettant de se détacher par désorption au cours du temps sans besoin de greffage chimique. Actuellement des extraits de grenade semble apporter des réponses assez remarquables vis-à-vis des bactéries à Gram positif tel que *Bacillus sp* et *Staphylococcus sp*. Les résultats préliminaires semblent indiquer une non toxicité des dispositifs matériaux/extraits de grenade vis-à-vis des cellules ostéoblastiques. L'objectif d'utiliser des molécules non



classiques d'antibiothérapie pourrait permettre d'obtenir un effet synergique à l'action des bactériophages en ciblant les mêmes bactéries mais également en luttant contre les bactéries qui n'auront pas été identifiées sur un site infectieux ou pour lesquelles, il n'existe pas de bactériophages spécifiques identifiées.

### 3. Suivi en temps réel des biofilms exposés ou non aux bactériophages par système ultrasonore (collaboration avec le laboratoire IEMN, CNRS, Dorothee Callens-Debavelaere, Emmanuel Moulin, Julien Carlier)

La difficulté rencontrée dans l'étude de la formation des biofilms est son suivi en temps réel. L'application de méthodes d'analyses non invasives serait optimale pour permettre d'obtenir une meilleure compréhension sur la cinétique d'installation d'un biofilm sur support mais également pour suivre son élimination via nos dispositifs agents anti-infectieux/biomatériaux. Actuellement, au sein du laboratoire, nous réalisons l'étude des biofilms au contact de notre poudre phosphocalcique et ceci est réalisé en dénombrant le nombre de bactéries fixées sur le polystyrène des microplaques de culture. Ces bactéries sont récupérées par écouvillonnage. Cette méthode implique une perte de cellules et entraîne donc un arrêt du développement microbien (**Figure 27**).

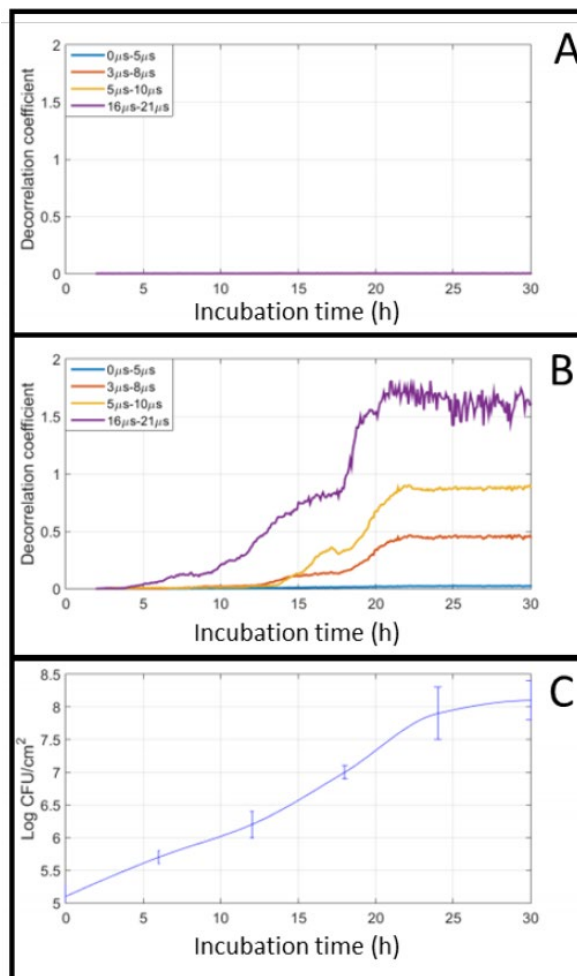


**Figure 27** : protocole d'analyse des biofilms

Nous nous proposons d'entreprendre les techniques ultrasonores dans le suivi des biofilms en contact avec nos échantillons matériaux dopés aux bactériophages ou autres agents actifs en fonction du temps et à des temps relativement long. Ceci en milieu discontinu et en milieu continu.

Au sein de l'institut d'électronique et de nanotechnologie IEMN/ UMR8520-DOAE-Département d'Opto-Acousto-Électronique, une étude a permis de détecter la formation d'un biofilm par interférométrie à ondes Coda (ultrason). Cette étude a mis en évidence une corrélation entre les signaux apportés par les ondes coda et le développement d'une culture microbienne fixée sur un support en inox [87, **Figure 28**].





**Figure 28 :** Evolution du coefficient de décorrélation en fonction du temps d'incubation pour : A : échantillon témoin sans biofilm, B : Lors de la formation de biofilm, avec différentes fenêtres temporelles : 0 $\mu$ s-5 $\mu$ s, 3 $\mu$ s-8 $\mu$ s, 5 $\mu$ s-10 $\mu$ s, 16 $\mu$ s-21 $\mu$ s (bande de fréquence 9MHz-11MHz) ; C : présente la cinétique de la formation de biofilm de *S. aureus* sur un substrat en acier inoxydable.

Cette technique d'analyse en collaboration avec l'équipe du département DOAE/IEMN nous permettra de mieux analyser la destruction d'un biofilm au cours du temps sans entreprendre une approche invasive. Ceci nous sera très utile dans la compréhension de la cinétique de destruction du biofilm par nos dispositifs anti-infectieux.

Enfin pour effectuer ce type d'analyse en système de culture en continu, au sein de ce même laboratoire, des systèmes micro-fluidiques ont été mis au point intégrant l'analyse ultrasonore.

A travers cette technologie, 2 projets de recherche seront menés :

- Etude par ondes Coda de la destruction d'un biofilm hétérogène mature par l'utilisation de poudre apatitique fonctionnalisée par un cocktail de bactériophages
- Etude du relarguage des bactériophages d'un support TCP par technique ultrasonore en système micro-fluidique.

Une autre approche incluant ces technologies ultrasonores pourra être menée à travers une problématique touchant plus particulièrement les industries agro-alimentaires et bio-pharmaceutiques notamment sur les procédés de nettoyage et désinfection des canalisations ou des échangeurs thermiques. L'encrassement des échangeurs de chaleur est l'accumulation de dépôts sur les surfaces solides [88]. Ces dépôts réduisent l'efficacité des équipements de traitement et augmentent le risque de contamination de surface ultérieure avec la formation de biofilms. En effet, les industries laitières sont très souvent confrontées à des biofilms bactériens encrassant les canalisations inox permettant la circulation du lait entre chaque opération unitaire. Une bactérie non tolérée dans ce type de secteur d'activité sévit plus particulièrement que d'autres, il s'agit de la bactérie *pseudomonas aeruginosa*, bactérie tellurique qui peut potentiellement provenir du lait cru lors de mammite à *pseudomonas*. Au sein du laboratoire IEMN UMR-CNRS8520, Département Opto-Acousto-Electronique et du laboratoire INRA UR638, Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux, une étude a permis de démontrer que le dépôt d'encrassement sur surface solide peut être suivi en temps réel par interférométrie à ondes Coda [89]. En lien avec les membres de cette publication, nous nous proposons de suivre l'encrassement du support solide avec installation de biofilm à *pseudomonas aeruginosa* puis son éradication avec nos dispositifs poudre céramique chargés en bactériophages pour estimer les meilleures conditions de nettoyage et désinfection par traitement curatif à bactériophages et tout cela de manière non invasive.

## VI. Références bibliographiques

---

- <sup>1</sup> Darouiche, R.O. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 1422–1429.
- <sup>2</sup> K. De Groot, Bioceramics consisting of calcium phosphates salts, *Biomaterials* 1 (1980) 47–50, 47.
- <sup>3</sup> G. Hannink, J.J. Chris Arts, Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury, Bone Substitutes: A Comprehensive Overview* 42 (Supplement 2) (2011).
- <sup>4</sup> M.R. Urist, Bone : formation by autoinduction, *Science, New series* 150 (No. 3698) (1965) 893–899.
- <sup>5</sup> L. Cheng, T. Wang, J. Zhu, P. Cai, Osteoinduction of calcium phosphate ceramics in four kinds of animals for 1 Year: dog, rabbit, rat, and mouse, *Transplant. Proc.* 48 (4) (2016) 1309–1314.
- <sup>6</sup> Burg, K.J.L., Porter, S., Kellam, J.F., *Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials.*, 21. (2000) 2347–2359.
- <sup>7</sup> Daculsi, G., LeGeros, R.Z., M. Heughebaert, M., Barbieux, I., Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int.*, 46, (1990) 20–27.
- <sup>8</sup> Le Nihouannen, D., Le Guehennec, L., Rouillon, T., Pilet, P., Melitta Bilban, M., Layrolle, P., Daculsi, G., Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 27, (2006) 2716–2722.
- <sup>9</sup> Shaan Chamary, Liliana Grenho, Maria Helena Fernandes, Franck Bouchart, Fernando Jorge Monteiro, Jean Christophe Hornez, Influence d'une structure  $\beta$ -TCP macroporeuse sur la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines in vitro. *open ceramics*, 7. (2021) 100141.
- <sup>10</sup> Edwige Meurice, Emmanuelle Rguiti, Annie Brutel • Jean-christophe Hornez, Anne Leriche, Michel Descamps, Franck Bouchart, New antibacterial microporous CaP materials loaded with phages for prophylactic treatment in bone surgery, *J Mater Sci: Mater Med* (2012) 23:2445–2452.
- <sup>11</sup> Rached Ismail , Natalia D. Dorighello Carareto , Jean-Christophe Hornez and Franck Bouchart, A Localized Phage-Based Antimicrobial System: Effect of Alginate on Phage Desorption from  $\beta$ -TCP Ceramic Bone Substitutes, *Antibiotics* 2020, 9, 560.
- <sup>12</sup> Burmolle M, Webb JS et al. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 3916-3923
- <sup>13</sup> Cheng Chang and all : Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future *Front Microbiol* 2022 Apr 4;13:825828. doi: 10.3389/fmicb.2022.825828

- 
- <sup>14</sup> Wolcott et al., 2010 ; Wu et al., 2015, Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Hoiby, N., and Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7. doi: 10.1038/ijos.2014.65.
- <sup>15</sup> Høiby et al., 2011, Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P., et al. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 3, 55–65. doi: 10.4248/ijos11026; Wu et al., 2015
- <sup>16</sup> Cheng Chang, Xinbo Yu<sup>1</sup>, Wennan Guo, Chaoyi Guo, Xiaokui Guo, Qingtian Li and Yongzhang Zhu. Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future, *Front. Microbiol.*, 04 April 2022
- <sup>17</sup> Wolcott, R. D., Rumbaugh, K. P., James, G., Schultz, G., Phillips, P., Yang, Q., et al. (2010). Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window. *J. Wound Care* 19, 320–328. doi: 10.12968/jowc.2010.19.8.77709
- <sup>18</sup> Wolcott et al., 2010 ; Yan et Bassler, 2019, Yan, J., and Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe* 26, 15–21. doi: 10.1016/j.chom.2019.06.002
- <sup>19</sup> (Pires D, Melo LDR, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. 2017. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 39:4856)
- <sup>20</sup> (Dunsing V, Irmischer T, Barbirz S, Chiantia S. 2019. Purely polysaccharide-based biofilm matrix provides size-selective diffusion barriers for nanoparticles and bacteriophages. *Biomacromolecules* 20(10):3842–54)
- <sup>21</sup> Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 232(1):1–6
- <sup>22</sup> (González S, Fernández L, Gutiérrez D, Campelo AB, Rodríguez A, García P. 2018. Analysis of different parameters affecting diffusion, propagation and survival of staphylophages in bacterial biofilms. *Front. Microbiol.* 9:2348).
- <sup>23</sup> (Manning AJ, Kuehn MJ. 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 11(1):258, Reyes-Robles T, Dillard RS, Cairns LS, Silva-Valenzuela CA, Housman M, et al. 2018. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 200(15):e00792-17).
- <sup>24</sup> Diana P. Pires, Luís D. R. Melo, and Joana Azeredo, Understanding the Complex Phage-Host Interactions in Biofilm Communities, *Annu. Rev. Virol.* (2021). 8:12.1–12.22
- <sup>25</sup> Twort, F. W. (1925). "The Discovery of the "bacteriophage."". *The Lancet.* 205 (5303): 845
- <sup>26</sup> Summers, W.C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* 2012, 2, 130–133.
- <sup>27</sup> Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z.; Morris, J.G. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 649–659.

- 
- <sup>28</sup> Górski, A.; Miećdzybrodzki, R.; Wełgrzyn, G.; Jon´czyk-Matysiak, E.; Borysowski, J.; Weber-Dańbrowska, B. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med. Res. Rev.* 2020, 40, 459–463.
- <sup>29</sup> Félix d'Hérelle, « Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Note de M. F. d'Hérelle, présentée par M. Roux », *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, vol. 165, 10 septembre 1917, p. 373-375.
- <sup>30</sup> (La phagothérapie, des virus pour combattre les infections, Dr Alian Dublanche, édition Favre)
- <sup>31</sup> Pires, D.P.; Oliveira, H.; Melo, L.D.R.; Sillankorva, S.; Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: Their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2141–2151.
- <sup>32</sup> Dublanche, A.; Fruciano, E. Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine Mal. Infect.* 2008, 38, 415–420.
- <sup>33</sup> Ansaldi, M.; Boulanger, P.; Brives, C.; Debarbieux, L.; Dufour, N.; Froissart, R.; Gandon, S.; Le Héna\_, C.; Petit, M.-A.; Rocha, E.; et al. Antibacterial applications of bacteriophages. *Virologie* 2018, 24, 23–36.
- <sup>34</sup> Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.M. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011, 1, 66–85.
- <sup>35</sup> Loc-Carrillo, C.; Abedon, S.T. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011, 1, 111–114.
- <sup>36</sup> McCallin, S.; Sacher, J.C.; Zheng, J.; Chan, B.K. Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses* 2019, 11, 343.
- <sup>37</sup> Nguyen, S.; Baker, K.; Padman, B.S.; Patwa, R.; Dunstan, R.A.; Weston, T.A.; Schlosser, K.; Bailey, B.; Lithgow, T.; Lazarou, M.; et al. Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *mBio* 2017, 8, e01874-17.
- <sup>38</sup> Lehti, T.A.; Pajunen, M.I.; Skog, M.S.; Finne, J. Internalization of a polysialic acid-binding *Escherichia coli* bacteriophage into eukaryotic neuroblastoma cells. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1915.
- <sup>39</sup> Górski, A.; Miećdzybrodzki, R.; Jon´czyk-Matysiak, E.; Borysowski, J.; Letkiewicz, S.; Weber-Dańbrowska, B. The fall and rise of phage therapy in modern medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2019, 19, 1115–1117.
- <sup>40</sup> Pires, D.P.; Costa, A.R.; Pinto, G.; Meneses, L.; Azeredo, J. Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiol. Rev.* 2020.
- <sup>41</sup> Darouiche, R.O. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 1422–1429.
- <sup>42</sup> Ma, Y.; Pacan, J.C.; Wang, Q.; Xu, Y.; Huang, X.; Korenevsky, A.; Sabour, P.M. Microencapsulation of Bacteriophage Felix O1 into Chitosan-Alginate Microspheres for Oral Delivery. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 4799–4805.

- 
- <sup>43</sup> Ma, Y.; Pacan, J.C.; Wang, Q.; Sabour, P.M.; Huang, X.; Xu, Y. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocoll.* 2012, 26, 434–440.
- <sup>44</sup> Remminghorst, U.; Rehm, B.H.A. Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.* 2006, 28, 1701–1712.
- <sup>45</sup> Chapman, V.J.; Chapman, D.J. Algin and Alginates. In *Seaweeds and Their Uses*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1980; pp. 194–225.
- <sup>46</sup> Goh, C.H.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.* 2012, 88, 1–12.
- <sup>47</sup> Gasperini, L.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J. R. Soc. Interface* 2014, 11, 20140817.
- <sup>48</sup> Kim, S.; Jo, A.; Ahn, J. Application of chitosan-alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2015, 50, 913–918.
- <sup>49</sup> Barros, J.A.R.; de Melo, L.D.R.; da Silva, R.A.R.; Ferraz, M.P.; Azeredo, J.C.V.d.R.; Pinheiro, V.M.d.C.; Colaço, B.J.A.; Fernandes, M.H.R.; Gomes, P.d.S.; Monteiro, F.J. Encapsulated bacteriophages in alginate-nanohydroxyapatite hydrogel as a novel delivery system to prevent orthopedic implant-associated infections. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2020, 24, 102145.
- <sup>50</sup> Strasser, V.; Matijaković, N.; Mihelj Josipović, T.; Kontrec, J.; Lyons, D.M.; Kralj, D.; Dutour Sikirić, M. Factors affecting calcium phosphate mineralization within bulk alginate hydrogels. *J. Polym. Res.* 2019, 26, 262.
- <sup>51</sup> Bouchart, F.; Vidal, O.; Lacroix, J.-M.; Spriet, C.; Chamary, S.; Brutel, A.; Hornez, J.-C. 3D printed bioceramic for phage therapy against bone nosocomial infections. *Mater. Sci. Eng. C* 2020, 111, 110840.
- <sup>52</sup> Gordillo Altamirano, F.L.; Barr, J.J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019, 32, e00066-18.
- <sup>53</sup> Alves, D.; Cerqueira, M.A.; Pastrana, L.M.; Sillankorva, S. Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Res. Int.* 2020, 128, 108791.
- <sup>54</sup> D.W. Bratzler, P.M. Houck, Surgical Infection Prevention Guidelines Writers Workgroup, American Academy of Orthopaedic Surgeons, American Association of Critical Care Nurses, American Association of Nurse Anesthetists, American College of Surgeons, American College of Osteopathic Surgeons, American Geriatrics Society, American Society of Anesthesiologists, American Society of Colon and Rectal Surgeons, American Society of Health-System Pharmacists, American Society of PeriAnesthesia Nurses, Ascension Health, Association of peri-Operative Registered Nurses, Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Infectious Diseases Society of America, Medical Letter, Premier, Society for Healthcare Epidemiology of America, Society of Thoracic Surgeons, Surgical

---

Infection Society, Antimicrobial prophylaxis for surgery: an advisory statement from the National Surgical Infection Prevention, *Clin. Infect. Dis.* 38 (12) (2004) 1706-15.

<sup>55</sup> J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* 284 (1999) 1318-1322.

<sup>56</sup> P.S. Stewart, J.W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* 358 (9276) (2001) 135-138.

<sup>57</sup> Infections ostéo-articulaires, published by the expert group of Infections OstéoArticulaires (IOA) from the Société Suisse d'Orthopédie et de Traumatologie and the Société Suisse d'Infectiologie (2015).

<sup>58</sup> M. Colomb-Cotinat, J. Lacoste, B. Coignard, S. Vaux, C. Brun-Buisson, V. Jarlier, Etude Burden BMR. Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012, Institut de Veille Sanitaire (2015).

<sup>59</sup> C. Kishor, R. Raman Mishra, S. K. Saraf, M. Kumar, A. K. Srivastav & G. Nath. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Indian J Med Res* 143 (2016) 87-94.

<sup>60</sup> N. Dufour, R. Delattre, A. Chevallereau, J-D. Ricard and L. Debarbieux. Phage therapy of pneumonia is not associated with an over stimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* (8) (2019) 25;63

<sup>61</sup> C. Perez-Jorge, E. Gomez-Barrena, J.-P. Horcajada, L. Puig-Verdie, J. Esteban, Drug treatments for prosthetic joint infections in the era of multidrug resistance, *Expert. Opin. Pharmacother.* 17(9) (2016) 1233-1246.

<sup>62</sup> E. Meurice, A. Leriche, J.-C. Hornez, F. Bouchart, E. Rguiti, L. Boilet, M. Descamps, F. Cambier, Functionalisation of porous hydroxyapatite for bone substitutes, *J. Eur. Ceram. Soc.* 11 (32) (2012) 2673-2678.

<sup>63</sup> E. Meurice, E. Rguiti, A. Brutel, J.-C. Hornez, A. Leriche, M. Descamps, F. Bouchart, New antibacterial microporous CaP materials loaded with phages for prophylactic treatment in bone surgery, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (10) (2012) 2445- 2452.

<sup>64</sup> K. Vandersteegen, A.M. Kropinski, J.H.E. Nash, J.-P. Noben, K. Hermans, R. Lavigne, Romulus and Remus, two phage isolates representing a distinct clade within the Twortlikevirus genus, display suitable properties for phage therapy applications, *J. Virol.* 87 (6) (2013) 3237-3247.

<sup>65</sup> E. Kellenberger, Vegetative bacteriophage and the maturation of virus particles, *Adv. Virus Res.* 8 (2017) 1-61.

- 
- <sup>66</sup> Anne Bohin, Franck Bouchart, Colette Richet, Osarath Kol, Yves Leroy, Philippe Timmerman, Guillemette Huet, Jean-Pierre Bohin, Jean-Pierre Zanetta, GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives. 2005 Analytical biochemistry 340 : 231-244)
- <sup>67</sup> Franck Bouchart and al. The Virulence of a *Dickeya dadantii* 3937 Mutant Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans Is Restored by Inactivation of the RcsCD-RcsB Phosphorelay. Journal of Bacteriology, July 2010, p. 3484-3490, Vol. 192, No. 13).
- <sup>68</sup> Gottesman, S., P. Trisler, and A. Torres-Cabassa. 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. J Bacteriol 162: 1111-1119.
- <sup>69</sup> Stout V 1, S. Gottesman. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. Bactériol J.1990 février ;172(2):659-69.
- <sup>70</sup> Takeda S, Fujisawa Y, Matsubara M, Aiba H, Mizuno T. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. Mol Microbiol. 2001;40:440–450.
- <sup>71</sup> M Wehland 1, F Bernhard. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. J Biol Chem. 2000 Mar 10; 275(10):7013-20.
- <sup>72</sup> Francez-Charlot, A., B. Laugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, and M. P. Castanie-Cornet. 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 49: 823-832.
- <sup>73</sup> Thierry Clavel, Jean Claude Lazzaroni, Anne Vianney, Raymond Portalier. Expression of the tolQRA genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. Molecular Microbiology (1996) 19(1), 19-25
- <sup>74</sup> Fabrice Carballes, Claire Bertrand, Jean-Pierre Bouche, Kaymeuang Cam. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rcsC*–*rscB*. Microbiologie moléculaire (1999) 34 (3), 442-450.
- <sup>75</sup> Gervais, F.G., P. Phoenix, and G. R. Drapeau. 1992. The *rscB* gene, a positive regulator of colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*, is also an activator of *ftsZ* expression. J Bacteriol 174: 3964-3971.
- <sup>76</sup> Mouslim, C., M. Delgado, and E. A. Groisman. 2004. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. Mol Microbiol 54: 386-95.
- <sup>77</sup> Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey, and M. Y. Popoff. 1998. The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. Mol Microbiol. 29: 835-850.



- 
- <sup>78</sup> Garcia-Calderon, C.B., Garcia-Quintanilla, M., Casadesus, J, Ramos-Morales, F. 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica rcsC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* 151: 579-588.
- <sup>79</sup> Kelly, W. L., and C. Georgopoulos. 1997. Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 25: 913-931.
- <sup>80</sup> Cano, D. A., M. Martinez-Moya, M. G. Pucciarelli, E. A. Groisman, J. Casadesus, and F. Garcia-del Portillo. 2001. *Salmonella enterica* serovar typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* 69: 6463-6474.
- <sup>81</sup> Tierrez, A., and F. Garcia-del Portillo, F. 2004. The *Salmonella* membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons. *J Bacteriol* 186: 7481-7489.
- <sup>82</sup> Ebel, W., G. J. Vaughn, H. K. Peters III, and J. E. Trempy. 1997. Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 6858-6861.
- <sup>83</sup> Jean Mansfield, Stéphane Genin, Shimpei Magori, Vitaly Citovsky, Malinee Sriariyanum, Paméla Ronald, Max Dow, Valérie Verdier, Steven V Bière, Marcos A Machado, Ian Toth, George Salmond, Gary D Foster. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2012 Aug;13 (6): 614-29.
- <sup>84</sup> I. K. Toth, J. M. van der Wolf, G. Saddler, E. Lojkowska, V. Hélias, M. Pirhonen, L. Tsrör (Lahkim), J. G. Elphinstone. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Pathologie végétale* (2011) 60, 385–399
- <sup>85</sup> María Antúnez-Lamas, Ezequiel Cabrera-Ordóñez, Emilia Lopez-Solanilla, Rosa Raposo, Oswaldo Trelles-Salazar, Andrés Rodríguez-Moreno, Pablo Rodríguez-Palenzuela. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology*. 2009 Feb;155( Pt 2): 434-442.
- <sup>86</sup> Sylvie Reverchon, Guillaume Nasser. *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ Microbiol Rep*. 2013 Oct; 5(5): 622-36.
- <sup>87</sup> Bowei Chen, Marwan Abdallah, Pierre Campistron, Emmanuel Moulin, Dorothée Callens, Simon Oussama Khelissa, Pascal Debreyne, Nour-Eddine Chihib, Guillaume Delaplace, Detection of biofilm formation by ultrasonic Coda Wave Interferometry, *Journal of Food Engineering*, Volume 290, February 2021, 110219
- <sup>88</sup> J. Taborek, T. Aoki, R.B. Ritter, J.W. Palen, J.G. Knudsen, Fouling: the major unresolved problem in heat transfer, (1972).
- <sup>89</sup> B. Chen, D. Callens, P. Campistron, E. Moulin,\*, P. Debreyne, G. Delaplace, Monitoring cleaning cycles of fouled ducts using ultrasonic coda wave interferometry (CWI), *Ultrasonics* 96 (2019) 253–260.

---

## Résumé

Depuis plusieurs décennies, les céramiques à base de phosphate de calcium (hydroxyapatite et phosphate tricalcique  $\beta$ ) ont été utilisées comme substitut afin de remplacer les défauts osseux en chirurgie ostéo-articulaire du fait de leur composition minérale similaire à celle de l'os et de leur très bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules ostéoblastiques. Actuellement, deux problèmes limitent l'efficacité des greffes de prothèse ou de substituts osseux en chirurgie ostéo-articulaire : la contamination au cours de l'opération par des bactéries pathogènes et le défaut d'ostéogénèse total au sein de ces substituts. Après une infection ostéo-articulaire, certains patients traités par antibiothérapie se retrouvent asymptomatiques mais peuvent malheureusement subir une récurrence de la même infection d'origine. Cette récurrence s'explique par la présence de biofilm bactérien sur les prothèses ou substituts osseux agissant dans l'organisme comme une maladie silencieuse. Mes travaux se proposent d'étudier l'efficacité des traitements par phagothérapie sur un biofilm bactérien mature de plusieurs jours fixés sur céramiques à base de phosphate de calcium dans l'objectif d'utiliser les bactériophages en curatif. Mes travaux de recherche tentent de vérifier l'efficacité d'un cocktail de bactériophages chargés dans des poudres céramiques de TCP ou HA sur un biofilm installé de 1 jour à 7 jours sur substituts osseux TCP ou HA. L'utilisation de poudres céramiques pourrait faciliter la diffusion des phages à travers la couche polysaccharidique des biofilms permettant ainsi de favoriser le rapprochement des particules virales aux enveloppes bactériennes. En effet, certains bactériophages ne diffusent pas naturellement à travers la capsule des biofilms bactériens. D'autres traitements curatifs seront nécessaires afin de compléter la phagothérapie dans le but de cibler les germes non spécifiquement reconnus par les bactériophages composants le cocktail phagique.

**Mots clés :** bactériophages, phagothérapie, biocéramiques, Hydroxyapatite,  $\beta$ -TCP.

For several decades, the calcium phosphate based ceramics (hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate) are used as substitutes for replacing bone defects in bone and joint surgery because their mineral composition is similar to bone and exhibit a very good bio-activity. Currently, two problems limit the effectiveness of prosthetic grafts or bone substitutes in joint surgery: contamination during the operation by pathogenic bacteria and the lack of complete osteogenesis within these substitutes. After a bone and joint infection, some patients treated with antibiotics are asymptomatic but may unfortunately experience a recurrence of the same original infection. This recurrence is explained by the presence of bacterial biofilm on prostheses or bone substitutes acting in the body as a silent disease. My research work proposes to study the effectiveness of phage therapy treatments on a mature bacterial biofilm of several days fixed on calcium phosphate-based ceramics with the aim of using bacteriophages as a cure. My research attempts to verify the effectiveness of a cocktail of bacteriophages loaded in ceramic powders of TCP or HA on a biofilm installed for 1 day to 7 days on bone substitutes TCP or HA. The use of ceramic powders could facilitate the diffusion of phages through the polysaccharide layer of biofilms, thus making it possible to promote the rapprochement of viral particles to bacterial envelopes. Indeed, some bacteriophages do not naturally diffuse through the capsule of bacterial biofilms. Other curative treatments will be necessary to complete phage therapy in order to target germs not specifically recognized by the bacteriophages making up the phage cocktail.

**Key words:** phages, phage therapy, bioceramics, hydroxyapatite,  $\beta$ -TCP.