

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2016

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 26 Septembre 2016 à Poitiers
par **Etienne-Marie MERIGLIER**

**Etude de la cinétique d'adaptation
d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à la ciprofloxacine et
au méropénème par mesures de bioluminescence *in vitro***

COMPOSITION DU JURY :

Président : Madame le Professeur France CAZENAVE-ROBLOT

Membres : Monsieur le Professeur Marc PACCALIN
Monsieur le Professeur Pascal ROBLOT
Madame le Docteur Blandine RAMMAERT-PALTRIE

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Nicolas GREGOIRE



Le Doyen,

Année universitaire 2016 - 2017

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (**surnombre jusqu'en 08/2019**)
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Sammy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maitres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FEIGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- FRASCA Denis, anesthésiologie – réanimation
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Maitre de conférences des universités de médecine générale

- BOUSSAGEON Rémy

Professeur associé des disciplines médicales

- ROULLET Bernard, radiothérapie

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- VALETTE Thierry

Maitres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- DHAR Pujasree, maître de langue étrangère
- ELLIOTT Margaret, contractuelle enseignante

Professeurs émérites

- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2017)
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)
- POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maitres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
I <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	5
II CIPROFLOXACINE	8
III MEROPENEME	9
V RESISTANCE ADAPTATIVE ET FITNESS COST	11
VI PHARMACOCINETIQUE /PHARMACODYNAMIE	14
VII IMAGERIE EN BIOLUMINESCENCE	16
OBJECTIF	18
MATERIELS ET METHODES	19
RESULTATS	25
I CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES	25
II RELATION CFU/ BIOLUMINESCENCE	25
III CIPROFLOXACINE	29
IV MEROPENEME	34
VI VITESSE DE CROISSANCE DES BACTERIES/ FITNESS COST	39
DISCUSSION	40
PERSPECTIVES	45
CONCLUSION	46
REFERENCES	48
ANNEXES	53
RESUME	61
ABSTRACT	62
SERMENT	63

INTRODUCTION

I *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif fréquemment rencontré en clinique humaine. Il représente la troisième cause d'infections liées aux soins et la première cause de pneumonie nosocomiale (1). Il est naturellement résistant ou peu sensible à de nombreux antibiotiques normalement actifs sur les bactéries à Gram négatif, et peut produire différents mécanismes de résistance (**Tableau 1**). Sa virulence et ses nombreuses résistances en font un germe responsable d'infections graves avec une mortalité et une morbidité importantes (2). La surveillance des infections à *Pseudomonas aeruginosa* a montré un niveau inquiétant de résistance aux antibiotiques évoluant vers un phénotype de résistance multiple (BMR). Les *Pseudomonas* multi résistants représentent environ 10% de l'ensemble des bactéries multi résistantes et peuvent atteindre 20% dans les unités de soins intensifs (3).

Sa résistance intrinsèque est caractérisée par la très faible perméabilité de sa membrane externe (10 à 100 fois moins que chez *E.Coli*) (4) associée à la présence d'enzymes capables d'inactiver les antibiotiques (céphalosporinases inductible AmpC, oxacillinase, β -lactamase à spectre élargi, carbapénèmases, métallob- β -lactamases ou enzymes modifiant les aminosides) et l'expression de mécanismes d'efflux actifs. En limitant la vitesse de pénétration intracellulaire des antibiotiques, cette membrane favorise l'action d'enzymes hydrolytiques ou modificatrices, ou de systèmes d'efflux. *Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire pas moins de douze systèmes d'efflux actifs différents appartenant à la famille RND (Resistance Nodulation cell Division) (5). Toutefois, seuls quatre de ces systèmes appelés Mex (Multiple efflux) contribuent réellement à la résistance naturelle aux antibiotiques (**Tableau 2**). Les autres systèmes RND (autres Mex, CzcCBA ...) sont moins fréquents et leur rôle dans la résistance de souches cliniques aux antibiotiques reste mal décrit. Les niveaux de sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux β -lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, aux sulfamides, aux macrolides, au triméthoprime et au chloramphénicol dépendent en grande partie de la production

constitutive d'une pompe dénommée MexAB-OprM (association des protéines MexA + MexB + OprM) (6) et de la production inductible (déclenchée par la présence d'antibiotique) d'une autre pompe appelée MexXY/OprM (7). Ces systèmes fonctionnent grâce à l'énergie de la membrane cytoplasmique en couplant l'efflux de leurs substrats à l'entrée de protons. Cette résistance par efflux est associée à une adaptation rapide en réponse aux antibactériens présents dans l'environnement et pose d'importants problèmes dans le traitement des infections.

Par ailleurs, la plupart des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* détectés lors d'infections sont capables de produire des facteurs invasifs impliqués dans l'attachement, la colonisation et l'invasion des surfaces cellulaires (biofilms), constituant une barrière supplémentaire dans l'accessibilité de l'antibactérien à la cible, et favorise la colonisation et la dissémination de souches résistantes sur divers supports médicaux (greffes, cathéters, etc...) (8, 9).

La résistance du *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques résulte donc de la superposition complexe de plusieurs processus qui tendent, soit à inactiver les antibiotiques, soit à les empêcher d'atteindre leur cible intracellulaire.

Le *Pseudomonas aeruginosa* semble être le meilleur modèle permettant de corréler le bon usage des antibiotiques et l'évolution de la multi résistance, du fait de son adaptation rapide à la pression de sélection antibiotique et son réservoir essentiellement environnemental.

Tableau 1. Antibiotiques actifs et résistance naturelle chez *Pseudomonas aeruginosa*. Liste recommandée par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie en 2012.

Résistance naturelle	Antibiotiques habituellement actifs	
	Liste standard	Liste complémentaire
Pénicillines G, A, M Céphalosporines de 1ère et 2ème génération, oxymino céphalosporines (céfotaxime, ceftriaxone), céphalosporines orales à large spectre Ertapénème Cyclines incluant la tigécycline Macrolides Quinolones anciennes Kanamycine Rifampicine Chloramphénicol Triméthoprim Cotrimoxazole Glycopeptide Acide fusidique	Ticarcilline Pipéracilline Ceftazidime Aztréonam Imipénème ou méropénème Ciprofloxacine Gentamicine, Tobramycine, Amikacine Colistine	Ticarcilline/acide clavulanique Pipéracilline/tazobactam Céfépime Doripénème Lévofloxacine Nétilmicine Sulfamides Fosfomycine/Rifampicine

Tableau 2. Principaux antibiotiques touchés par la production des pompes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Système d'efflux	Antibiotiques touchés (sensibilité diminuée)
MexAB-OprM	β -lactamines, fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphenicol, tétracycline
MexCD-OprJ	Céfépime, cefpirome, fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracycline, érythromycine
MexEF-OprN	Fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracycline
MexXY-OprM	Aminosides, céfépime, fluoroquinolones, tétracycline, érythromycine

II CIPROFLOXACINE

La ciprofloxacine est une fluoroquinolone fréquemment utilisée dans le traitement des infections causées par le *Pseudomonas aeruginosa*. La résistance à la ciprofloxacine chez les souches hospitalières de *Pseudomonas aeruginosa* responsables de bactériémies a atteint 22 à 35% en France en 2010 selon le répertoire ONERBA et plus de 30% pour tous les types d'infections confondues (10). Ces données semblent stables ces dernières années.

Les fluoroquinolones entraînent une inhibition rapide de la synthèse de l'ADN aboutissant à la mort bactérienne. Leurs cibles intracytoplasmiques sont des enzymes impliquées dans la régulation du surenroulement de l'hélice d'ADN sur elle-même. Ces enzymes, les topo-isomérases, sont essentielles au compactage de l'ADN, et au bon déroulement de la réplication et de la transcription. L'ADN gyrase (topo-isomérase II), formée de deux sous-unités A et deux sous-unités B, et l'ADN topo-isomérase IV sont les cibles privilégiées. Ces deux protéines peuvent devenir insensibles à l'action des fluoroquinolones lorsque des mutations introduisent des substitutions d'acides aminés dans les régions où se fixent les antibiotiques (Quinolone Resistance Determining Regions). Des altérations de la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase sont fréquentes (11, 12). Les altérations de la sous-unité ParC de la topoisomérase IV apparaissent secondairement chez des mutants de type GyrA ; elles contribuent à amplifier la résistance jusqu'à des niveaux très élevés. La résistance chromosomique de *Pseudomonas aeruginosa* aux fluoroquinolones est similaire à celles des entérobactéries : mutations dans les gènes de structure de l'ADN gyrase et de l'ADN topoisomérase IV (12) ; mutations conduisant à un défaut d'accumulation par atteinte des porines et surtout par un efflux actif augmenté via quatre systèmes d'efflux Mex : MexAB OprM, MexXY OprM et plus rarement MexCD OprJ, MexEF OprN (13). Le système MexAB-OprM est exprimé de manière constitutive, alors que l'expression des autres pompes dépend de régulateurs génétiques et de la présence d'antibiotiques (14). Les mutations touchant les topo-isomérases sont responsables des plus hauts niveaux de résistance. Les autres mécanismes de résistance ont pour effet direct une résistance de bas niveau mais facilitent l'apparition des résistances de haut niveau.

Les résistances acquises du *Pseudomonas aeruginosa* aux fluoroquinolones apparaissent sous l'effet de mutations spontanées chromosomiques (15). Ces mutations surviennent à des

fréquences allant de 10^{-5} , pour les plus fréquentes, à 10^{-9} , pour les plus rares, et confèrent une résistance dite « stable » qui, selon le mécanisme en cause, peut concerner d'autres antibiotiques à des degrés divers. La mise en présence de l'antibiotique sélectionne les bactéries mutées en détruisant les autres bactéries restées sensibles à l'antibiotique.

Etant donné l'importance des systèmes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa*, la part prise par l'efflux dans la résistance acquise aux fluoroquinolones est nettement plus forte que chez les entérobactéries. A la différence des autres bactéries, un seul mécanisme de résistance chez le *Pseudomonas aeruginosa* est suffisant pour conférer une résistance clinique.

III MEROPENEME

Les caractéristiques du *Pseudomonas aeruginosa* expliquent la résistance naturelle de cette espèce à des β -lactamines habituellement actives sur les bacilles à Gram négatif comme les aminopénicillines, les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, mais aussi de 3^{ème} génération (céfotaxime ou ceftriaxone) et même certains carbapénèmes (ertapénème). *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement sensible aux β -lactamines suivantes : carboxypénicillines (carbénicilline et ticarcilline), uréidopénicillines, céphalosporines anti-*Pseudomonas* (cefsulodine, cefopérazone, céfépime, cefpirome et surtout ceftazidime), monobactames (aztréonam) et carbapénèmes à l'exception de l'ertapénème (imipénème, méropénème, doripénème).

L'émergence de résistance du *Pseudomonas aeruginosa* aux carbapénèmes est croissant (16) notamment par l'utilisation de plus en plus fréquente de cette classe d'antibiotique (17). Le méropénème est un antibiotique de la famille des bêtalactamines appartenant à la classe des carbapénèmes. L'imipénème était auparavant considéré comme la carbapénème de choix tandis que l'utilisation de méropénème était exceptionnelle. Cependant, devant la progression croissante de la résistance à l'imipénème, l'utilisation de méropénème est devenue courante. Plusieurs études ont démontré une activité *in vitro* supérieure du méropénème (18, 19). En clinique, le méropénème a prouvé une non-infériorité par rapport aux autres carbapénèmes dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa* (20).

Chez le *Pseudomonas aeruginosa*, comme chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes est majoritairement due à des associations de mécanismes de résistance, associant fréquemment la production de β -lactamase à une altération des porines. La résistance est généralement croisée entre les molécules, mais il convient de le vérifier au cas par cas car des souches résistantes à une molécule peuvent s'avérer sensibles à une autre en fonction des mécanismes de résistance en cause (21).

Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes est la perte de la porine OprD qui est la voie d'entrée principale des carbapénèmes dans la bactérie (22). Le défaut d'expression de cette porine, consécutif à une mutation des gènes régulateurs codant la protéine D2, entraîne une résistance sélective aux carbapénèmes (23). L'imipénème est touché à haut niveau car il s'agit de son unique voie de pénétration. Le méropénème et le doripénème sont généralement moins touchés car ils possèdent des voies alternatives. Ce mécanisme de résistance est stable depuis plusieurs années en France et est présent chez 15 à 20% des souches.

L'hyperexpression des systèmes d'efflux représente une composante importante dans la résistance intrinsèque de *Pseudomonas aeruginosa*. La suractivation de la pompe MexAB-OprM confère une diminution modérée de la sensibilité au méropénème. L'imipénème n'est pas touché par ce mécanisme, l'imipénème n'étant pas un substrat de la pompe MexB (24).

Pseudomonas aeruginosa exprime naturellement une céphalosporinase inductible codée par le gène chromosomique AmpC. Chez les souches sauvages, AmpC est réprimé de façon complexe par les produits des gènes qui lui sont associés, AmpR et AmpD, et n'est que faiblement exprimé (25). Son expression peut être fortement induite par les β -lactamines. Cette hyperexpression induite et réversible confère une résistance à l'ensemble des pénicillines et des céphalosporines anti-*Pseudomonas*. Seuls les carbapénèmes restent actifs. La stabilité du méropénème face à des β -lactamases de type AmpC est quasiment absolue. La résistance aux carbapénèmes ne surviendra que si l'hyperproduction d'AmpC est associée à au moins un autre mécanisme de résistance (26).

Pseudomonas aeruginosa présente également la particularité d'avoir la possibilité d'acquérir une importante diversité de β -lactamases (27). Ces enzymes sont presque exclusivement codées par des plasmides. Les souches productrices de carbapénémases diffusent actuellement de façon alarmante dans toutes les régions du monde. Ces carbapénémases appartiennent majoritairement

aux classe B de Ambler. A l'exception de l'aztréonam, l'ensemble des β -lactamines, dont les carbapénèmes, sont hydrolysées par ces métallo- β -lactamase, dont VIM et IMP sont les types les plus disséminés (10, 28). La prévalence de ces souches productrices de métallo- β -lactamines reste faible en France (10). Par ailleurs, de nombreuses β -lactamases à spectre élargi (BLSE) de classe A ont été décrites chez le *Pseudomonas aeruginosa* mais elles n'hydrolysent pas les carbapénèmes, qui restent donc la seule classe d'antibiotique active.

Ainsi, la présence de deux mutations est nécessaire pour induire une résistance clinique au méropénème qui résulterait de la perte des porines spécifiques et de la suractivation d'une pompe d'efflux. Le taux de chaque mutation est estimé à environ 10^{-7} (29), soit une survenue possible de résistance au méropénème de 10^{-14} . Pour l'imipénème, une seule mutation sur la porine OprD suffira pour entraîner une résistance. Le méropénème a donc un faible potentiel de stimuler le développement de résistance (30).

V RESISTANCE ADAPTATIVE ET FITNESS COST

La plupart des mécanismes de résistance correspondent à des résistances intrinsèques ou acquises et se caractérisent par un phénotype irréversible et indépendant de la présence d'antibiotiques. A la différence, le phénomène de résistance adaptative est défini par l'induction d'une résistance à un ou plusieurs agents antimicrobiens en réponse à la présence d'un signal spécifique (**Tableau 3**) (31). Cette résistance adaptative est désormais connue depuis plusieurs décennies. Les observations initiales montraient comment l'incubation d'un microorganisme soumis à des concentrations d'antibiotiques inférieures à la CMI le rendait plus résistant. En plus de l'antibiotique, certains paramètres peuvent faciliter cette adaptation : pH, anaérobiose, présence de certains cations, etc... De par sa nature transitoire, ce type de résistance est difficile à détecter et n'est pas pris en compte dans de nombreuses situations et peut aboutir à des échecs thérapeutiques. Il est maintenant démontré que ce phénomène joue un rôle significatif dans les différences observées des résistances aux antibiotiques observées en comparant les études in vitro et in vivo. Les mécanismes adaptatifs commencent à être compris. Il s'agit de mécanismes complexes incluant des systèmes de régulation. Dans ce sens, l'utilisation de transcriptome est

très utile dans l'identification des gènes modulés en présence d'un antibiotique spécifique. Plusieurs de ces mécanismes ont déjà été identifiés (**Figure 1**).

Par ailleurs, l'acquisition des mécanismes de résistance d'un antibiotique est associée pour la bactérie à un coût appelé « fitness cost » se manifestant classiquement par une réduction de la vitesse de croissance bactérienne (32). L'importance de ce coût est un paramètre biologique influençant l'acquisition de résistance des bactéries, la stabilité de la résistance et la possibilité de restaurer la sensibilité après éviction de l'antibiotique. La résistance peut donc décroître en l'absence de pression de sélection exercée par l'antibiotique. Le temps requis pour réduire la résistance bactérienne est inversement proportionnel au coût de la résistance (33).

Tableau 3. Comparaison des trois principaux types de résistance.

Type de résistance	Intrinsèque	Acquise	Adaptative
Acquisition	Non-acquise	Mutation	Modification de l'expression du gène cible par la présence d'un antibiotique ou facteurs environnementaux
Caractéristiques	Héritable Stable Irréversible Indépendant de l'environnement	Héritable Stable Irréversible Indépendant de l'environnement	Non-héritable Transitoire Généralement réversible après réduction du signal inducteur Dépendant de l'environnement

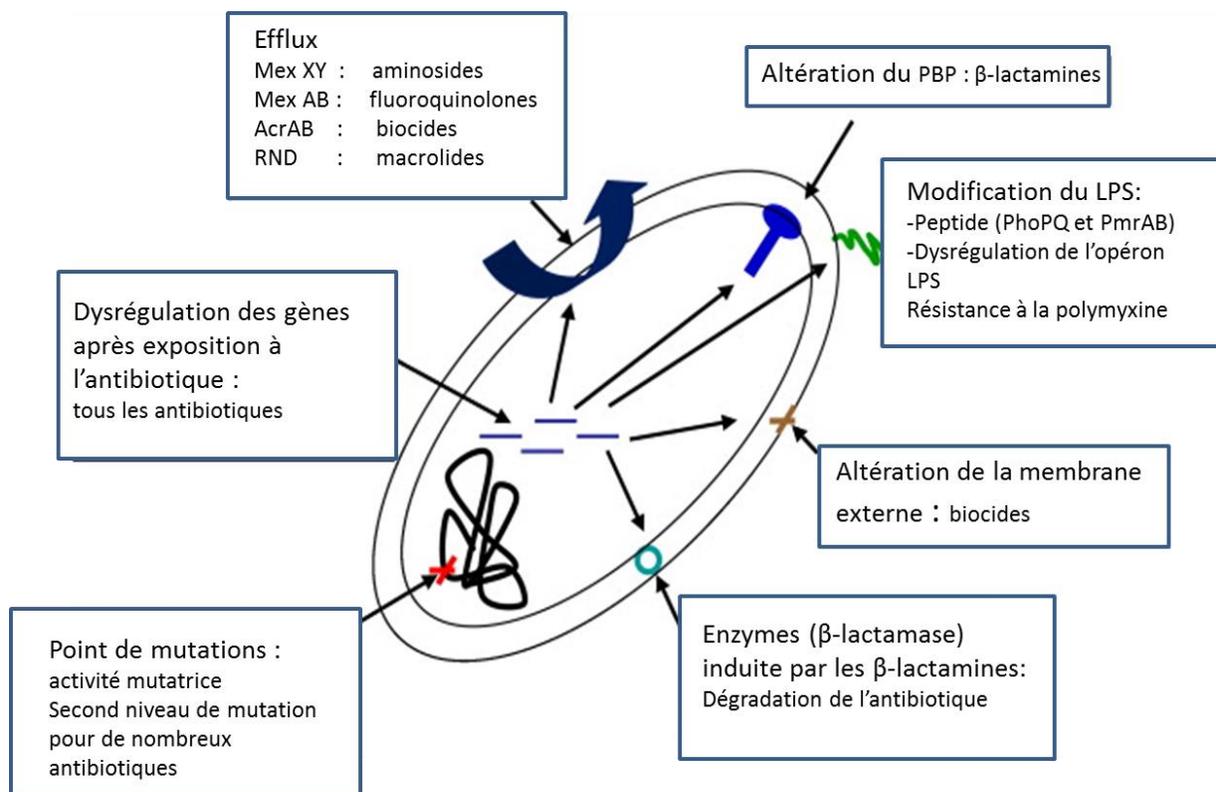


Figure 1. Représentation schématique de mécanismes connus de résistances adaptatives (31).

VI PHARMACOCINETIQUE /PHARMACODYNAMIE

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la valeur de référence pour caractériser l'activité bactéricide *in vitro* des antibiotiques contre une bactérie. Il s'agit de la plus petite concentration en antibiotique pour laquelle la croissance bactérienne n'est toujours pas visible après 18 heures d'incubation à partir d'un inoculum initial standard d'environ 5.10^6 CFU.mL⁻¹. Une des principales limites de la CMI réside dans le fait qu'il s'agisse d'un paramètre statique de mesure à un temps donné et pour une concentration constante d'antibiotique alors que la concentration et l'effet de l'antibiotique varient au cours du temps dans l'organisme.

La pharmacodynamie (PD) correspond à l'étude des effets de l'antibiotique sur les bactéries tandis que la pharmacocinétique (PK) étudie l'évolution des concentrations d'antibiotiques au cours du temps. Les index de PK/PD répondent aux problèmes posés par la CMI en tendant à définir des règles d'utilisation optimale d'un antibiotique pour une bactérie donnée en un site d'infection donné, en étudiant la relation entre l'évolution des concentrations et des effets en fonction du temps (34, 35). Une approche par modélisation PK/PD *in vitro* pour évaluer l'effet de l'antibiotique a été décrite par Jusko et al. (36). Pour un agent antimicrobien donné, les effets pharmacodynamiques *in vitro* peuvent être mesurés par le comptage des colonies bactériennes dans le temps. Cette approche se réalise à partir de courbes de bactéricidie explorant le comptage bactérien sous plusieurs valeurs de concentrations d'antibiotiques constantes dans le temps.

En l'absence d'antibiotique, la croissance bactérienne est exponentielle jusqu'à atteindre un nombre maximum stationnaire de bactéries. Cette croissance bactérienne a été décrite selon une équation développée par Mouton et al. (10) :

$$\frac{dN}{dt} = k_g * \left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right) * N \quad (a)$$

où N est le nombre de bactéries viables, K_g la constante de croissance bactérienne et N_{max} le nombre maximum de bactéries obtenu en culture *in vitro*.

Pour décrire l'activité bactéricide d'un antibiotique, le modèle le plus utilisé reliant la concentration de l'antibiotique et l'effet antibactérien est une équation de Hill :

$$\frac{dN}{dt} = k_g * \left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right) * N - \left(\frac{C^\gamma \cdot E_{max}}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}\right) * N \quad (b)$$

Où C est la concentration de l'antibiotique, E_{max} la constante d'élimination maximale des bactéries, EC_{50} la concentration de l'antibiotique pour laquelle la vitesse d'élimination de la bactérie est à 50% de la vitesse maximale d'élimination et γ la constante de Hill.

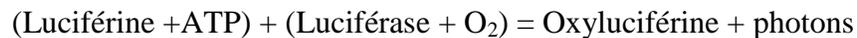
Malgré la décroissance bactérienne initiale après exposition d'une bactérie à une concentration constante en antibiotique, il est fréquent d'observer une nouvelle croissance bactérienne par la suite. Ce phénomène peut s'expliquer par l'acquisition de mécanismes de résistance de la bactérie à l'antibiotique. Deux principaux types de modèles ont été développés pour décrire cette repousse bactérienne. L'un des deux consiste à décrire une population hétérogène composée de sous-populations ayant des sensibilités différentes à l'antibiotique (37). Le second décrit une population homogène dont la sensibilité varie en fonction du temps et de la concentration de l'antibiotique (38). Classiquement, le premier modèle est utilisé pour décrire des résistances stables consécutives à des mutations spontanées et indépendantes de l'antibiotique tandis que le second décrit l'adaptation transitoire de la bactérie en fonction du temps et de la concentration de l'antibiotique. Néanmoins, ces deux modèles tendent à se comporter de façon similaire d'un point de vue statistique et d'ajustement des données. Le choix du modèle doit donc se faire en fonction du mécanisme de résistance impliqué (39).

Gregoire et al. ont décrit un modèle semi-mécanistique PK-PD pour décrire l'effet de la ciprofloxacine sur le *Pseudomonas aeruginosa in vitro* (40). Des courbes de bactéricidie ont été réalisées à partir d'un inoculum bactérien à $5 \cdot 10^6$ CFU/mL et de différentes concentrations constantes de ciprofloxacine. Ces expériences ont permis d'observer une décroissance bactérienne initiale suivie d'une repousse, attestant de la perte de sensibilité de la bactérie faisant intervenir des mécanismes d'efflux, en particulier de l'expression de la pompe MexEF OprN. Un modèle PK-PD de type adaptatif a été utilisé pour analyser ces données mais la réversibilité de cette adaptation n'a pas été étudiée.

VII IMAGERIE EN BIOLUMINESCENCE

La bioluminescence correspond à la production et l'émission de lumière froide par certains êtres vivants, liée à une fonction organique résultant d'une réaction chimique au cours de laquelle l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse, souvent sans aucune production de chaleur. Ce phénomène existe dans presque tout le règne vivant : bactéries, champignons, vers, mollusques, insectes...

L'émission de lumière se produit lors d'une réaction chimique qui nécessite au moins deux acteurs : la luciférine et la luciférase, la luciférine étant le substrat de la réaction, et la luciférase l'enzyme qui la catalyse. La réaction catalysée nécessite de l'ATP et de l'oxygène. Cette réaction se fait en deux étapes ou plus avec dans certains cas production de pyrophosphate, ainsi que d'autres éléments. La première réaction, catalysée par la luciférase, est l'activation de la luciférine par l'ATP en luciféryl adénylate liée à l'enzyme. La luciféryl adénylate formée est ensuite oxydée par l'oxygène et donne l'oxyluciférine. Cette molécule, dans un état électronique excité, retourne à l'état stable avec une émission de lumière et formation de dioxyde de carbone et d'AMP.



La production de lumière a lieu durant la phase d'oxydation de la luciférine. Le signal lumineux est décroissant à mesure de la consommation progressive du substrat (luciférine) et de l'accumulation correspondante du produit (oxyluciférine).

La bioluminescence est utilisée en recherche pour faire de l'imagerie non invasive (41). Ce phénomène est utilisé dans plusieurs domaines tels que la cancérologie dans le suivi de la prolifération tumorale (42) mais aussi en infectiologie (suivie de la prolifération bactérienne) (43) et en thérapie génique et cellulaire (44).

En infectiologie, elle permet un monitoring en temps réel du métabolisme bactérien pour mesurer l'effet bactéricide de l'antibiotique. Elle est de plus en plus utilisée pour des modèles infectieux *in vivo* du petit animal (45, 46). Son utilisation sur des modèles *in vitro* reste novatrice. Elle a l'avantage de donner une mesure instantanée à la différence d'un monitoring par mesure des CFU.

Cette technique requiert un micro-organisme exprimant un opéron *lux* permettant une émission lumineuse proportionnelle à l'activité de la luciférase bactérienne. L'opéron *luxCDABE* code pour cinq protéines différentes. Les protéines *luxA* et *luxB* sont des sous-unités de la luciférase tandis que *luxC*, D et E sont respectivement une aldéhyde transférase, une réductase et une synthétase. Les étapes suivantes font appel à l'insertion de ce plasmide dans l'ADN des cellules, le noyau des bactéries ou des vecteurs dans le cadre de la thérapie génique ; l'éventuelle injection de ces cellules, bactéries ou vecteurs à des animaux et l'acquisition du signal avec une caméra CDD (Charge Coupled Device).

Une caméra CCD est un détecteur photosensible composé d'un grand nombre de cellules de détections, disposées en carré et appelées pixels. Les appareils de mesure de bioluminescence sont constitués d'une enceinte totalement hermétique à la lumière dans laquelle est placée une caméra CCD (**Figure 2**). Lors d'une acquisition, chaque pixel va produire des électrons lorsqu'il va recevoir des photons émis par la réaction de bioluminescence. Le nombre d'électrons produits par un pixel est proportionnel au nombre de photons reçus, avec cependant une limite qui est la saturation quand un pixel reçoit trop de photons. Les pixels reçoivent des photons augmentant leur charge. La charge de chaque pixel est ensuite amplifiée, puis passée dans un convertisseur analogique-numérique qui code sa valeur sur 8, 12, 14 ou 16 bits. Ce signal est ensuite envoyé à l'ordinateur qui va reconstruire l'image. A la fin de l'acquisition, le logiciel compte le nombre de charge de chaque pixel et fournit l'information à l'utilisateur sous forme d'un code couleur. Le signal émis étant particulièrement faible, des caméras CCD ultra-sensibles à bas bruit sont nécessaires pour l'acquisition. Ces caméras sont refroidies entre -70 et -90°C afin de diminuer le bruit de fond thermique et gagner ainsi en sensibilité. Afin d'obtenir une meilleure sensibilité de la caméra CDD, une technique de binning est utilisée, visant à créer artificiellement un superpixel en regroupant plusieurs pixels adjacents et en sommant leur charge.

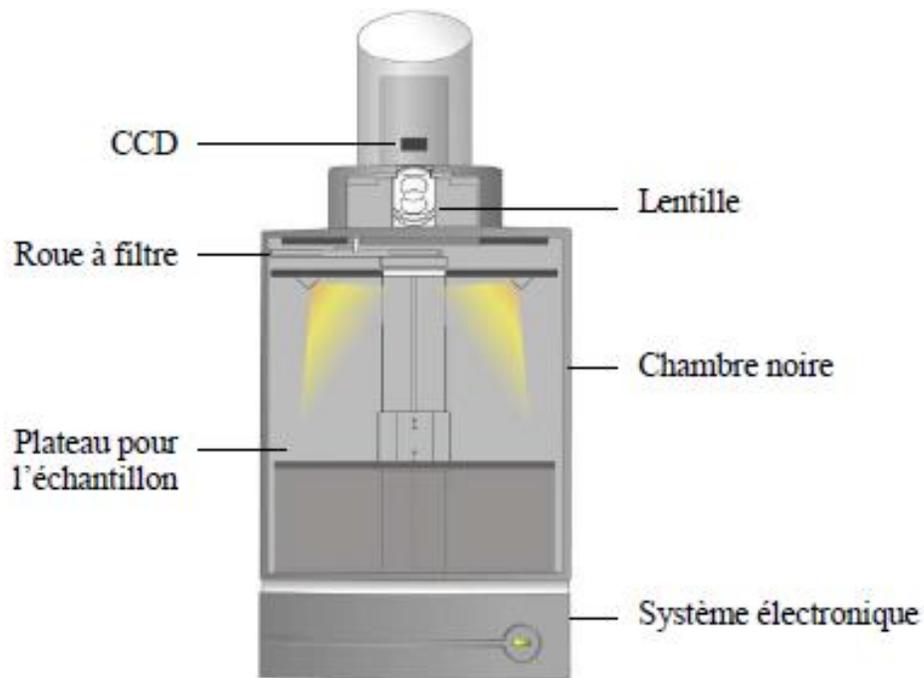


Figure 2. Dispositif d'acquisition de bioluminescence IVIS Lumina® (Caliper)

OBJECTIF

L'objectif de cette étude est d'analyser la cinétique d'apparition de résistance au cours du temps d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de différentes concentrations de ciprofloxacine et de méropénème par mesure de bioluminescence et évaluer la restauration de la sensibilité de la bactérie en l'absence d'antibiotique. L'objectif secondaire est de déterminer les mécanismes de résistances impliquées dans la résistance de la bactérie.

MATERIELS ET METHODES

Souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 rendue bioluminescente par insertion de l'opéron luxCDABE sur le site chromosomique *attTn7*, fournie par le service de bactériologie du CHU de Besançon, France (CNRS GDR3171) a été utilisée. La souche bactérienne a été mise en culture sur un milieu Mueller-Hinton ajusté en cations (calcium 20-25mg/L et magnésium 10-12,5mg/L) et incubée à 37°C pendant 18-24h.

Agents antimicrobiens

La ciprofloxacine (Ciprofloxacine poudre, pureté 99.9%, Fluka) et le méropénème (Meropénème poudre, flacon 1g/20mL, pureté 100%, Venus Pharma) provenaient des manufacturiers. Chaque antibiotique a été utilisé isolément.

Détermination de la CMI

Les mesures des CMI de la ciprofloxacine et du méropénème ont été déterminées par E-test sur milieu gélosé selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (référence à intégrer, CA-SFM, 2016). L'E-test Biomérieux ATCC 27853TM a été utilisé pour la ciprofloxacine et l'E-test Meropenem M.I.C.Evaluator Strips pour le méropénème. La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après 18 h d'incubation à 37°C.

Bioluminescence par IVIS® Lumina XR (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)

La bioluminescence a été mesurée par IVIS® Lumina XR (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) avec un temps d'acquisition de 5 minutes. Pour l'analyse des images, une région d'intérêt (ROI) de surface constante a été dessinée autour des tubes. La bioluminescence est exprimée en radiance/mL (photon/sec/cm²/steradian/mL).

Relation entre CFU et bioluminescence

Afin de déterminer la corrélation entre la bioluminescence et le nombre de bactéries, un dénombrement des colonies bactériennes sur milieu solide non-sélectif a été réalisé en même temps que les mesures par bioluminescence. Il s'agit de compter les colonies à partir d'une gamme géométrique de raison 10 (10^0 - 10^1 - 10^2 - ...) de l'inoculum ensemencé pendant 18 à 24h sur une boîte de pétri gélosée. Les comptages de CFU ont été effectués concomitamment à des mesures de bioluminescence dans différentes conditions :

- 1) Une gamme de différents inocula bactériens préparés par lecteur de densité optique et diluée selon une gamme géométrique de raison 10 allant de 10^2 à 10^9 CFU/mL avec mesure au temps 0.
- 2) Préparation d'un inoculum bactérien à 5.10^6 CFU/mL avec mesures au cours du temps en l'absence d'antibiotique.
- 3) Préparation d'un inoculum bactérien à 5.10^6 CFU/mL en présence de ciprofloxacine à la concentration de 0.25mg/L avec mesures au cours du temps.

La relation entre la bioluminescence et le nombre de CFU a été analysée à partir d'un modèle statistique linéaire à l'aide du logiciel R. Les données de bioluminescence et de CFU ont été logs transformés pour cette analyse. Les mesures de bioluminescence et les comptages de CFU ont été considérés comme des variables continues tandis que l'effet de la présence de l'antibiotique et du temps dans cette relation ont été considérés comme des variables discrètes (présence/absence d'antibiotique, mesure à T_0 / $T \neq 0$). La différence était considérée comme significative quand $p < 0.05$.

Adaptation de la bactérie et étude de la réversibilité (Figure 3)

L'inoculum de *Pseudomonas aeruginosa* a été préparé à partir d'un inoculum bactérien en culture sur milieu de Mueller-Hinton pendant 18-24h et ajusté à une concentration de 1.10^7 CFU/mL.

Des gammes de ciprofloxacine et de méropénème ont été réalisées dans du bouillon de Mueller-Hinton par dilutions géométriques. Quatre millilitres d'inoculum bactérien à 1.10^7 CFU/mL ont été mis en contact avec 4mL de chaque concentration d'antibiotiques pour obtenir une concentration finale bactérienne à 5.10^6 CFU/mL dans des tubes en verre de 10mL. Les tubes ont été incubés pendant 32h à 37°C. Aux temps 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 28 et 32h, 2mL de chaque solution pour la ciprofloxacine et le méropénème ont été mis dans des tubes en verre de 5mL pour être analysées par bioluminescence. Une fois analysée, les solutions ont été reversées dans les tubes en verre de 10mL d'origine et remises en incubation à 37°C.

Le protocole expérimental a compris la réalisation de deux courbes de bactéricidie consécutives :

- Une 1^{ère} courbe de bactéricidie de 0 à 32h
- Une 2^{ème} courbe de bactéricidie de 0 à 32h suivant ou non une période de culture bactérienne en l'absence de ciprofloxacine ou de méropénème (périodes de wash-out de 18h, 42 et 66h)

1) 1^{ère} courbe de bactéricidie (0-32h)

Des concentrations de ciprofloxacine de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64 fois la CMI et des concentrations de méropénème de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 16 fois la CMI ont été testées. Cette première étape avait pour but de montrer la perte de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique en fonction du temps et de la concentration de l'antibiotique.

Chaque expérience a été réalisée au moins en triplicata.

2) 2^{ème} courbe de bactéricidie (0-32h) sans et avec périodes de wash-out de 18, 42 et 66h

Les bactéries ayant été exposées pendant 32h à des concentrations de ciprofloxacine égales à la CMI et des concentrations de méropénème de 2 fois la CMI ont été récupérées et lavées. Pour effectuer le lavage, la solution a été centrifugée à 5000tours/min ($4920m.s^{-2}$) à 20°C pendant 10 minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot bactérien a été remis en suspension dans 5mL de sérum physiologique puis centrifugé de nouveau à 5000 tours/min pendant 10minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot bactérien a été remis en suspension dans 2mL de sérum physiologique. La concentration en bactéries de cette solution a été mesurée par lecteur de densité optique puis adaptée pour obtenir un inoculum bactérien à 1.10^7 CFU/mL dans du bouillon de Muller-Hinton. Des courbes de bactéricidie ont été réalisées immédiatement après avoir récupéré

l'inoculum bactérien (sans wash-out) et après des périodes de culture sur milieu solide sans antibiotique de 18, 42 et 66h (avec wash-out). L'objectif des wash-out était d'analyser la restauration ou non de la sensibilité de la bactérie dans le temps après avoir laissé la bactérie sans contact avec l'antibiotique pendant 18, 42 et 66h.

Des concentrations de ciprofloxacine de 1, 2, 4, 8 et 16, 32 et 64 fois la CMI initiale (soit 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 16mg/L) et des concentrations de méropénème de 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64 fois la CMI (soit 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 et 32mg/L) ont été testées. Chaque expérience a été réalisée au minimum en triplicata.

1^{ère} courbe de bactéricidie

2^{ème} courbes de bactéricidie

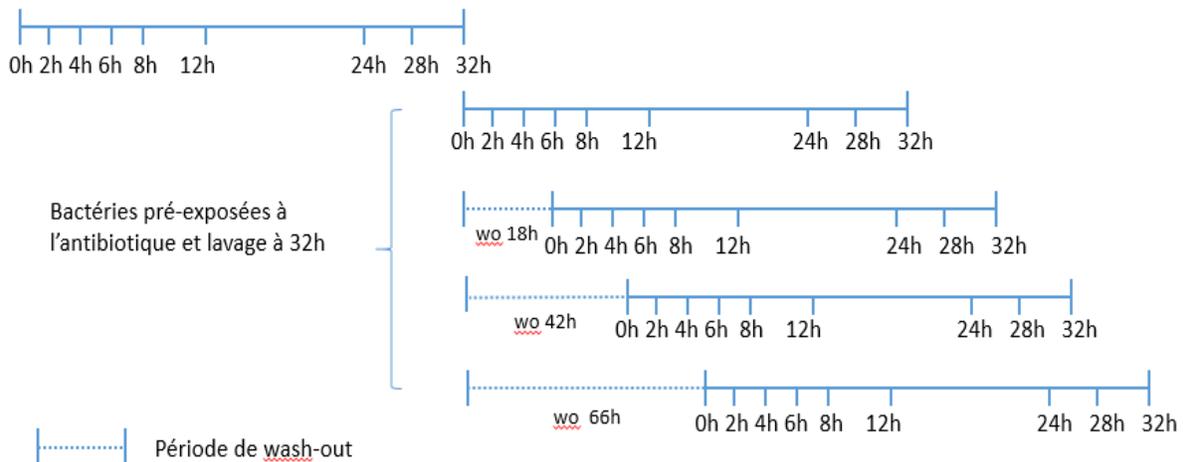


Figure 3. Protocole expérimental avec périodes de wash-out et heures de mesures de bioluminescence.

Détection des mécanismes de résistances

Les recherches de mutations ont été réalisées au centre national de référence (CNR) de résistance aux antibiotiques de Besançon.

a- Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Une culture d'une nuit a été diluée au $1/100$ dans un bouillon de MHC. L'ensemble a été incubé à 37°C sous une agitation constante jusqu'à une $DO_{600}=0,8$. L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du kit *Qiagen Rneasy® plus* (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Les ARNs obtenus ont été traités par une DNase (Roche Diagnostics) pendant 15 min afin d'éliminer toute trace de contamination par l'ADN génomique.

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN total à l'aide des réactifs de transcription inverse (*ImProm-IITm reaction buffer*, *ImProm-IITm reverse transcriptase*, $MgCl_2$, Promega) et d'hexamères aléatoires utilisés comme amorces (*random primers*, Promega). Après une incubation de 50 min à 42°C, l'enzyme a été inactivée par 15 min de chauffage à 70°C. Un contrôle sans transcription inverse a également été réalisé sur chaque extrait, nous permettant ainsi de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique. Les ADNc obtenus ont pu être conservés à -20°C.

b- Amplification des ADNc

Les réactions d'amplification et de quantification de l'expression génique ont été réalisées dans l'appareil Rotor-Gene RG6000 (Qiagen). La réaction d'amplification en temps réel a été effectuée avec 3 µL d'ADNc, 7,5 µL de *fast SYBR Green master mix* (*Rotor-Gene SYBR green PCR kit*, Qiagen) et 1,5 mmoles de chaque amorce. Le volume total du mélange réactionnel a été ajusté à 15 µL avec de l'eau dépourvue d'ARNase (Promega). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 95°C pendant 5 min suivi de 40 cycles à 95°C (5 s), 60°C (10 s) et 72°C (20 s). L'acquisition des informations s'est effectuée à chaque cycle au cours de la phase d'hybridation. Par ailleurs, chaque série a comporté un témoin sans transcription inverse, un contrôle négatif et une gamme de dilution ($1/10$, $1/50$, $1/100$, $1/500$ et $1/1000$) avec la souche de référence PAO1.

c- Extraction d'ADN génomique et séquençage

L'extraction de l'ADN génomique bactérien a été réalisée à l'aide du kit *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen[®], Courteboeuf, France). Cette méthode est basée sur la purification de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions après lyse des bactéries. Le séquençage de l'ADN a été effectué par la plate-forme de Biologie moléculaire par la méthode des didéoxynucléotides de Sanger, à l'aide du séquenceur automatique RUO Applied Biosystems 3500 (Life TechnologiesTM).

Vitesse de croissance de la souche sauvage PAO1 et des bactéries devenues résistantes

La vitesse de croissance des souches sauvages initiales et devenues résistantes de haut niveau à la ciprofloxacine (CMI = 12mg/L) et au méropénème (CMI = 12mg/L) (bactéries récupérées après la deuxième courbe de bactéricidie) ont été comparées par comptage des CFU et par bioluminescence. Un inoculum de 1Mc Farland dilué au 1/60^{ème} pour obtenir une concentration de 10⁷ CFU/mL de chaque souche a été mis en culture sur milieu agar Mueller-Hinton. Les milieux ont été incubés à 37°C. Des prélèvements pour réaliser des mesures de comptage se sont faits à différents temps : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h et 24h selon une gamme de dilution géométrique sur milieu agar et 2mL de solution dans des tubes en verre de 5mL pour les mesures par bioluminescence. L'expérience a été reproduite quatre fois.

RESULTATS

I CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

Les CMI de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 à la ciprofloxacine étaient de 0.25mg/L et de 0.5mg/L pour le méropénème.

II RELATION CFU/ BIOLUMINESCENCE

La relation entre la bioluminescence (radiances/ml) et le nombre de CFU varie selon les conditions :

1) Il existe une relation puissance entre la bioluminescence (bioluminescence en radiance/ml) et le nombre de CFU (en CFU/mL) au temps 0 dans le range 10^3 à 10^6 rad/mL (**Figure 4**) décrit par l'équation :

$$\text{Bioluminescence} = 0.0974 * \text{CFU/mL}^{0.7614} \quad (c)$$
$$R^2 = 97\%$$

En dessous de 10^5 CFU/mL, ce qui correspond à environ 10^3 rad/mL, cette corrélation n'est plus applicable et les valeurs rejoignent celle d'un témoin sans bactéries. De par ces résultats, la limite de quantification en bioluminescence a été fixée à 10^3 rad/mL. Cette expérience a été reproduite trois fois.

2) La **Figure 5** montre l'augmentation proportionnelle des CFU et de la bioluminescence au cours du temps. L'augmentation est exponentielle pour la bioluminescence et les CFU au cours des 8 premières heures puis la bioluminescence sature alors que la croissance des CFU reste exponentielle. Il existe donc un décalage entre CFU et bioluminescence en fonction du temps.

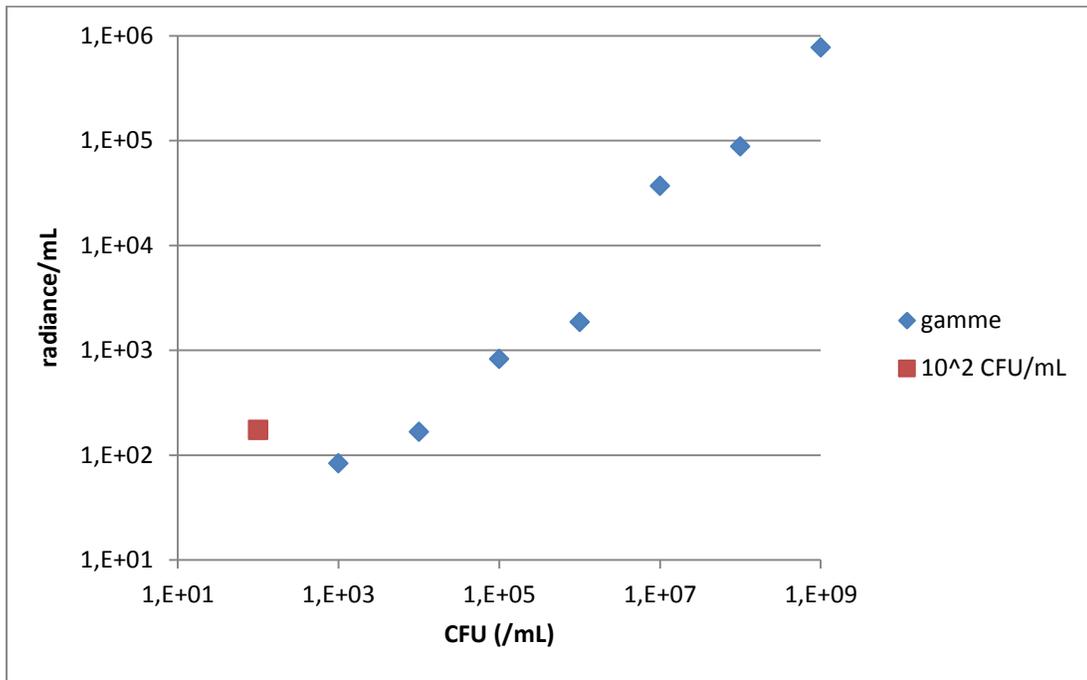


Figure 4. Corrélation entre les valeurs moyennes (n=4) de CFU/mL et de bioluminescence (radiance/mL) selon une gamme de concentration bactérienne au temps 0 en l'absence d'antibiotique. La limite de quantification est fixée à 10^3 rad/mL.

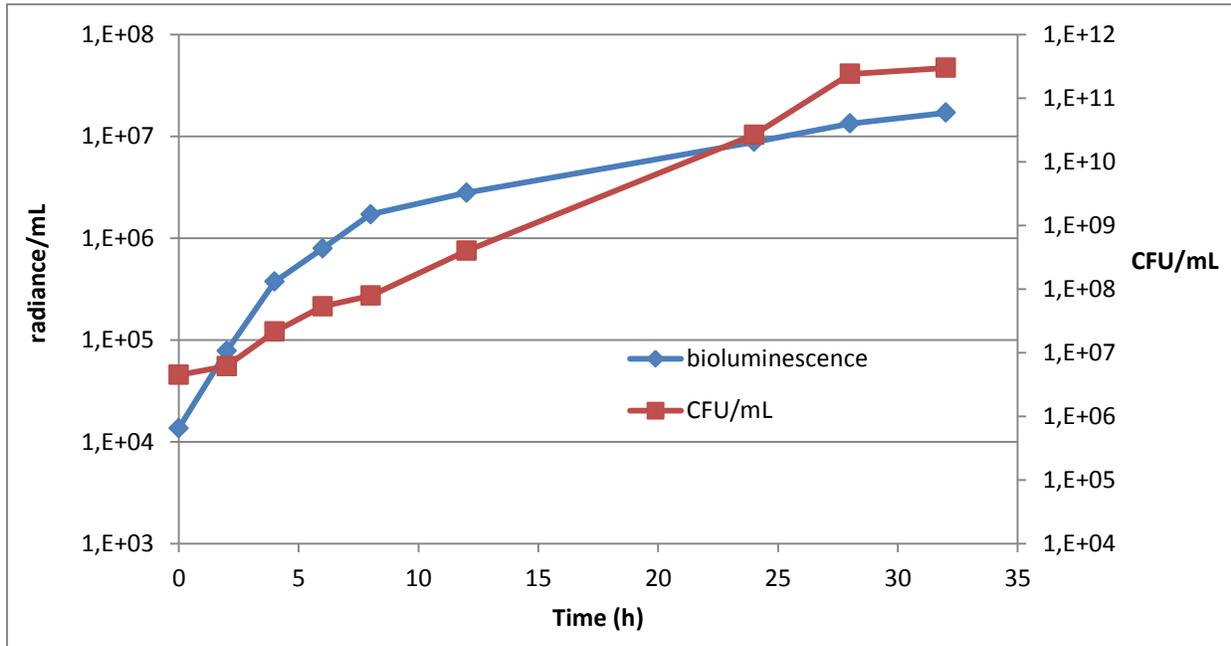


Figure 5. Valeurs moyennes (n=4) des CFU et bioluminescence (radiance/mL) en fonction du temps à partir d'un inoculum bactérien initial à $5 \cdot 10^6$ CFU/mL en l'absence d'antibiotique.

3) En présence de concentrations de ciprofloxacine de 0.25mg/L, il existe une élévation de la bioluminescence pendant les quatre premières heures tandis que le comptage des CFU objective une décroissance des bactéries dès les temps précoces (**Figure 6**). A partir de la 8^{ème} heure, on retrouve une élévation de la bioluminescence ainsi qu'une croissance des colonies bactériennes.

L'analyse statistique a mis en évidence que la relation entre bioluminescence et CFU dépend de façon significative du temps et de la présence ou non d'antibiotique ($p < 0.05$).

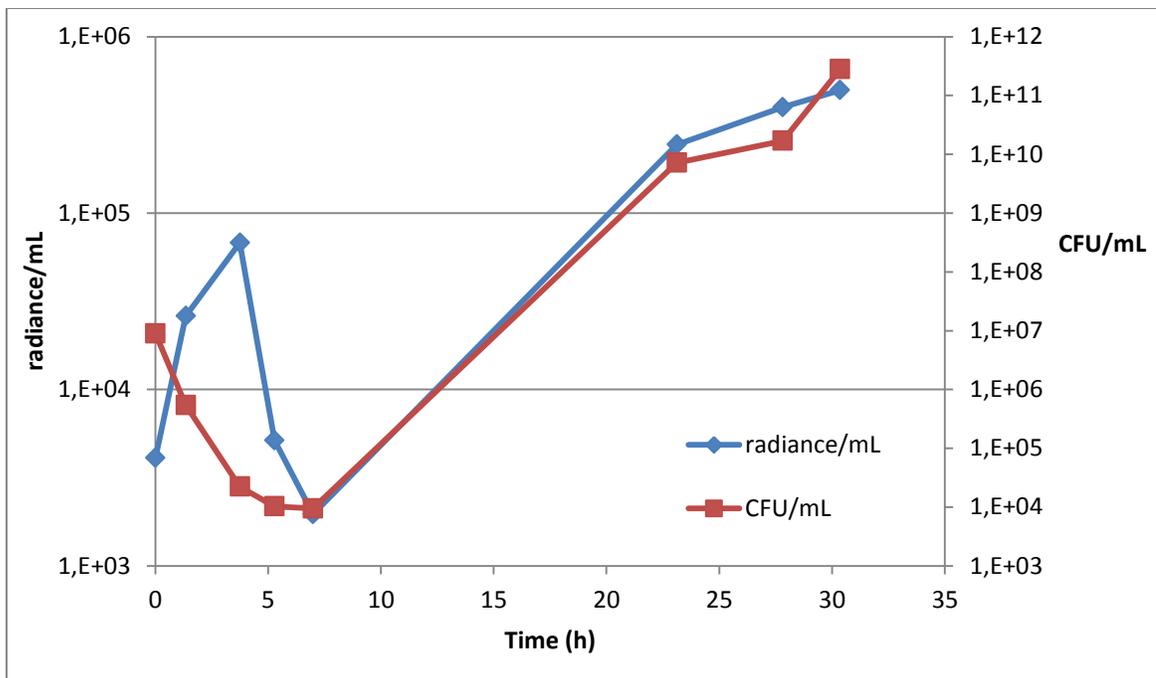


Figure 6. Courbe de bactéricidie au cours du temps en présence d'une concentration de 0.25mg/L de ciprofloxacine avec comptage des CFU et bioluminescence (radiance/mL).

III CIPROFLOXACINE

1- ADAPTATION DE LA BACTERIE

a) Résultats de la 1^{ère} courbe de bactéricidie

Les moyennes des valeurs de bioluminescence en fonction du temps pour chaque concentration de ciprofloxacine sont représentées dans la **Figure 7**. Les écart-types n'ont pas été représentés pour une meilleure lisibilité du graphique.

En l'absence d'antibiotique, l'augmentation de la bioluminescence des bactéries est exponentielle jusqu'à atteindre un plateau aux environs de $2 \cdot 10^7$ rad/mL entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure. En présence de ciprofloxacine et quelle que soit la concentration, une augmentation de la bioluminescence est constatée dans les deux premières heures. Plus la concentration d'antibiotique est importante, moins l'élévation initiale de la bioluminescence est importante. La décroissance de la bioluminescence débute à la 4^{ème} heure. A la concentration de 0.0625mg/L, une élévation initiale de la bioluminescence proche au témoin se produit jusqu'à la 4^{ème} heure suivi d'une phase de plateau jusqu'à la 12^{ème} heure. Entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure, l'élévation de la bioluminescence est rapide pour tendre à rejoindre le témoin. Pour des concentrations de ciprofloxacine comprises entre 0.125 et 16mg/L, une phase de décroissance de la bioluminescence se produit entre la 2^{ème} et la 12^{ème} heure. Cette phase de décroissance est suivie d'une phase d'augmentation de la bioluminescence pour les concentrations de ciprofloxacine comprises entre 0.125 et 1mg/L. En présence des concentrations de ciprofloxacine de 2, 4, 8, 16mg/L, les cinétiques de décroissance de bioluminescence sont comparables. Au-delà d'une certaine concentration d'antibiotique, la vitesse de bactéricidie n'augmente plus. La bioluminescence descend sous la limite de quantification (10^3 rad/mL) entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure. Après exposition des bactéries pendant 32h, la CMI est passée de 0.25mg/L de à 0.75mg/L.

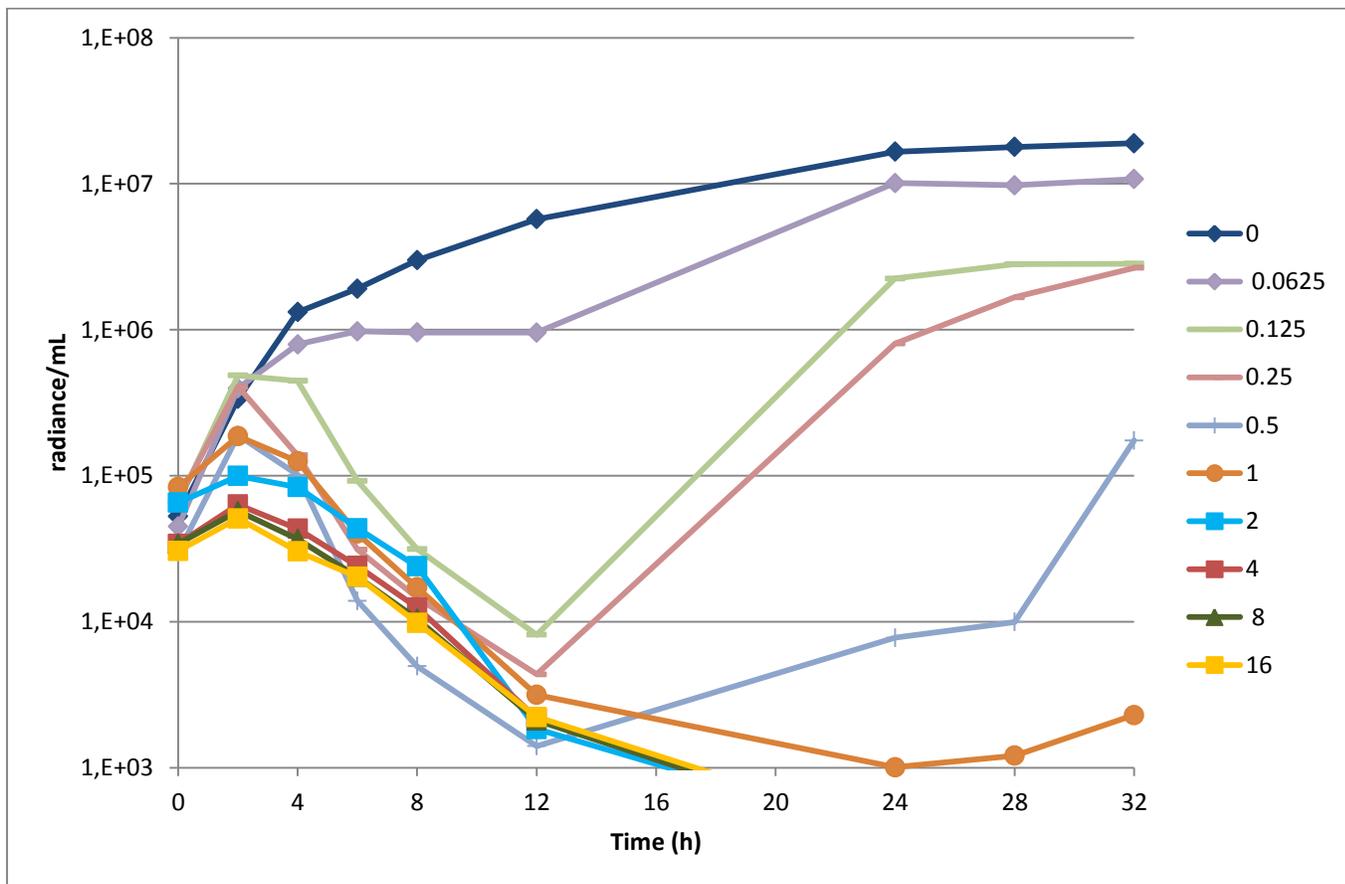


Figure 7. 1^{ère} courbe de bactéricidie. Valeurs moyennes (n=3) de l'évolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de ciprofloxacine (en mg/L) en fonction du temps.

b) Résultats de la 2^{ème} courbe de bactéricidie sans wash-out

Les moyennes de bioluminescence pour chaque concentration de ciprofloxacine en fonction du temps sont représentées dans la **Figure 8**. Chaque expérience a été réalisée au moins en duplicata. En l'absence d'antibiotique, l'élévation de la bioluminescence est proche de celle de la 1^{ère} courbe de bactéricidie avec une phase initiale exponentielle jusqu'à un plateau aux alentours de 2.10^7 rad/mL atteint entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure.

Une nouvelle adaptation de la bactérie est observée puisque des concentrations de ciprofloxacine 2 à 3 fois plus fortes (4, 8, 16mg/L) sont nécessaires pour obtenir une décroissance de la bioluminescence proche des résultats de la 1^{ère} courbe de bactéricidie. Les valeurs descendent sous le seuil de quantification entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure.

Pour des concentrations de 0.25 et 0.5mg/L, il est constaté l'absence de décroissance de bioluminescence. Les valeurs sont inférieures au témoin les 12 premières heures puis tendent à le rejoindre ensuite.

L'adaptation de la bactérie est beaucoup plus rapide que pour la 1^{ère} courbe de bactéricidie. Pour des concentrations de ciprofloxacine à 2mg/L, la décroissance de la bioluminescence est plus lente sur les 24ères heures sans atteindre la limite de quantification suivie d'une seconde phase de ré élévation de la bioluminescence aux temps tardifs. A la concentration de 1mg/L, il n'y a pas de décroissance de la bioluminescence. Après une phase en plateau les 6ères heures, on note une élévation de la bioluminescence par la suite.

Après une seconde exposition des bactéries pendant 32h à 1mg/L de ciprofloxacine, la CMI est passée de 0.75mg/L à 12mg/L.

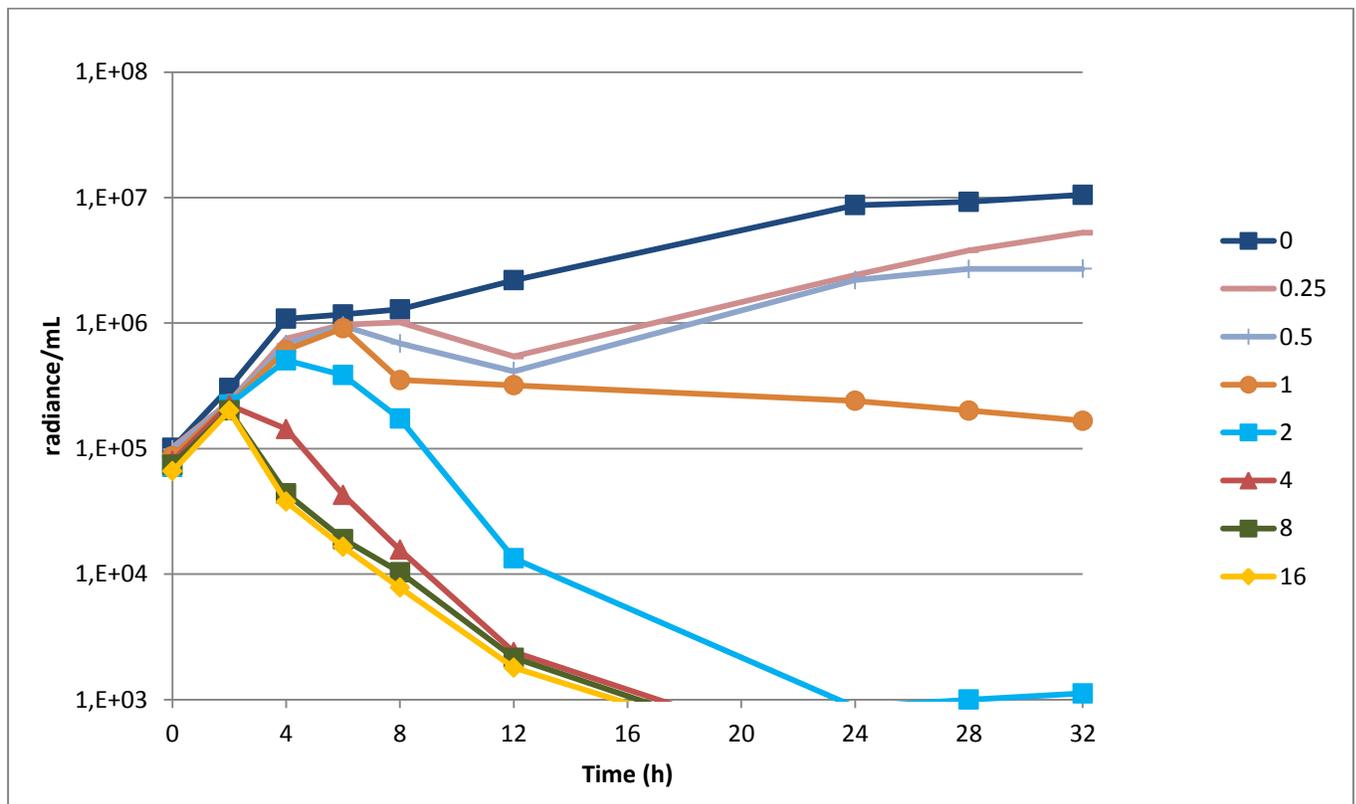


Figure 8. 2^{ème} courbe de bactéricidie de ciprofloxacine sans wash-out. Valeurs moyennes (n=3) de l'évolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de ciprofloxacine (en mg/L) en fonction du temps après reprise à 32h des bactéries de la 1^{ère} courbe de bactéricidie soumises à une concentration de ciprofloxacine à 0.25mg/L.

2- ETUDE DE LA REVERSIBILITE

Résultats des 2^{èmes} courbes de bactéricidie avec wash-out de 18h, 42h et 66h

Les résultats des valeurs de bioluminescence des courbes de bactéricidie avec wash-out de 18h, 42h et 66h sont détaillés dans les Annexes (ANNEXE 1). Les résultats étant similaires avec les différentes périodes de wash-out, seuls les résultats des courbes de bactéricidie avec wash-out de 66h sont représenté dans la **Figure 9**. Les expériences ont été réalisées en duplicata. Un wash-out

de 18, 42 et 66h n'a pas permis de restaurer ni même d'améliorer la sensibilité de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* à la ciprofloxacine. Les résultats sont comparables aux résultats de la 2^{ème} courbe de bactéricidie sans wash-out. L'adaptation d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à la ciprofloxacine n'est pas réversible en l'absence de contact d'antibiotique pendant au moins 66h.

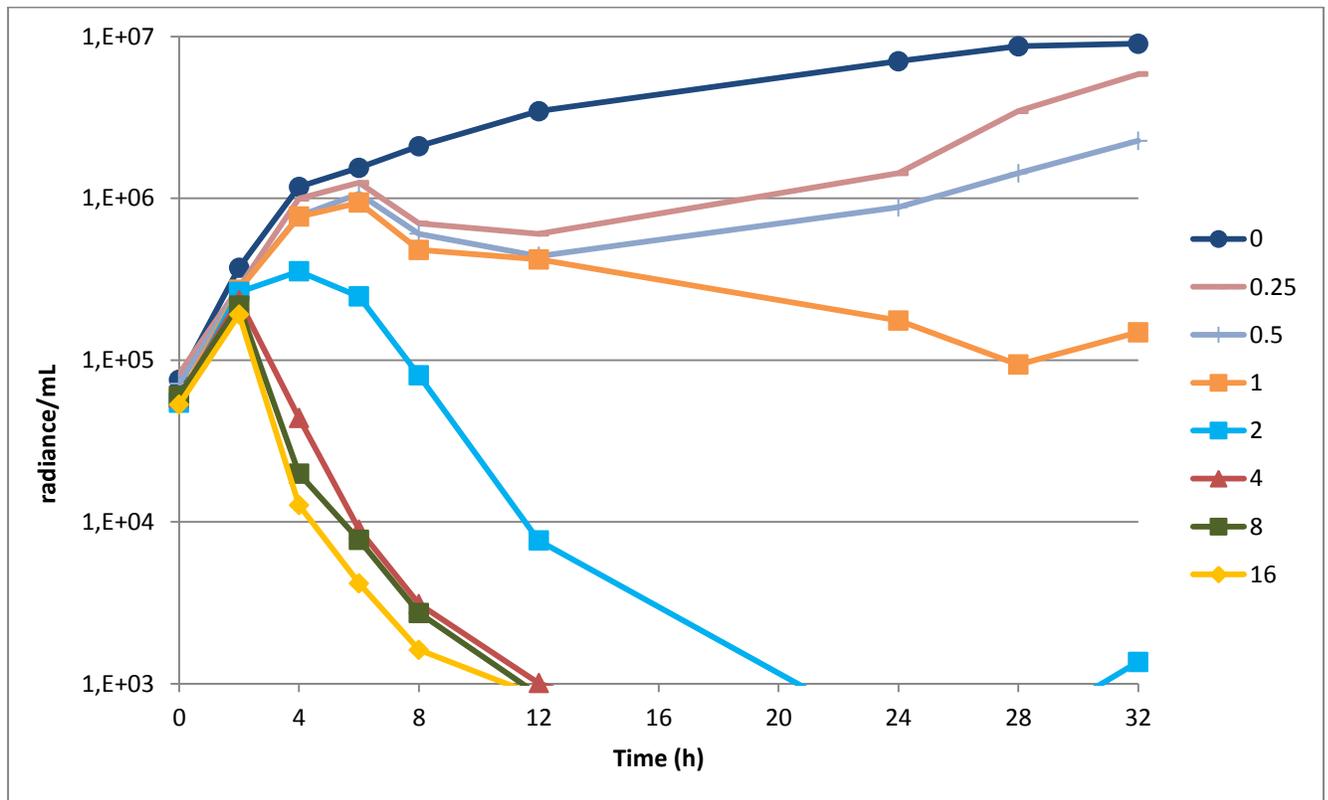


Figure 9. 2^{èmes} courbes de bactéricidie (0-32h) avec wash-out de 66h. Evolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumise à différentes concentrations de ciprofloxacine (en mg/L) en fonction du temps. Les bactéries ont été reprises à 32h à partir des bactéries de la 1^{ère} courbe de bactéricidie soumise à une concentration de ciprofloxacine à 0.25mg/L et laissées sans antibiotique pendant 66h.

IV MEROPENEME

1- ADAPTATION DE LA BACTERIE

a) Résultats de la 1^{ère} courbe de bactéricidie

Les moyennes des valeurs de bioluminescence en fonction du temps pour chaque concentration de méropénème sont représentées dans la **Figure 10**.

Le profil des courbes est comparable à celles de la ciprofloxacine avec une élévation de la bioluminescence initiale quelle que soit la concentration de méropénème. Aux fortes concentrations, la décroissance de la bioluminescence est lente puisqu'il faut plus de 24h pour descendre sous la limite de quantification. Il n'y a pas de repousse bactérienne à partir de 4mg/L de méropénème. A la concentration de 2mg/L, il existe une augmentation de la bioluminescence entre la 24^{ème} et 28^{ème} heure. Cette augmentation est plus précoce pour les concentrations plus faibles. Après exposition des bactéries pendant 32h à 1mg/L de méropénème, la CMI est passée de 0.5 à 2mg/L.

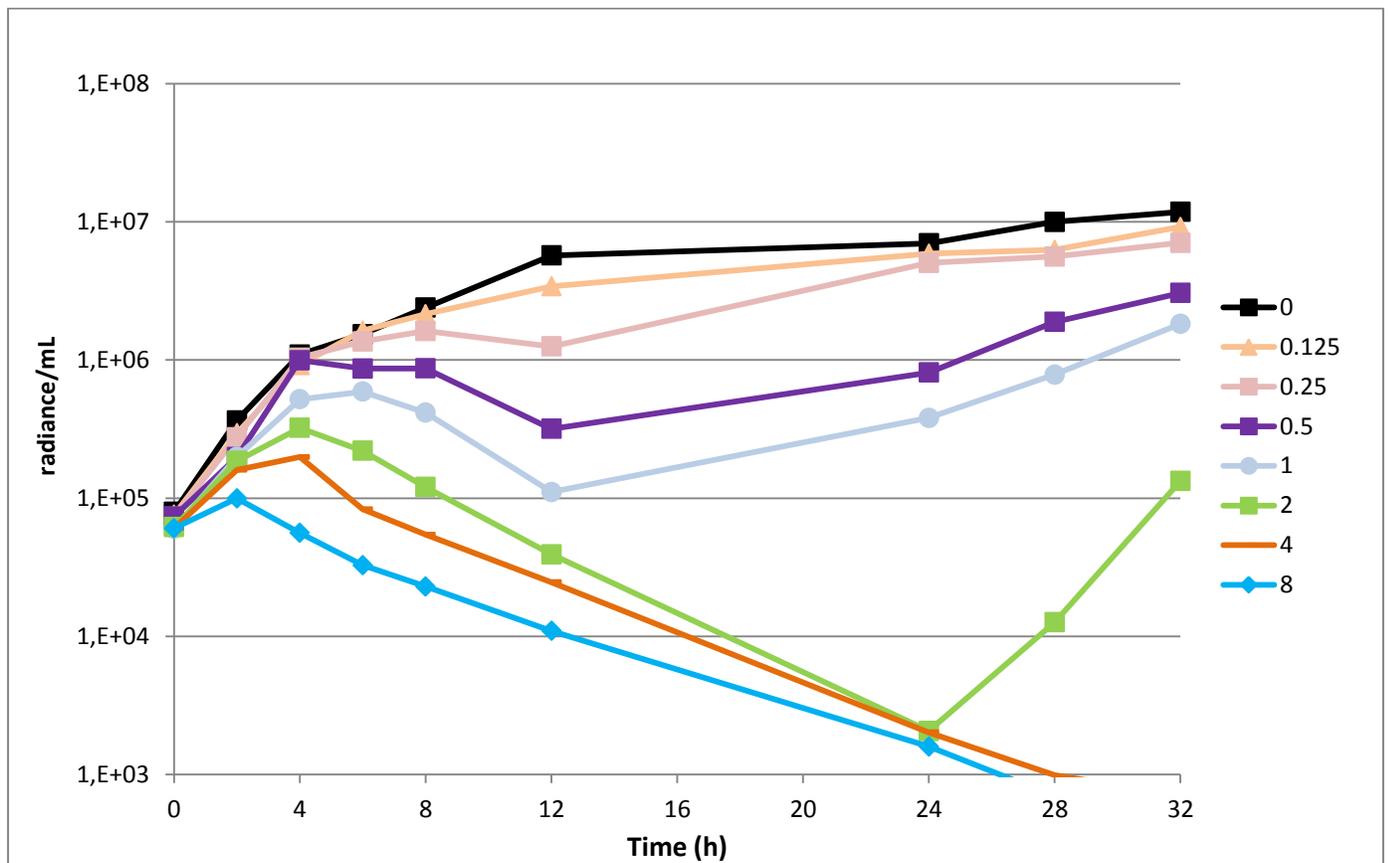


Figure 10. 1^{ère} courbe de bactéricidie. Valeurs moyennes (n=3) de l'évolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de méropénème (en mg/L) en fonction du temps.

b) Résultats de la 2^{ème} courbe de bactéricidie sans wash-out

Les moyennes des valeurs de bioluminescence en fonction du temps pour chaque concentration de méropénème sont représentées dans la **Figure 11**.

Pour obtenir la même efficacité que lors de la 1^{ère} courbe de bactéricidie, des concentrations de méropénème quatre fois supérieures sont nécessaires. Les bactéries ne repoussent pas à partir d'une concentration de 16mg/L. A la concentration de 8mg/L, il existe une discrète repousse aux

temps tardifs. Après exposition des bactéries pendant 32h à 4mg/L de méropénème, la CMI est passée de 2 à 12mg/L.

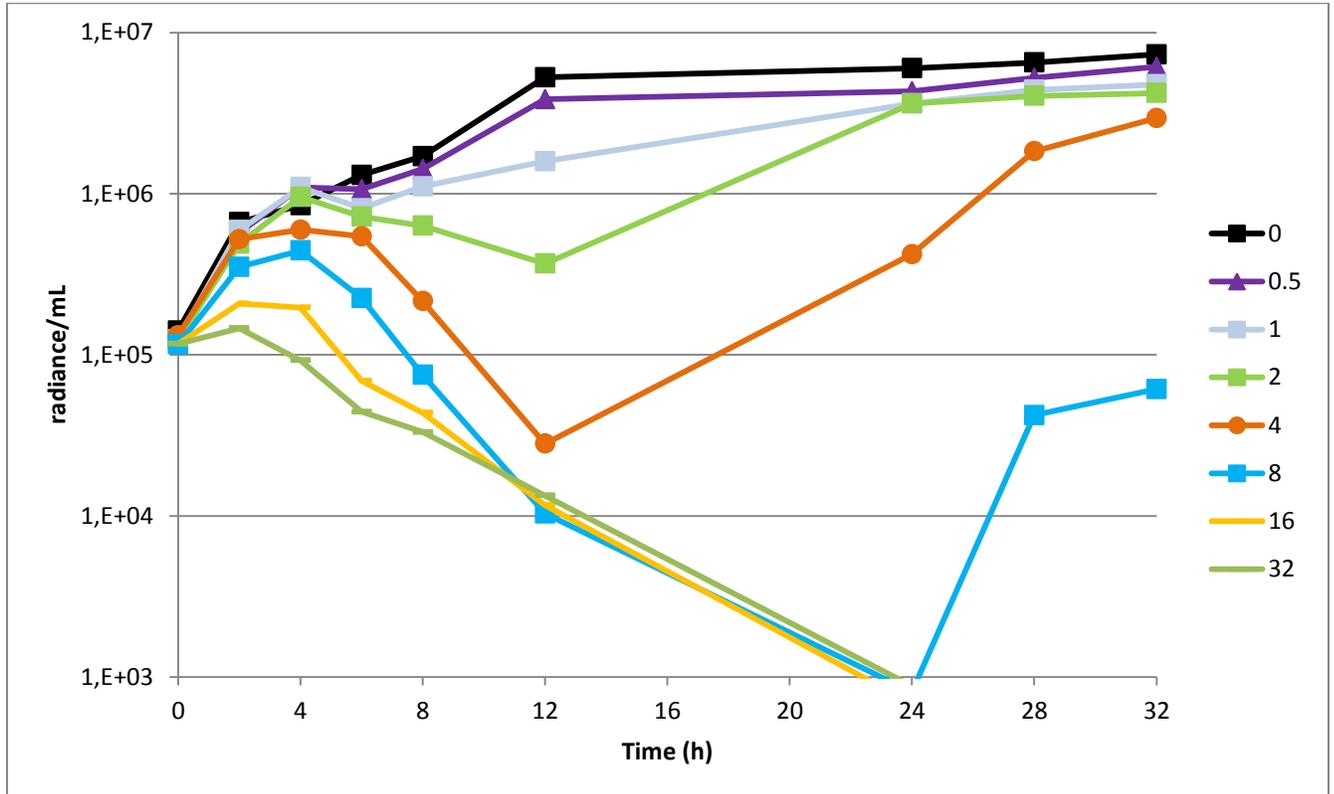


Figure 11. 2ème courbe de bactéricidie de méropénème sans wash-out. Valeurs moyennes (n=3) de l'évolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de méropénème (en mg/L) en fonction du temps après reprise à 32h des bactéries de la 1^{ère} courbe de bactéricidie soumises à une concentration de méropénème à 1mg/L.

2- ETUDE DE LA REVERSIBILITE

Les résultats des valeurs de bioluminescence des courbes de bactéricidie avec wash-out de 18h, 42h et 66h sont représentés dans les Annexes (ANNEXE 2). La **Figure 12** représente la courbe

de bactéricidie après 66h de wash-out. Les expériences ont été réalisées en duplicata. Un wash-out de 18, 42 et 66h n'a pas permis de restaurer la sensibilité de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* au méropénème. Les courbes de bactéricidie avec wash-out étaient comparables à la 2^{ème} courbe de bactéricidie sans wash-out.

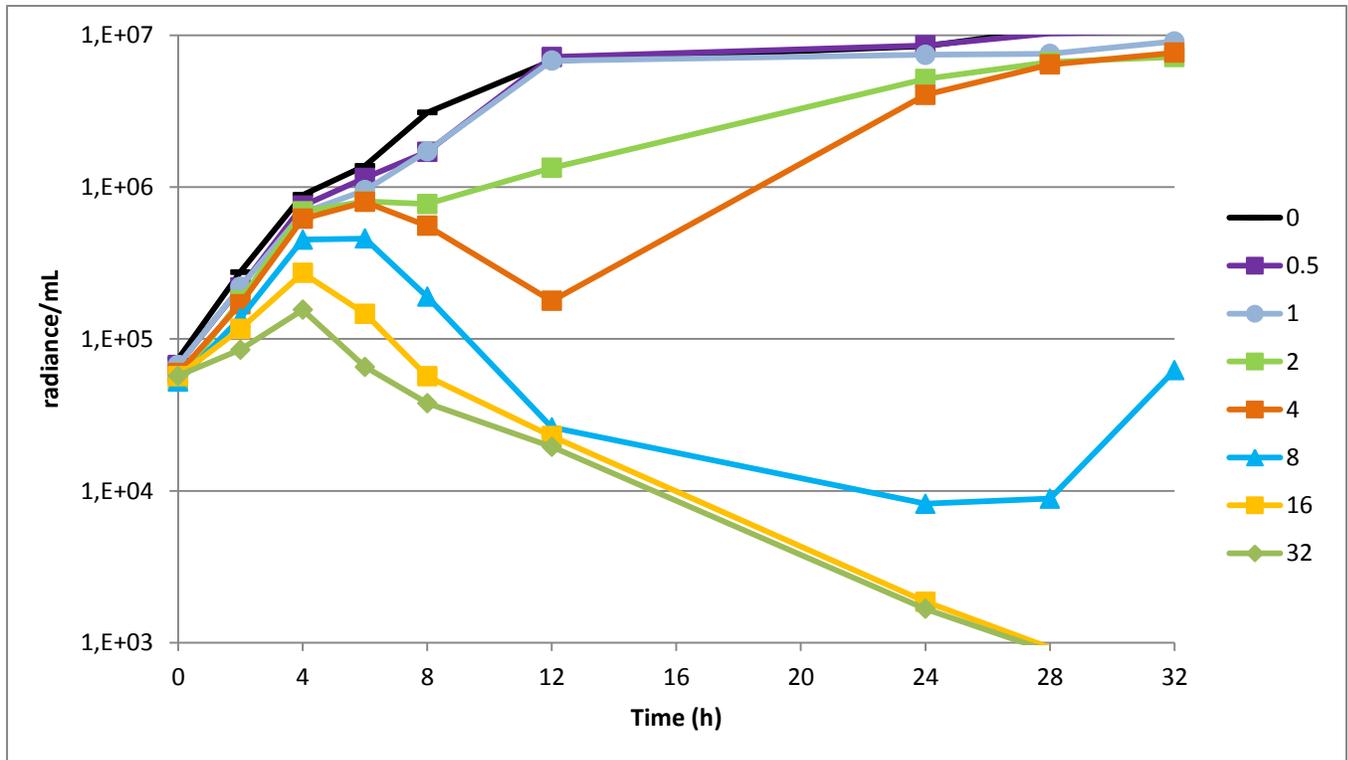


Figure 12. 2^{èmes} courbes de bactéricidie (0-32h) avec wash-out de 66h. Evolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de méropénème (en mg/L) en fonction du temps. Les bactéries ont été reprises à 32h à partir des bactéries de la 1^{ère} courbe de bactéricidie soumises à une concentration de méropénème à 1mg/L et laissées sans antibiotique pendant 66h.

3- MECANISMES DE RESISTANCE

L'ensemble des mutations mises en évidence sont recensés dans le **Tableau 4**.

Toutes les souches correspondent à des mutants qui ont acquis des mutations dans différents déterminants génétiques.

Résistances à la ciprofloxacine :

La résistance aux fluoroquinolones chez les mutants apparus lors de la 1^{ère} et 2^{ème} courbe de bactéricidie (mutants **6226** et **6227**) est expliquée par la surproduction de la pompe d'efflux MexCD-OprJ.

Résistances au méropénème :

-La résistance chez le mutant apparu lors de la 1^{ère} courbe de bactéricidie (mutant **6224**) est expliquée par la répression du gène *oprD* (0.10). Ceci est corrélé avec la surexpression de la pompe CzcABC.

-La résistance chez le mutant apparu lors de la 2^{ème} courbe de bactéricidie (mutant **6225**) est expliqué par une protéine OprD tronquée. Insertion d'une séquence d'insertion.

Tableau 4. Mécanismes de résistances impliqués dans l'adaptation de la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Souches (nom CNR)	Nom Poitiers	Séquençage			Niveaux d'expression génique (RT-qPCR)						
		<i>promoteur oprD</i>	<i>gène oprD</i>	<i>QRDR</i>	<i>oprD</i>	<i>mexC</i>	<i>mexE</i>	<i>mexY</i>	<i>czcC</i>	<i>czcR</i>	<i>copR</i>
6224	CMI méro=2	wt	wt	ND	0.10	2.2	2.5	ND	3.9	1	1.7
6225	CMI Méro= 12	wt	IS insérée au nucléotide 408	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6226	CMI cipro=0.75	ND	ND	wt	ND	1022	2.2	0.65	ND	ND	ND
6227	CMI cipro=12	ND	ND	wt	ND	948	1.05	0.74	ND	ND	ND

wt, wild type, ND: non déterminé; QRDR: Quinolone Resistance Determining Regions (gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*).

En gras figure les données significatives. Les mesures de RT-qPCR ont été réalisées en duplicata.

VI VITESSE DE CROISSANCE DES BACTERIES/ FITNESS COST

Les différentes valeurs de constantes de croissance sont représentées dans le **Tableau 5**. Il s'agit des valeurs de constantes de croissance mesurées sur les 4 premières heures. L'analyse des variances (ANOVA) des courbes de croissance des différentes souches de bactéries sauvage et mutées ne montre pas de différence significative ($p=0.2284$).

Tableau 4. Constantes moyennes de croissance des différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* sur les 4 premières heures de pousse.

	Wild type (n= 4)	Souche mutée en présence de ciprofloxacine (n=2) CMI = 12mg/L	Souche mutée en présence de méropénème (n=2) CMI = 12mg/L
Constante de croissance (h ⁻¹)	0.67	0.64	0.62

DISCUSSION

L'IVIS® Lumina est un imageur à haute résolution dans la détection d'images de bioluminescence *in vivo* et *in vitro*. Cette méthode est fréquemment utilisée *in vivo* notamment dans les modèles tumoraux chez le petit animal. Bien que décrit également pour son efficacité pour des modèles *in vitro*, son utilisation dans les modèles infectieux *in vitro* reste novatrice.

La méthode de référence actuelle pour le comptage des bactéries est le dénombrement des CFU. Il était donc nécessaire de rechercher la corrélation entre bioluminescence et CFU. Dans cette étude, un comptage des CFU a été réalisé en parallèle des mesures de bioluminescence. Il existait une relation de type puissance pour des concentrations bactériennes connues entre 10^9 et 10^5 CFU/mL sans antibiotique au temps 0. La relation entre CFU et bioluminescence variait en fonction du temps et de la présence ou non d'antibiotique. D'autres études ont étudié l'équivalence entre bioluminescence et CFU, mais aucune n'a été réalisée en présence d'antibiotique (47). Ces études retrouvaient une bonne corrélation pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne entre la 2^{ème} et 6^{ème} heure, mais pas pour les périodes de lag-time (0 à 2h) et de 6 à 24h. Or, une variation de la relation en présence d'antibiotique et du type d'antibiotique a pu être constatée. De même, les mêmes expériences ont été réalisées avec un autre antibiotique, la colistine, dont les résultats étaient différents (Jacobs et al. Travaux en cours). La relation entre bioluminescence et CFU dépend donc du temps et de la présence ou non d'antibiotique et du type d'antibiotique.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les différences retrouvées entre les CFU et les valeurs de bioluminescence. Tout d'abord, la mesure de la bioluminescence permet une acquisition précise à un temps donné tandis que le comptage des CFU nécessite un ensemencement sur milieu solide avec lecture 18-24h plus tard et ne représente donc pas une mesure instantanée. La bioluminescence est donc un moyen de quantification indirecte du nombre de bactéries moins fastidieux que la technique de dénombrement des CFU et permet une mesure instantanée à un temps donné. Le comptage des CFU ne permet de quantifier que les bactéries capables de former des colonies, c'est-à-dire de se multiplier. Or, les bactéries qui ont perdu la capacité de former des colonies due à la présence de l'antibiotique émettent quand même de la bioluminescence

délectable par l'IVIS®. Malgré la production d'énergie responsable de bioluminescence, les composants intracellulaires produits peuvent être insuffisants pour permettre la division cellulaire. Enfin, la bioluminescence émise par la bactérie est conditionnée par son métabolisme et conditions de vie. La mise en contact avec un antibiotique pourrait perturber ces paramètres et engendrerait une majoration de l'émission de bioluminescence.

En présence de concentrations constantes d'antibiotiques, il est fréquent d'observer une repousse des bactéries après une bactéricidie initiale. La repousse de la bactérie ne peut être expliquée par la diminution de la concentration de l'antibiotique au cours du temps puisque la ciprofloxacine est stable pendant plusieurs jours à 37°C(48). De même, la stabilité du méropénème *in vitro* est avérée, à la différence de l'*in vivo* où il existe une décroissance de la concentration d'environ 8 à 10% dès la 6h (49, 50).

Jacobs et al. (Travaux en cours) avaient préalablement réalisé une étude similaire avec la colistine. La membrane cellulaire bactérienne représente la cible de son principal mode d'action. Grâce à une interaction électrostatique avec le lipopolysaccharide (ou LPS) de la bactérie, la colistine peut entraîner la mort cellulaire (51). De par sa nature cationique, la colistine va déstabiliser le LPS entraînant un transfert du magnésium et du calcium de la cellule permettant une augmentation de la perméabilité de la membrane ainsi qu'une fuite du contenu intracellulaire (52). Cet antibiotique est utilisé en dernier recours contre les infections à bacilles gram négatifs multi résistants. Les profils de cinétiques de bactéricidie et d'adaptation de la bactérie étaient différents des résultats avec la ciprofloxacine et le méropénème (**ANNEXE 3**). De fortes concentrations de colistine ont permis une décroissance beaucoup plus rapide des valeurs de bioluminescence puisque la limite de quantification a été atteinte avant la 4^{ème} heure. Il n'a pas été constaté d'élévation des valeurs dans les 2 premières heures comme constaté dans notre étude. L'adaptation des bactéries a été beaucoup plus importante et rapide que pour la ciprofloxacine et le méropénème. Cette adaptation se renforçait aux temps tardifs avec lors de la 2^{ème} courbe de bactéricidie sans wash-out, la nécessité d'augmenter 32 fois les concentrations de colistine pour obtenir une décroissance de la bioluminescence. Concernant la réversibilité, plus la période de wash-out était longue, plus la bactérie tendait à retrouver sa sensibilité initiale à la colistine. Ce

phénomène était lent puisqu'au bout de 66h, la sensibilité n'était pas totalement restaurée. A la différence de la ciprofloxacine et du méropénème, l'adaptation de la bactérie à la colistine est transitoire avec une réversibilité relativement lente en l'absence de colistine. Les gènes *pmrB*, *phoQ*, *parS*, *crpS* et *cprR* ont été amplifiés et séquencés (53). Pour les bactéries pré-exposés pendant 30h à la colistine (1ère courbe de bactéricidie), deux mutations au niveau du gène *pmrB* ont été identifiées. Il s'agit de la substitution de deux acides aminés (Ser68Gly et Val147Gly) conférant un haut niveau de résistance en modifiant le lipide A du LPS.

CIPROFLOXACINE

La première courbe de bactéricidie en présence de ciprofloxacine a pu mettre en évidence l'apparition d'une résistance se révélant par la ré augmentation de la bioluminescence et donc d'une repousse des bactéries. Des concentrations de ciprofloxacine égales à 8 fois la CMI étaient nécessaire pour éviter l'émergence de résistance. La CMI des bactéries exposées pendant 32h à la ciprofloxacine était alors de 0.75mg/L, soit trois fois la CMI initiale. Il s'agit d'une résistance de bas niveau. Cette perte de sensibilité faisait intervenir un mécanisme d'efflux MexCD OprJ. Quatre systèmes d'efflux existent pour les fluoroquinolones : MexAB OprM, MexCD OprJ, MexEF OprN et MexXY OprM. Cette perte de sensibilité de la bactérie à la ciprofloxacine n'était pas restaurée en absence d'antibiotique.

Les mécanismes d'efflux peuvent être les premiers mécanismes mobilisés après une exposition aux antibiotiques. Cette observation est retrouvée dans d'autres études confirmant la forte prévalence de ce mécanisme de bas niveau de résistance du *Pseudomonas aeruginosa* (54).

Dans un deuxième temps, la 2ème courbe de bactéricidie sans wash-out (32-64h) a permis de mettre en évidence l'acquisition d'une nouvelle résistance mais cette fois-ci d'un plus haut niveau faisant de nouveau intervenir un mécanisme de pompes d'efflux. Il s'agissait des bactéries récupérées après 32h d'exposition à la ciprofloxacine à une concentration de 0.25mg/L (1ère courbe de bactéricidie). En effet, cette concentration d'antibiotique permettait d'observer la décroissance initiale du nombre de bactérie suivi d'une repousse témoignant de la perte de sensibilité de la bactérie. La présence au préalable d'une première résistance de bas niveau a facilité l'apparition d'une seconde résistance de plus haut niveau (CMI =12mg/L). Le mécanisme

de résistance faisait de nouveau intervenir la surproduction de la pompe d'efflux MexCD-OprJ. Néanmoins, il s'agissait d'un haut niveau de résistance. Ce mécanisme n'était pas transitoire puisque des périodes de wash-out ne modifiaient pas la sensibilité de la bactérie. En cas de haut niveau de résistance, une atteinte mutationnelle des topo-isomérases aurait pu être supposée. Cependant, l'amplification par PCR des régions déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) (11) afin de déterminer l'imputabilité des topo-isomérases dans l'acquisition de cette résistance ne retrouvait pas de mutation.

MEROPENEME

A la différence des fluoroquinolones qui agissent sur les topo-isomérase à l'intérieur de la bactérie, le méropénème agit sur le PLP en regard de la partie externe de la membrane cytoplasmique. De par sa cible plus rapide à atteindre, on pouvait s'attendre à une cinétique de décroissance de la bioluminescence beaucoup plus rapide que pour la ciprofloxacine. Or la décroissance est également lente nécessitant 24h pour passer sous la limite de quantification à de fortes concentrations de méropénème.

Lors de la 1^{ère} courbe de bactéricidie, il était constaté l'apparition d'une résistance avec une repousse des bactéries pour des concentrations de méropénème allant jusqu'à 2mg/L. des concentrations de méropénème égales à 8 fois la CMI étaient nécessaires pour éviter l'apparition de résistance. La CMI était alors passé de 0.5 à 2mg/L. Il s'agissait d'une résistance de bas niveau. Le phénotype de résistance correspondait à une altération de la porine OprD. Ce phénotype de résistance aux carbapénèmes est à évoquer devant une souche sensible à la ticarcilline, à la pipéracilline, à la ceftazidime mais intermédiaire ou résistante à l'imipénème. Les CMI des carbapénèmes peuvent être majorées d'un facteur 4 à 16, sans modification des CMI des autres β -lactamines. Le doripénème et le méropénème sont, en général, moins touchés par ce mécanisme d'imperméabilité car ils possèdent une meilleure activité intrinsèque sur le bacille pyocyanique que l'imipénème. Ainsi, des mutants apparaissant « I » ou « R » à l'imipénème peuvent parfois rester « S » aux deux autres produits. Ainsi, les résistances concernant les carbapénèmes ne peuvent être extrapolées aux autres carbapénèmes. Ce phénotype est le plus fréquemment associé à d'autres mécanismes de résistance, ce qui complique l'interprétation de l'antibiogramme. Cette résistance est liée à une diminution (baisse de

l'expression du gène OprD) ou une altération de la porine OprD qui est la voie d'entrée principale des carbapénèmes dans la bactérie, à la différence des autres antibiotiques (55). L'altération de la porine OprD sous l'effet des mutations est un événement fréquent chez les souches cliniques, puisqu'elle touche environ 15 à 18% des souches en France. Seule, elle est responsable de bas niveau. Son association à l'hydrolyse plus ou moins importante de la molécule par une céphalosporinase hyperproduite dans l'espace périplasmique et à la surproduction du système d'efflux MexAB-OprM aboutit à l'augmentation des CMI de tous les carbapénèmes. Dans un second temps (2^{ème} courbe de bactéricidie), des concentrations de méropénème 4fois supérieures à la première courbe de bactéricidie étaient nécessaires pour obtenir la même efficacité. Après la seconde exposition au méropénème, la CMI est passée de 2 à 12mg/L. Cette mutation de haut niveau était en rapport avec la porine OprD mais était différente de la mutation mise en évidence lors de la 1^{ère} courbe de bactéricidie. Il s'agissait d'une mutation en rapport avec l'insertion d'une séquence nucléotidique.

Le niveau de production d'un système d'efflux RND peut être co-régulé avec celui d'autres protéines non impliquées dans l'efflux actif.

L'expression du gène OprD est sous la dépendance de différents régulateurs dont certains sont aussi régulateurs de l'expression d'opérons d'efflux RND. CzcR, qui régule localement l'expression de *czcCBA*, réprime également l'expression d'OprD (56). La résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes par défaut de production d'OprD peut donc être associée à la résistance à d'autres antibiotiques par efflux actif.

VITESSE DE CROISSANCE

La plupart des mécanismes de résistance sont associés à un coût qui se traduit généralement par une diminution de la vitesse de croissance de la bactérie. L'importance de ce coût est un paramètre important qui influence le développement de la résistance, la stabilité de la résistance ainsi que la diminution de la résistance en l'absence d'antibiotique. L'apparition de résistance aux antibiotiques est déterminée par des mutations *de novo* et des transferts de gènes horizontaux (HGT). Les antibiotiques ciblent des fonctions importantes de la bactérie : synthèse de la

membrane, régulation de l'enroulement de l'ADN, transcription de l'ARN, synthèse des protéines. Dans ce sens, il n'est pas surprenant que le mutant résistant souffre d'une diminution de son activité biologique. L'acquisition de gènes de résistance par HGT a également un coût biologique (57). Cette association de résistance avec une décroissance de son activité biologique entretient l'espoir qu'une réduction de l'utilisation des antibiotiques permettrait une diminution de la fréquence de bactéries résistantes et de retourner à son état sauvage. Inversement, parfois l'acquisition d'une résistance peut améliorer le coût de son activité biologique. Ce phénomène a été montré sur le *Pseudomonas aeruginosa* sur la norfloxacine où des mutations des topoisomérases n'étaient pas associées à une majoration du fitness cost (58). Dans cette étude, la vitesse de croissance du *Pseudomonas aeruginosa* n'était pas influencée par la présence de mutations. L'apparition de résistances stables n'était donc pas associée à une majoration du fitness cost. Cependant, des études *in vivo* sont nécessaires pour le confirmer. En général, le temps requis pour réduire le taux de bactéries résistantes est inversement proportionnel au coût de la résistance (59). Il n'y a cependant pas de corrélation directe entre l'importance du coût et le type de cible inhibé par l'antibiotique. De plus, les conditions environnementales peuvent affecter le fitness cost. Des études ont notamment montré des différences entre les expériences *in vitro* et les expériences chez la souris (60). Les mutants résistants présentant une diminution de leur activité biologique sont généralement moins virulents que la souche sauvage, sans qu'il n'y ait de franche raison apparente (61).

PERSPECTIVES

Le *Pseudomonas aeruginosa* peut acquérir plusieurs mécanismes de résistance pour un même antibiotique. La résistance s'établit par paliers successifs, par accumulation d'événements mutationnels avec des mutations de différents niveaux.

Le choix de la monothérapie ou en association antibiotique pour traiter une bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* est de plus en plus discutée. Ni la thérapie de combinaison ni le traitement en monothérapie semble avoir un effet significatif sur les taux de mortalité chez les

patients avec une bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* (62, 63). Des études évaluant les effets de la thérapie de combinaison ou en monothérapie dans les cas plus spécialisés, comme en cas d'organisme multirésistante, sont nécessaires. Au regard de la littérature, il semble difficile de définir le traitement optimal en cas de bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa*. Cette difficulté semble s'accroître en réanimation du fait de la fragilité des patients et des risques de sous dosage induit par des volumes de distribution variables. Une telle inadéquation serait certainement responsable de sélection de mutants résistants voire d'émergence de souches multi résistantes, et probablement responsable d'une surmorbidity voire surmortalité.

Même s'il n'existe pas de différence en termes de mortalité en cas de bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* traitée en mono ou bi-antibiothérapie, il est important de savoir si la monothérapie est un facteur de risque d'apparition de résistance par rapport à la bithérapie. Après avoir caractérisé la cinétique d'apparition de résistance et les mécanismes de résistances de la ciprofloxacine, du méropénème et de la colistine (Jacobs et al), il s'agit désormais d'étudier la cinétique d'adaptation du *Pseudomonas aeruginosa* par combinaison de ces antibiotiques.

Les données de bioluminescence seront ultérieurement analysées à l'aide de modèles PK/PD semi-mécanistiques. Ceci permettra de quantifier de façon plus précise la vitesse d'apparition des résistances des bactéries ainsi que leur niveau afin d'adapter des schémas posologiques et des associations d'antibiotiques en vue d'une optimisation thérapeutique.

CONCLUSION

Le *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'acquérir des résistances stables et apparaissant rapidement à la ciprofloxacine et au méropénème sans qu'il y ait de retentissement sur sa vitesse de prolifération. Des concentrations de ciprofloxacine et de méropénème égales à au moins 4 ou 8 fois la CMI sont nécessaire pour éviter la survenue de résistance. Les mécanismes de résistance font intervenir des mutations sur les pompes d'efflux pour la ciprofloxacine et sur la porine OprD pour le méropénème. Les résistances se font par palier jusqu'à des hauts niveaux de résistance. Actuellement le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* est discuté sur l'indication

de traiter en monothérapie ou par une combinaison d'antibiotiques. Il ne semblerait pas avoir d'impact sur l'incidence de la mortalité. Néanmoins, des études sur les effets de la bi-antibiothérapie sont nécessaires afin d'évaluer la survenue de résistance. La bioluminescence apparaît comme un nouvel outil dans la recherche en temps réel de la vitesse d'apparition et le niveau de résistances aux antibiotiques.

REFERENCES

1. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011 Apr;139(4):909-19.
2. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. 2005 Oct;25(10):1353-64.
3. Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007 May;59(5):1021-4.
4. Nikaido H. Transport through the outer membrane of bacteria. *Methods Enzymol*. 1986;125:265-78.
5. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005 Jul;56(1):20-51.
6. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995 Sep;39(9):1948-53.
7. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plesiat P. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol*. 2005 Aug;187(15):5341-6.
8. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*. 2011 Apr;3(2):55-65.
9. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007 Jun;13(6):560-78.
10. Hocquet D, Plesiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X. Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Aug;54(8):3512-5.
11. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001 Aug;45(8):2263-8.
12. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*. 2005 Apr;25(4):290-5.
13. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005 Feb;49(2):565-70.

14. Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, Nakae T. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol.* 2002;46(6):391-5.
15. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Apr;7(2):337-41.
16. Jones RN, Kirby JT, Beach ML, Biedenbach DJ, Pfaller MA. Geographic variations in activity of broad-spectrum beta-lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: summary of the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2002 Jul;43(3):239-43. PubMed PMID: 12106958. Epub 2002/07/11. eng.
17. McDougall DA, Morton AP, Playford EG. Association of ertapenem and antipseudomonal carbapenem usage and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* among 12 hospitals in Queensland, Australia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2013 Feb;68(2):457-60.
18. Goossens H. MYSTIC program: summary of European data from 1997 to 2000. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2001 Dec;41(4):183-9.
19. Iaconis JP, Pitkin DH, Sheikh W, Nadler HL. Comparison of antibacterial activities of meropenem and six other antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from North American studies and clinical trials. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 1997 Feb;24 Suppl 2:S191-6.
20. Hurst M, Lamb HM. Meropenem: a review of its use in patients in intensive care. *Drugs.* 2000 Mar;59(3):653-80.
21. Barbier F, Wolff M. [Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end?]. *Medecine sciences : M/S.* 2010 Nov;26(11):960-8.
22. Pai H, Kim J, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2001 Feb;45(2):480-4.
23. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2001 Mar;47(3):247-50.
24. Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1999 Feb;43(2):424-7.
25. Wolter DJ, Lister PD. Mechanisms of beta-lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current pharmaceutical design.* 2013;19(2):209-22.
26. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1995 Jun;39(6):1211-33.
27. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2006 Sep 1;43 Suppl 2:S49-56.
28. Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, et al. Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *Journal of clinical microbiology.* 2005 Jan;43(1):458-61.
29. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2000 Jul;44(7):1771-7.

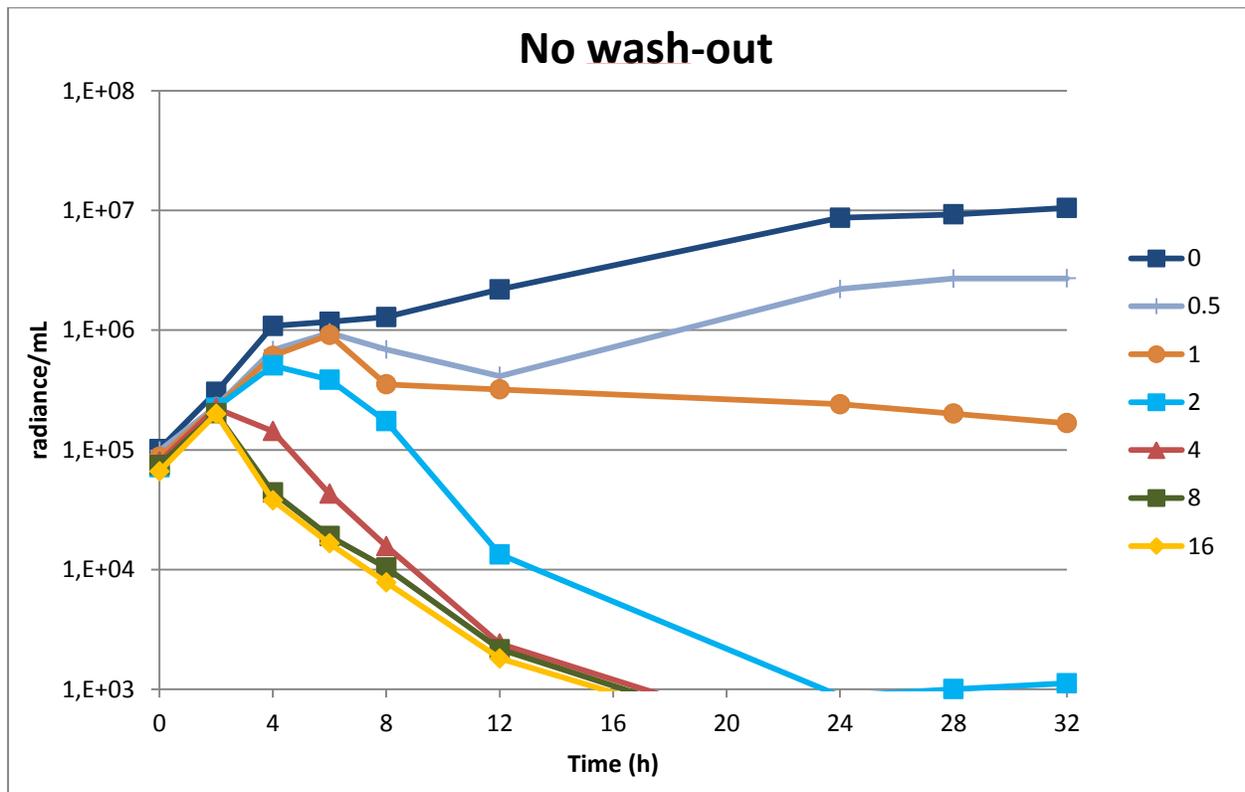
30. Cunha BA. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Seminars in respiratory infections*. 2002 Sep;17(3):231-9.
31. Fernandez L, Breidenstein EB, Hancock RE. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2011 Feb;14(1):1-21.
32. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010 Apr;8(4):260-71.
33. Levin BR. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin Infect Dis*. 2001 Sep 15;33 Suppl 3:S161-9.
34. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005 May;55(5):601-7.
35. Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev*. 2013 Jul;65(3):1053-90.
36. Jusko WJ, Ko HC. Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1994 Oct;56(4):406-19.
37. Nielsen EI, Viberg A, Lowdin E, Cars O, Karlsson MO, Sandstrom M. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007 Jan;51(1):128-36.
38. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for gentamicin and its adaptive resistance with predictions of dosing schedules in newborn infants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Jan;56(1):179-88.
39. Jacobs M, Gregoire N, Couet W, Bulitta JB. Distinguishing Antimicrobial Models with Different Resistance Mechanisms via Population Pharmacodynamic Modeling. *PLoS computational biology*. 2016 Mar;12(3):e1004782.
40. Gregoire N, Raheison S, Grignon C, Comets E, Marliat M, Ploy MC, et al. Semimechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic model with adaptation development for time-kill experiments of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Jun;54(6):2379-84.
41. Contag CH, Ross BD. It's not just about anatomy: in vivo bioluminescence imaging as an eyepiece into biology. *J Magn Reson Imaging*. 2002 Oct;16(4):378-87.
42. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(8):733-44.
43. Hutchens M, Luker GD. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol*. 2007 Oct;9(10):2315-22.
44. Ray P, De A, Patel M, Gambhir SS. Monitoring caspase-3 activation with a multimodality imaging sensor in living subjects. *Clin Cancer Res*. 2008 Sep 15;14(18):5801-9.
45. Huang YK, Chu C, Wu CH, Chen CL, Chiu CH. Evaluation of Gram-negative bacterial infection by a stable and conjugative bioluminescence plasmid in a mouse model. *J Biomed Sci*. 2014;21:78.
46. Xiong YQ, Willard J, Kadurugamuwa JL, Yu J, Francis KP, Bayer AS. Real-time in vivo bioluminescent imaging for evaluating the efficacy of antibiotics in a rat *Staphylococcus aureus* endocarditis model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005 Jan;49(1):380-7.

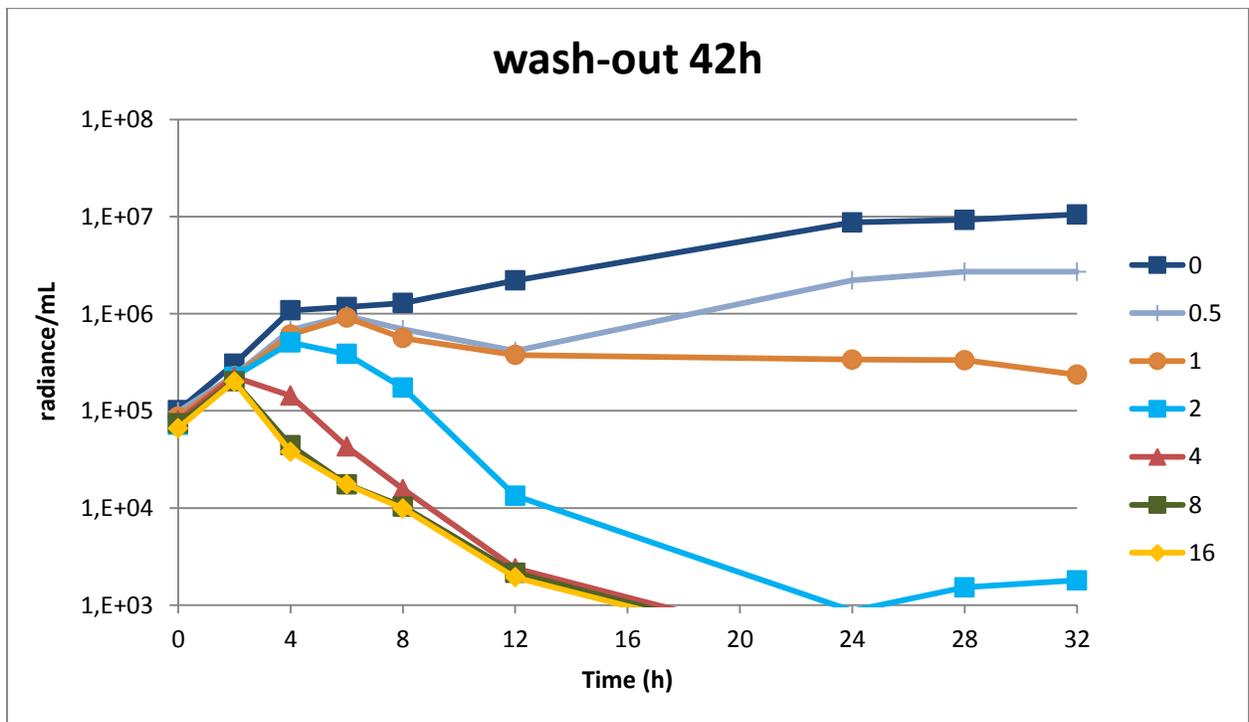
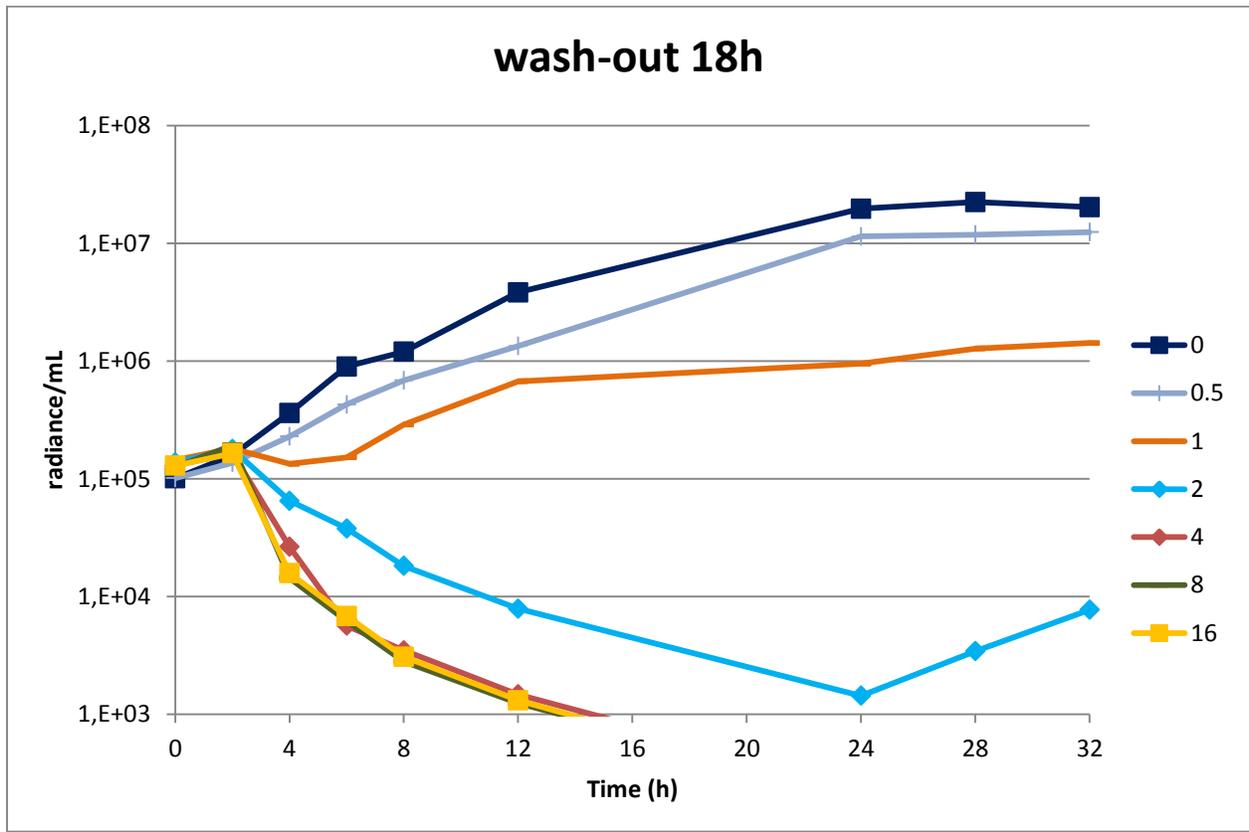
47. Thorn RM, Nelson SM, Greenman J. Use of a bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* strain within an in vitro microbiological system, as a model of wound infection, to assess the antimicrobial efficacy of wound dressings by monitoring light production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007 Sep;51(9):3217-24.
48. Anthony TU, Rubin LG. Stability of antibiotics used for antibiotic-lock treatment of infections of implantable venous devices (ports). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999 Aug;43(8):2074-6.
49. Tomasello C, Leggieri A, Cavalli R, Di Perri G, D'Avolio A. In Vitro Stability Evaluation of Different Pharmaceutical Products Containing Meropenem. *Hospital pharmacy*. 2015 Apr;50(4):296-303.
50. Mudaliar UA, Furyk NI, Moritz VA, Mayall BC. In vitro activity of meropenem compared to nine other antimicrobial agents: importance of its stability when used in agar dilution systems. *Pathology*. 1996 Nov;28(4):352-5.
51. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *The Lancet Infectious diseases*. 2015 Feb;15(2):225-34.
52. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Current opinion in infectious diseases*. 2009 Dec;22(6):535-43.
53. Muller C, Plesiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Mar;55(3):1211-21.
54. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007 Oct;51(10):3531-6.
55. Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990 Jan;34(1):52-7.
56. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Kohler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Mar 5;279(10):8761-8.
57. Dahlberg C, Chao L. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics*. 2003 Dec;165(4):1641-9.
58. Kugelberg E, Lofmark S, Wretling B, Andersson DI. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005 Jan;55(1):22-30.
59. Spratt BG. Antibiotic resistance: counting the cost. *Current biology : CB*. 1996 Oct 1;6(10):1219-21.
60. Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science (New York, NY)*. 2000 Feb 25;287(5457):1479-82..
61. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet Infectious diseases*. 2003 Jan;3(1):13-21.

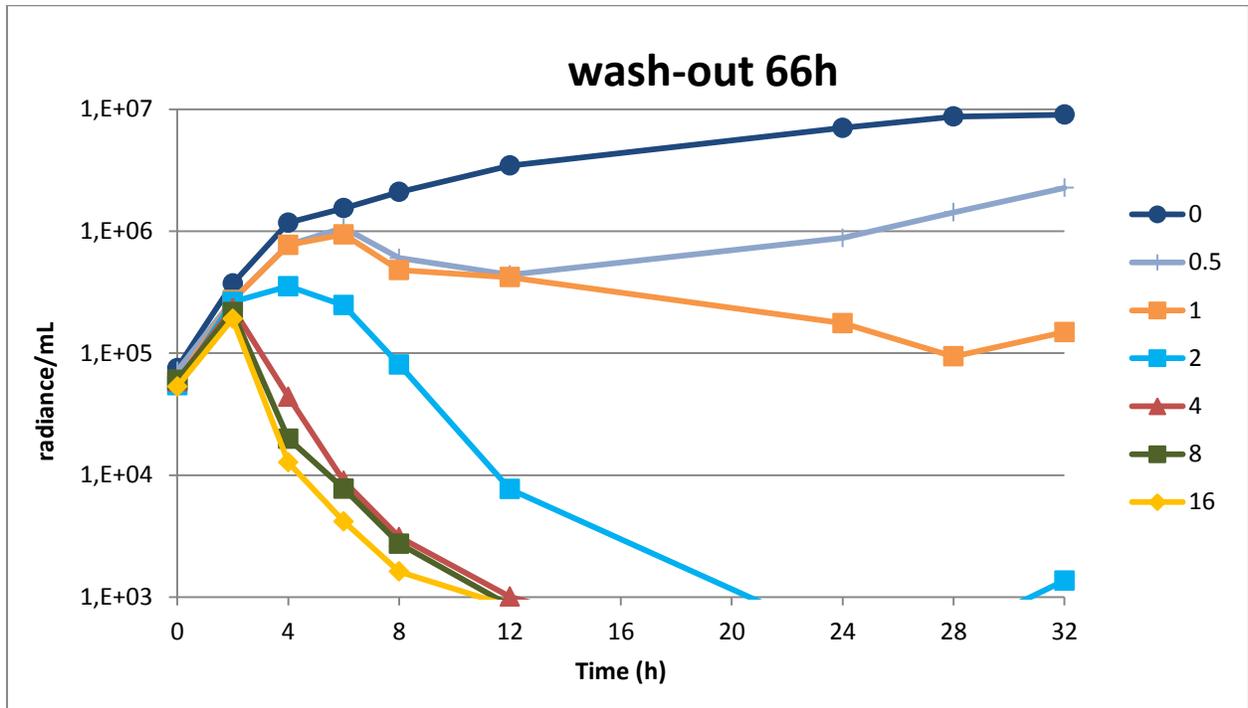
62. Hu Y, Li L, Li W, Xu H, He P, Yan X, et al. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a meta-analysis of retrospective and prospective studies. *International journal of antimicrobial agents*. 2013 Dec;42(6):492-6.
63. Chamot E, Boffi El Amari E, Rohner P, Van Delden C. Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003 Sep;47(9):2756-64.

ANNEXES

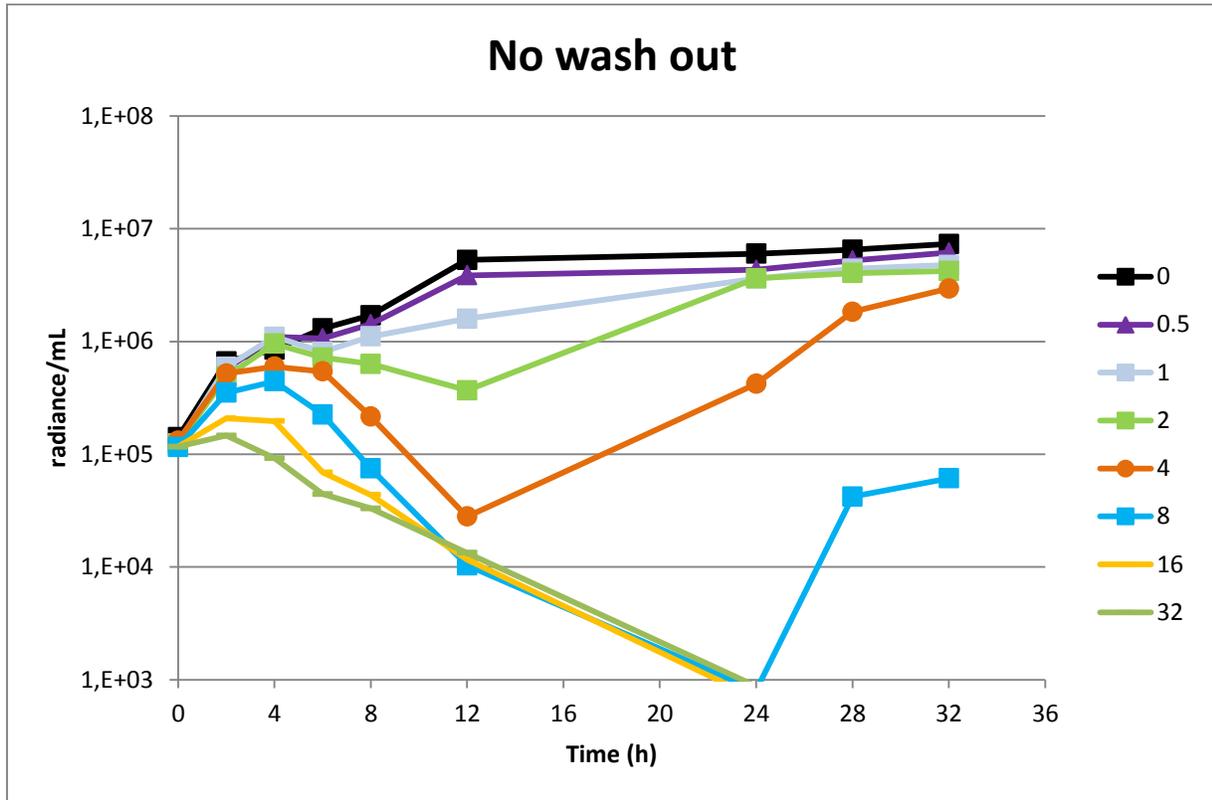
ANNEXE 1. 2èmes courbes de bactéricidie sans wash-out, et après wash-out de 18h, 42h et 66h.
Evolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de ciprofloxacine (en mg/L) en fonction du temps.

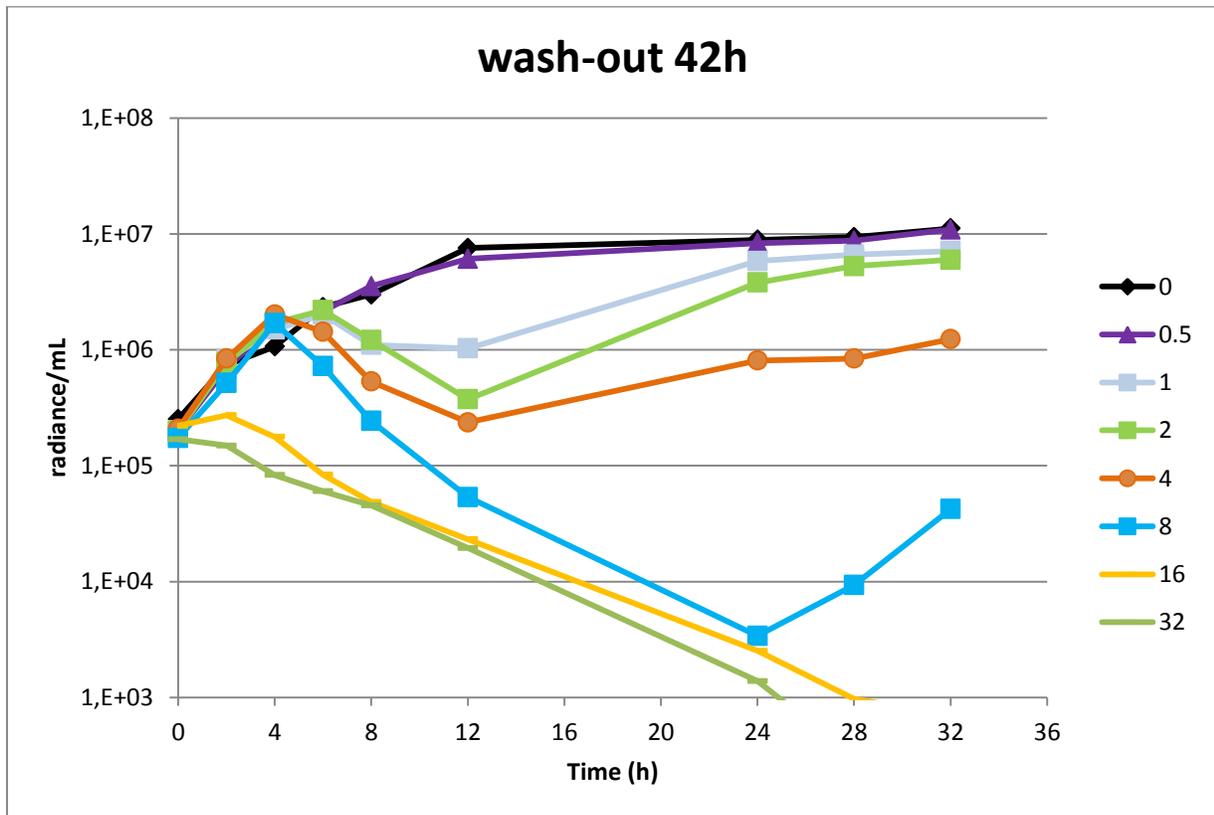
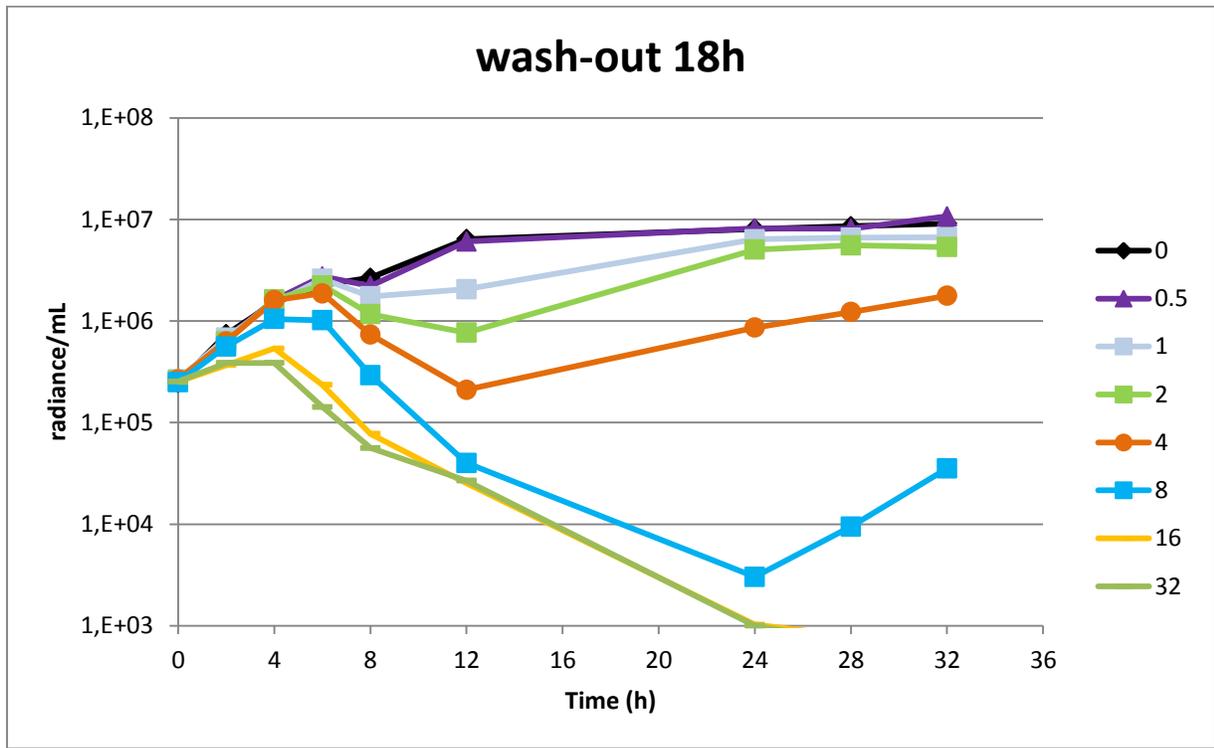


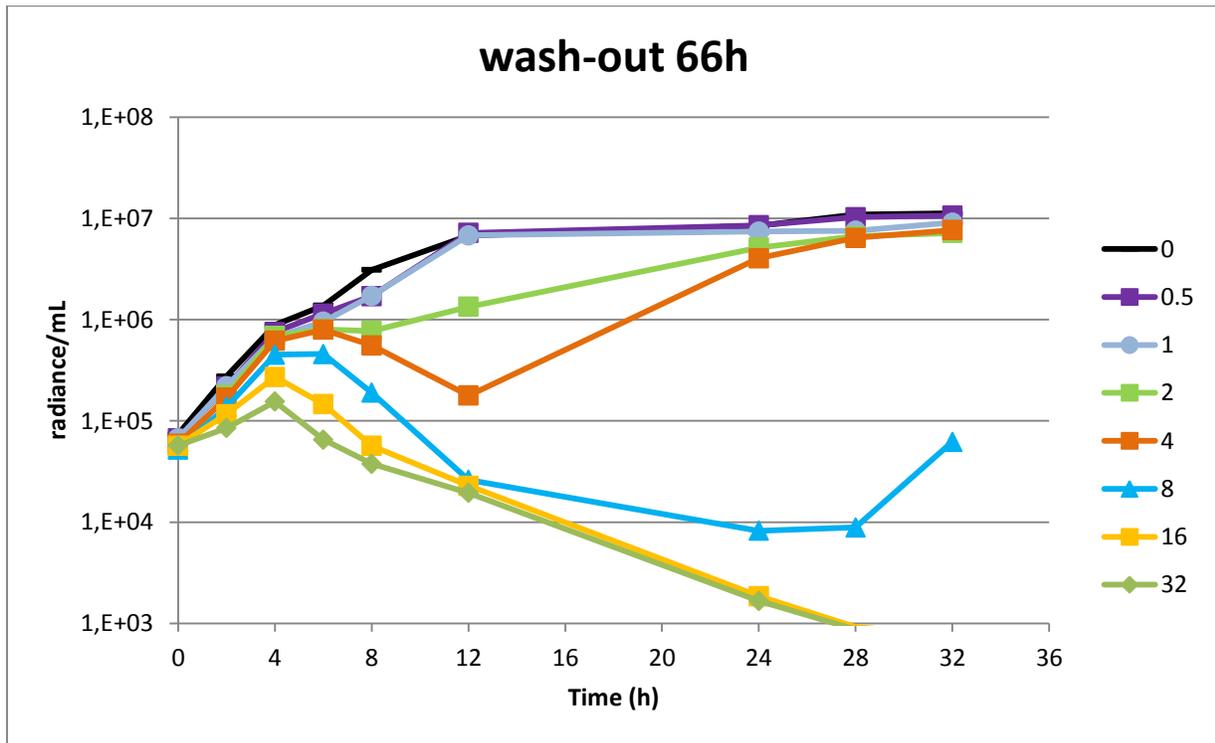




ANNEXE 2. 2èmes courbes de bactéricidie sans wash-out, et après wash-out de 18h, 42h et 66h. Evolution de la bioluminescence (radiance/mL) de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à différentes concentrations de méropénème (en mg/L) en fonction du temps.

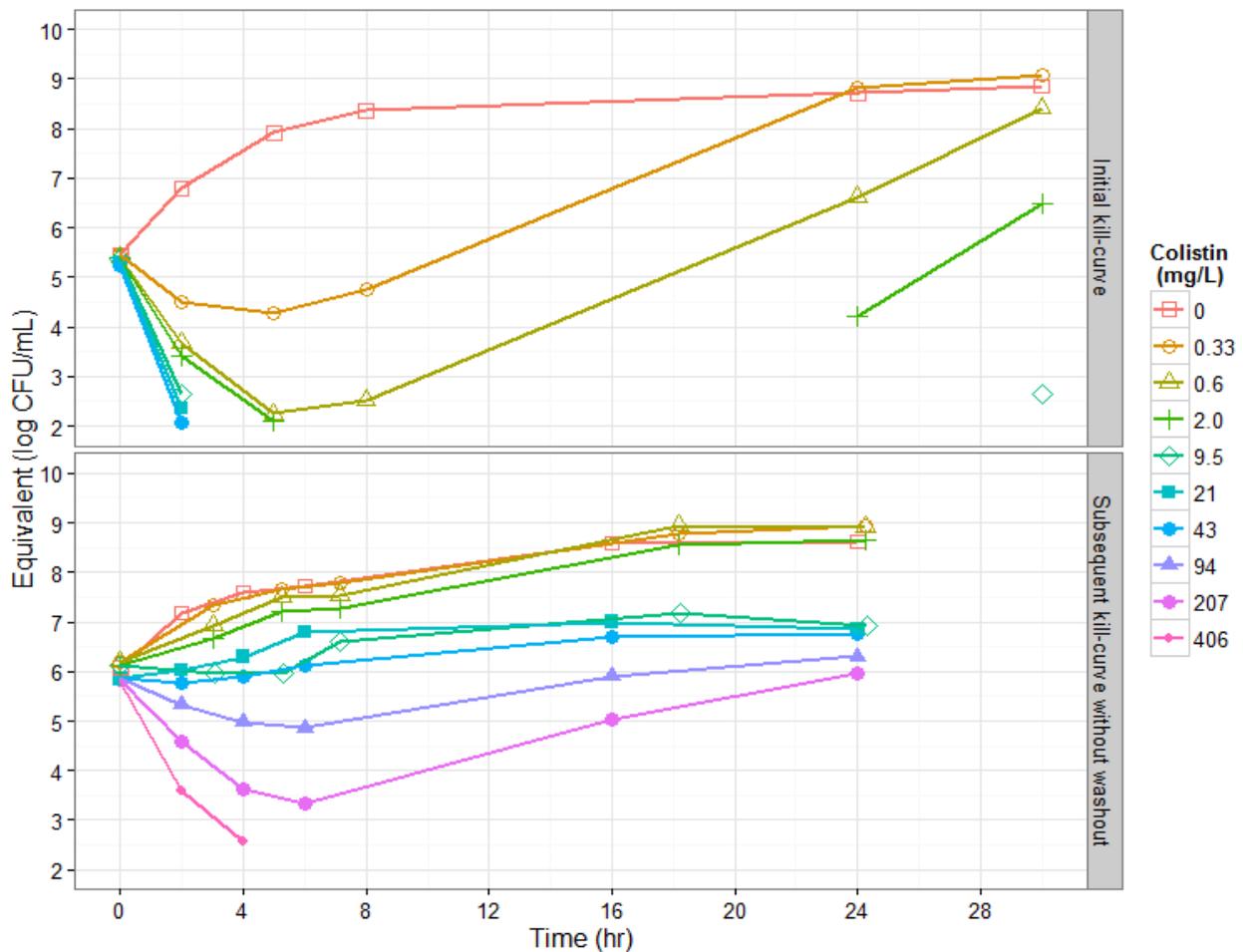


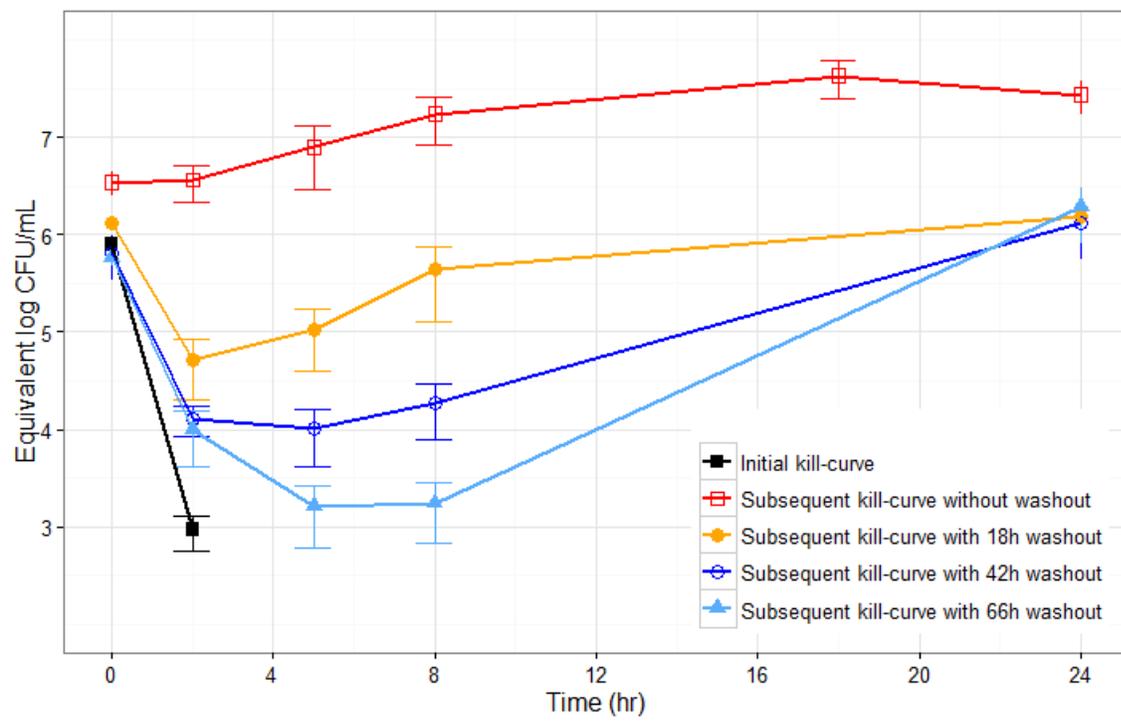




ANNEXE 3. Étude similaire de Jacobs et al. (Travaux en cours) avec la Colistine sur la même souche bioluminescente de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Occasion 1 : Adaptation initiale rapide et dépendante de la concentration
- Occasion 2 : nécessité concentration x32-64 pour obtenir résultats similaires à occasion 1
- Restauration progressive de la sensibilité de la bactérie en fonction de la durée du wash-out





RESUME

OBJECTIF : Analyser la cinétique d'apparition de résistance au cours du temps d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa in vitro* en présence de différentes concentrations de ciprofloxacine ou de méropénème par mesure de bioluminescence et évaluer la restauration de la sensibilité de la bactérie en l'absence d'antibiotique. L'objectif secondaire est de déterminer les mécanismes de résistances impliquées dans la résistance de la bactérie.

METHODES : Réalisation de deux courbes de bactéricidie consécutives *in vitro* à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 rendue bioluminescente par insertion de l'opéron luxCDABE en présence de différentes concentrations de ciprofloxacine et de méropénème. La quantification bactérienne se fait par mesures de bioluminescence à partir de IVIS® Lumina XR (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) aux temps 0, H2, H4, H6, H8, H12, H24, H28 et H32. Les 2^{èmes} courbes de bactéricidie sont réalisées suivant ou non une période de culture bactérienne en l'absence de ciprofloxacine ou de méropénème (périodes de wash-out de 18h, 42 et 66h).

RESULTATS : En présence de ciprofloxacine et de méropénème, le *Pseudomonas aeruginosa* acquiert des résistances entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure se traduisant par une repousse des bactéries. La seconde exposition à l'antibiotique permet l'acquisition d'une résistance de plus haut niveau. Les mécanismes de résistance font intervenir la surproduction de la pompe d'efflux MexCD-OprJ pour la ciprofloxacine et par la répression du gène OprD pour le méropénème. Une période de wash-out allant jusqu'à 66h ne permet pas de restaurer la sensibilité de la bactérie.

CONCLUSION : Le *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'acquérir rapidement des résistances stables à la ciprofloxacine et au méropénème. Les mécanismes de résistance font intervenir des mutations sur les pompes d'efflux pour la ciprofloxacine et sur la porine OprD pour le méropénème. Les résistances se font par palier jusqu'à des hauts niveaux de résistance. La bioluminescence apparait comme un nouvel outil dans la recherche en temps réel la vitesse d'apparition et le niveau de résistances aux antibiotiques.

Mots clés : *Pseudomonas Aeruginosa*, bioluminescence, pharmacocinétique/pharmacodynamie, ciprofloxacine, méropénème

ABSTRACT

OBJECTIVE: Describe the effect of ciprofloxacin and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* by bioluminescence and evaluate the restoration of the sensibility of the bacteria without antibiotic. Determine the mechanisms of resistance.

METHODS: Realisation of two consecutive kill curves with a strain of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 made bioluminescent by insertion of operon *luxCDABE* with different concentrations of ciprofloxacin and meropenem. At 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 28 and 32h, bioluminescence was measured by a photon counter IVIS® Lumina XR (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). The second time kill curves were done after a period of growth in an antibiotic-free broth without antibiotic (wash-out 18h, 42h and 66h).

RESULTS: With ciprofloxacin and meropenem, an initial bioluminescent decay followed by regrowth was observed between 12 and 24h attesting the rapid emergence of resistance. The second kill curves elicited the apparition of high level of resistance. This phenomenon was mainly due to an overexpression of the MexCD-OprJ efflux pumps for ciprofloxacin whereas an overproduction of active efflux pump along with a modification of OprD dominated in meropenem resistance. There was no restoration of sensibility of the bacteria after 66h of growth without antibiotic.

CONCLUSION: *Pseudomonas aeruginosa* can develop rapidly a stable resistance to ciprofloxacin and meropenem. This phenomenon was mainly due to an overexpression of the MexCD-OprJ efflux pumps for ciprofloxacin and overproduction of active efflux pump and a modification of the OprD porine for meropenem resistance. These mechanisms resulted in high level of resistances. Bioluminescence is a new method to evaluate the rate and the extent of resistance development, such as to evaluate the restoration of sensibility over the time.

Key words: *Pseudomonas Aeruginosa*, bioluminescence, pharmacokinetic/pharmacodynamic, ciprofloxacin, meropenem

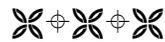


UNIVERSITE DE POITIERS



Faculté de Médecine et de
Pharmacie

SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

