

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2014

N°163

**MEMOIRE DE MASTER II EN MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET
APPLIQUEE**

**TITRE : ETUDE PREDICTIVE DE L'EFFET BACTERICIDE
D'ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES SUR DES SOUCHES DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA MULTI-RESISTANTES**

Présenté et soutenu publiquement le 21 janvier 2014

Par **Dr SOKHNA FALL**

Née le 27 Septembre 1982 à Nouakchott (MAURITANIE)

MEMBRES DU JURY

Président

M. Cheikh Saad-Bouh BOYE

Professeur

Membres

Mme Coumba TOURE KANE

Professeur

M. Bay Karim DIALLO

Professeur

M. Gora M'BAYE

Maitre de conférences agrégé

REMERCIEMENTS

Je remercie toute ma famille au sens large, ma belle famille, mes amis ainsi que toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à l'élaboration de ce travail.

DEDICACE

Ce travail est entièrement et exclusivement dédié à celui qui aura été un père pour moi sans en avoir le devoir.

Tonton Cheikh notre tristesse est profonde, grande et incommensurable. Au-delà de notre famille un éducateur est parti, quelqu'un qui croyait en la jeunesse et en ses promesses, mais surtout quelqu'un qui aidait son prochain sans contrepartie ou toutes formes de considérations. Tu es notre Mandela à nous. Que le bon Dieu te rétribue tous tes actes de bonté et l'amour que tu avais pour l'humanité. L'affection que tu me portais était telle que tu refusais de voir ne serait ce qu'une once de défaut en moi : je te promets d'essayer d'être la personne que tu voyais en moi. Que le paradis soit ta demeure éternelle.

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre Maître et Directeur de mémoire Monsieur le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Vous nous avez fait un immense honneur en nous confiant ce travail. Vous êtes un Homme dont la simplicité, l'humilité, l'abord facile et la disponibilité forcent l'admiration. Nous espérons avoir été à la hauteur de vos attentes. Soyez assuré, cher Professeur, de notre attachement indéfectible et de notre parfaite reconnaissance.

A notre Maître et Juge, le Professeur Mme Coumba TOURE KANE

Tout au long de notre formation universitaire, nous avons été séduits par votre simplicité et votre sympathie. Vous êtes particulièrement proche de vos étudiants, ces qualités font de vous un maître aimé et respecté. Votre présence au sein de notre jury nous honore au plus haut point.

A notre maître et juge Mr le Professeur Bay Karim DIALLO

Nous avons apprécié vos qualités de pédagogue, votre rigueur dans le travail, mais surtout votre générosité. Vous avez spontanément et avec beaucoup de courtoisie accepté de nous orienter. Veuillez bien trouver ici la preuve de notre admiration, de notre reconnaissance, et croire en l'assurance de notre fidèle attachement.

A notre Maître et Juge Maître de Conférences Agrégé Mr Gora M'BAYE

Nous avons apprécié votre sympathie et votre grande rigueur scientifique. Vous vous êtes particulièrement investi dans l'élaboration de ce travail et nous vous remercions pour cela. Votre présence au sein de notre jury nous honore au plus haut point. Veuillez agréer cher maître, l'expression de notre affection et de notre profonde gratitude.

« Par délibération, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation».

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : détermination de la CMI par la macrométhode.....	page 13
<u>Figure 2</u> : représentation de la méthode de l'échiquier.....	13
<u>Figure 3</u> : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour une concentration croissante de B et A=8µg/ml.....	18
<u>Figure 4</u> : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour des concentrations croissantes de A et B=0,5 µg /ml.....	19
<u>Figure 5</u> : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour une concentration fixe de A=8µg/ml et B croissante.....	20
<u>Figure 6</u> : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour des concentrations croissantes de A et B =1µg/ml.....	21
<u>Figure 7</u> : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B), pour des concentrations croissantes de B et A=8 µg/ml	22
<u>Figure 8</u> : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B) pour des concentrations de A croissantes et B= 0,25µg/ml	23

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : caractères biochimiques de <i>P. aeruginosa</i>	page 5
<u>Tableau II</u> : effet bactériostatique de l'association ceftriaxone-amikacine.....	14
<u>Tableau III</u> : effet bactériostatique de l'association ceftriaxone-ciprofloxacine.....	15
<u>Tableau IV</u> : points intéressants de l'association ceftriaxone-amikacine.....	17
<u>Tableau V</u> : données de l'étude bactériostatique pour le point 1.....	17
<u>Tableau VI</u> : données de l'étude bactériostatique pour le point 2.....	19
<u>Tableau VII</u> : points intéressants de l'association ceftriaxone-ciprofloxacine.....	21
<u>Tableau VIII</u> : résultats de l'étude bactériostatique pour le point β	21

LISTE DES ABREVIATIONS

-	: négatif
%	: pour cent
+	: positif
+/-	: caractère non constant
<	: inférieur
>	: supérieur
≤	: inférieur ou égal
°C	: degrés Celsius
µg	: microgramme
ADH	: arginine déshydrogénase
ADN	: acide désoxyribonucléique
AMK	: amikacine
CC	: citrate de Christensen
CI	: concentration inhibitrice
CIP	: ciprofloxacine
CMB	: concentration minimale bactéricide
CMI	: concentration minimale inhibitrice
CRO	: ceftriaxone
CS	: citrate de Simmons
ESC	: esculine
FIC	: fraction inhibitory concentration
GEL	: gélatinase
GLU	: glucose
H	: heure
H₂S	: hydrogène sulfuré
IND	: indole
LAC	: lactose
LDC	: lysine décarboxylase

MAL : malonate
ml : millilitre
MLS : macrolide streptogramine lincosamine
NIT : nitrate réductase
ODC : ornithine décarboxylase
ONPG : ortho-nitrophényl β -D-galactopyranoside
PDA : phényle alanine désaminase
PSE : pseudomonas specific enzyme
tARN : acide ribonucléique de transfert
UCAD : université Cheikh Anta Diop
URE : uréase
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VP : Voges Proskauer

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
I. Rappels sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
I.1. Caractères généraux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	2
I.1.1. Définition.....	2
I.1.2. Classification.....	2
I.1.3. Habitat.....	2
I.1.4. Pouvoir pathogène.....	3
I.2. Caractères bactériologiques.....	3
I.2.1. Caractères morphologiques.....	3
I.2.2. Caractères cultureux.....	3
I.2.3. Caractères biochimiques.....	4
I.2.4. Caractères antigéniques et marqueurs épidémiologiques.....	4
II. Rappels sur les antibiotiques.....	6
II.1. Définition.....	6
II.2. Classification.....	7
II.2.1. Les β-lactamines.....	7
II.2.2. Les aminosides.....	7
II.2.3. Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS).....	7
II.2.4. Les cyclines.....	7
II.2.5. Les phénicolés.....	7
II.2.6. Les quinolones.....	8
II.2.7. Les polypeptides.....	8
II.2.8. Les sulfamides.....	8
II.3. Notion de résistance et associations d'antibiotiques.....	8
II.4. Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i>.....	8
III. Quelques outils de la modélisation prédictive.....	10
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	11
I. Méthodologie.....	11
I.1. Contexte.....	11
I.2. Problématique.....	11

I.3. Objectifs.....	11
I.4. Cadre d'étude.....	12
I.5. Ressources financières.....	12
I.6. Chronogramme.....	12
I.7. Souches bactériennes.....	12
I.8. Antibiotiques testés.....	12
I.9. Détermination de l'effet bactériostatique.....	12
I.10. Détermination de l'effet de l'effet bactéricide.....	15
II. Résultats.....	17
II.1. Résultats de l'association amikacine-ceftriaxone	17
II.1.1. Association amikacine (A)- ceftriaxone (B) pour A=8 µg /ml et B = 0,5 µg /ml...17	
II.1.2. Association amikacine (A)-ceftriaxone(B) pour A=8µg/ml et B = 1µg/ml	19
II.2. Association ceftriaxone(A)-ciprofloxacin(B) pour A= 8µg/ml et B=0,25µg/ml.....	21
III. Commentaires	24
III.1. Souches bactériennes.....	24
III.2. Choix des associations.....	24
III.3. Etude de l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques.....	25
III.4. Choix des variables.....	25
III.5. Allure de la courbe.....	26
III.6. Limites de l'étude.....	26
CONCLUSION.....	27
BIBLIOGRAPHIE.....	28

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif qui se présente sous forme de bacilles fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire. Elle est dépourvue de spore et de capsule, est aérobic stricte avec un métabolisme non fermentaire. Elle est fréquemment retrouvée dans l'environnement notamment dans le milieu hospitalier où elle est souvent à l'origine d'infections dites nosocomiales [2, 8, 14, 19].

P. aeruginosa est caractérisé par des mécanismes de résistance aux antibiotiques qui lui sont particuliers et par la sélection fréquente de mutants résistants chez les patients sous traitement [1]. Ce germe occupe donc une place importante en infectiologie notamment dans les infections nosocomiales [20].

L'optimisation de l'utilisation des antibiotiques impose la recherche d'une efficacité maximale, de conséquences écologiques minimales sur l'évolution des flores bactériennes et d'une moindre toxicité. Dans le but d'augmenter la bactéricidie et de prévenir l'émergence de mutants résistants, les antibiotiques sont souvent utilisés en association [1].

L'efficacité de l'action d'un antibiotique ou d'une association d'antibiotiques peut être jugée à deux niveaux :

- la bactériostase, qui correspond à l'inhibition des capacités de croissance de la bactérie par les antibiotiques;
- la bactéricidie, qui correspond à la mort des bactéries par action des antibiotiques [20].

Au cours du traitement des infections à *P. aeruginosa*, il est recherché un effet bactéricide grâce à des associations d'antibiotiques [1, 17]. Cependant, lors de la détermination de la sensibilité des germes en pratique courante, seul l'effet bactériostatique est recherché et rares sont les associations qui sont testées.

C'est dans ce contexte que l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec, a cherché des moyens de prédiction de l'effet bactéricide d'associations d'antibiotiques.

Notre étude va porter sur la sensibilité de *P. aeruginosa* vis-à-vis de deux associations d'antibiotiques :

- ceftriaxone-amikacine ;
- ceftriaxone-ciprofloxacine.

Ce travail sera effectué grâce à des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes et aura pour objectif la détermination de modèles de prédiction mathématiques de l'effet bactéricide des associations d'antibiotiques à partir des résultats de l'effet bactériostatique.

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. RAPPELS SUR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

I.1. Caractères généraux de *Pseudomonas aeruginosa*

I.1.1. Définition

Pseudomonas aeruginosa, est une bactérie à Gram négatif qui se présente sous forme de bacilles fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche). Dépourvue de spore et de capsule, elle apparaît généralement isolée ou en diplobacille [19].

Cette bactérie, très répandue dans la nature, est caractérisée par sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques [2].

I.1.2. Classification

Le genre *Pseudomonas* est un genre pléthorique, avec 160 espèces répertoriées en 1957. En réalité, beaucoup de ces souches ne sont que des *nomenspecies* mal connues et dont l'espèce-type ne peut être définie. Deux cent soixante cinq espèces étaient répertoriées, mais l'édition de 1974 du Bergey's Manual retenait 29 espèces dont 13 d'intérêt médical. La nouvelle édition de 1984 du Bergey's Manual retient 30 espèces principales. La famille des *Pseudomonadaceae* regroupe actuellement 5 genres : *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Frateuria*, *Xanthomonas* et *Zoogloea* [2].

Un certain nombre d'études génétiques ont été réalisées et ont permis de diviser le genre *Pseudomonas* en 5 groupes d'affinités génétiques différentes : groupes d'homologies d'après les hybridations ADN-rARN et ADN-ADN [2]:

- Groupe génomique I : groupe *fluorescens* + groupe *stutzeri* + groupe *alcaligenes* ;
- Groupe génomique II : groupe *pseudomallei* + *cepacia* ;
- Groupe génomique III : groupe *acidovorans* ;
- Groupe génomique IV : groupe *diminuta-vesicularis* ;
- Groupe génomique V : groupe *maltophilia* (*Xanthomonas*).

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type du genre mais aussi la plus pathogène.

I.1.3. Habitat

P. aeruginosa vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie résiste mal à la dessiccation. Elle peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. Elle peut survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, sur des supports inertes surtout s'ils sont humides. Elle est très fréquemment retrouvée dans le milieu hospitalier [2, 8].

I.1.4. Pouvoir pathogène

Ce germe est le plus souvent rencontré dans des produits pathologiques provenant de malades aux systèmes de défense déficients (immunodéprimés, VIH, greffés, cancéreux, leucémiques,...); mais également chez les patients des services de réanimation ou de soins intensifs [24].

L'émergence de cette bactérie est liée à sa grande fréquence dans les infections nosocomiales; mais surtout, du fait de sa multi-résistance aux antibiotiques. C'est ce qui est à l'origine de la difficulté de son isolement et de son identification [14].

La virulence de *Pseudomonas* est en grande partie liée à la présence de slime.

La bactérie pyocyanique est incriminée dans divers types d'infections :

- infections pulmonaires primitives ou secondaires à une septicémie, elle est fréquente dans la mucoviscidose ;
- infections urogénitales, toujours secondaires à un mécanisme d'exploration ou d'évacuation de ces voies ;
- infections ostéo-articulaires dans lesquelles elle est incriminée dans 10% des cas ;
- infections oculaires, *P. aeruginosa* vit sous forme saprophyte au niveau des culs de sac conjonctivaux [19].

Elle est également responsable de plaies, de septicémies, de diverses suppurations, d'infections génitales, de méningites, d'entérites, d'infections de la sphère ORL, etc [18, 19].

I.2. Caractères bactériologiques

I.2.1. Caractères morphologiques

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif. Elle se présente sous forme d'un bacille fin, droit et très mobile grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche), dépourvue de spore et de capsule. Elle apparaît la plupart du temps isolée ou groupée avec d'autres bacilles en diplobcilles [18].

I.2.2. Caractères culturels

P. aeruginosa pousse facilement sur les milieux ordinaires en développant une odeur aromatique de seringa. En milieu solide trois types de colonies peuvent être observés [8, 10, 14]:

- colonies larges de 2-3 mm de diamètre à bords réguliers, surface plus ou moins rugueuse, plates sur les bords et un peu bombées au centre ayant un aspect d'œuf sur le plat ;
- colonies plus petites, lisses, bombées à bords réguliers ;
- colonies muqueuses bombées, coalescentes rencontrées chez les souches produisant du slime.

Au sein d'une culture, les 3 types de colonies peuvent être rencontrés simultanément.

La culture est effectuée à 37°C mais elle est possible à 41°C.

C'est une bactérie non exigeante, qui en culture, sur milieu gélosé, élabore des pigments notamment :

- la pyocyanique (de couleur bleu-vert) hydrosoluble et spécifique de *P. aeruginosa*;
- la pyoverdine (verte) soluble dans le chloroforme ;
- d'autres pigments hydrosolubles sont produits de façon transitoire tels que la pyomélanine (brune) et la pyorubrine (rouge).

Elle est aérobic stricte (exigeante en oxygène). Elle respire en aérobiose par phosphorylation oxydative.

P. aeruginosa, sur des surfaces biotiques ou abiotiques est capable de produire des agrégats structurés ou biofilms, constitués d'une matrice essentiellement composée de polysaccharides complexes dans laquelle sont insérées les bactéries [19].

I.2.3. Caractères biochimiques [8]

La présence d'une oxydase est recherchée sur des cultures en milieu gélosé exempt de sucres fermentescibles ou de sang. Cette réaction peut se faire à l'aide de disques prêts à l'emploi du commerce, imprégnés de réactif (diméthyl-para-phénylène-diamine) et conservés à 4°C.

La recherche de la catalase se fait en mettant en contact une goutte d'eau oxygénée avec une colonie bactérienne et d'observer ensuite la présence de bulles : *P. aeruginosa* ne possède pas de catalase.

La détermination du caractère non fermentaire est effectuée par l'étude de l'acidification des sucres. Les bactéries non fermentaires peuvent être reconnues grâce à leur aspect sur le milieu Kligler Hajna : elles poussent en pente non sur culot, elles n'acidifient pas le milieu et ne produisent pas de gaz.

P. aeruginosa est capable d'utiliser un nitrate comme accepteur final d'électrons en l'absence d'oxygène.

La recherche d'une uréase et la production d'indole se font sur milieu urée-indole.

La recherche de l'arginine dihydrolase (ADH), de la lactate décarboxylase (LDC) et de l'ornithine décarboxylase (ODC) peuvent se faire sur milieu contenant l'acide aminé étudié ; du glucose et un indicateur coloré.

L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculétine qui donne une coloration noire en présence de sels de fer, *P. aeruginosa* n'entraîne pas la lyse de l'esculine.

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone par les bactéries, se traduit par une alcalinisation du milieu (virage au bleu) (**tableau I**).

TABLEAU I: caractères biochimiques de *P. aeruginosa* [2, 14, 21]

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+/-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-

I.2.4. Caractères antigéniques et marqueurs épidémiologiques

P. aeruginosa possède des antigènes O et H, qui permettent de distinguer différents types.

Les antigènes somatiques O, permettent de distinguer 16 groupes différents, numérotés de 1 à 16, qui permettent de classer environ 95% des souches rencontrées pour le genre *Pseudomonas* [18, 23].

Les antigènes O:1 à O:11 sont les plus fréquents; le sérotype O:12 présente la particularité d'être le plus résistant aux antibiotiques et est le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales.

Les antigènes H flagellaires existent également sous plusieurs types. Présents chez les formes mobiles des bactéries à Gram négatif, ils sont de nature protéique et possèdent des propriétés opposées à celles des antigènes O [23].

Plusieurs systèmes de marquage épidémiologiques sont utilisables pour *P. aeruginosa* :

- la sérotypie des antigènes: possible grâce aux antisérums commercialisés, la mise en évidence des antigènes se fait par une réaction d'agglutination ;
- la biotypie : qui consiste à utiliser les caractères métaboliques des souches pour établir un marquage en tenant compte soit des réactions aberrantes (telles que *P. aeruginosa* ONPG +) ou alors de la variation des réactions en fonction des souches ;
- la sensibilité aux antibiotiques permet également de comparer les souches mais ce marqueur est peu discriminant surtout dans les pathologies chroniques chez des patients soumis à des antibiothérapies répétées, qui peuvent avoir une influence sur le résultat de l'antibiogramme [8, 10].

II. RAPPELS SUR LES ANTIBIOTIQUES

II.1. Définition

Les antibiotiques sont, au sens strict, des agents antibactériens naturels d'origine biologique et inhibant la croissance d'autres micro-organismes. Ils sont élaborés par des micro-organismes (champignons et diverses bactéries). Cependant, avec le développement des méthodes de synthèse et d'hémisynthèse, cette définition trop réduite a été modifiée. On appelle antibiotique « toute substance qui, à faible concentration, inhibe la croissance bactérienne ».

Un antibiotique est donc une substance naturelle (ex : Pénicilline G), semi-synthétique (ex : ampicilline) ou synthétique (ex : chloramphénicol) douée d'une activité antibactérienne à l'échelon moléculaire s'exerçant au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques ou d'un équilibre physico-chimique [5, 11, 15, 25].

Les réactions inhibées par les antibiotiques sont surtout des réactions de synthèse :

- synthèse protéique ;
- synthèse du peptidoglycane ;
- synthèse des acides nucléiques ;
- synthèse des folates.

Pour être efficace, l'antibiotique doit satisfaire les trois conditions suivantes :

- pénétration à l'intérieur de la bactérie ;
- intervention au niveau d'une cible à l'intérieur de cette bactérie ;
- l'antibiotique ne doit pas être inactivé par des enzymes pouvant être synthétisées par cette bactérie.

L'action de l'antibiotique se traduit alors soit :

- par des modifications de la croissance, dans ce cas l'antibiotique est bactériostatique ;
- par des modifications de la capacité de survie, cas où l'antibiotique est bactéricide.

II.2. Classification [15]

II.2.1. Les β -lactamines

Leur structure chimique comprend un cycle β -lactame responsable de l'activité antibactérienne. On distingue 3 familles principales : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames. Elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est un constituant de la paroi des bactéries. On en distingue plusieurs sous familles :

- Les pénicillines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle thiazolidine. Dans cette sous famille, les groupes les plus importants sont : les pénicillines naturelles (les groupes G et V), les pénicillines du groupe M (cloxacilline), les aminopénicillines (amoxicilline), les carboxypénicillines (carbénicilline), les acyl-ureidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmécillinam).

- Les céphalosporines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle dihydrothiazidique. Elles sont constituées de 4 générations : 1^{ère} génération (céfalotine), 2^{ème} génération (céfoxitine), 3^{ème} génération (céftriaxone) et 4^{ème} génération (cefpirome).

- Les monobactames

Elles sont caractérisées par une structure monocyclique et la présence d'un groupement sulfonyle. Le chef de file est l'aztréonam.

II.2.2. Les aminosides

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre possédant une structure aminoglycosidique. Les aminosides inhibent la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous-unité 30 S du ribosome.

Les aminosides sont divisés en 3 générations : 1^{ère} génération (kanamycine), 2^{ème} génération (amikacine) et 3^{ème} génération (netilmicine).

II.2.3. Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)

Les macrolides (tel que l'érythromycine), les lincosamides (lincomycine) et synergistines (pristinamycine) ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, les mycoplasmes et les bacilles à Gram négatifs anaérobies. Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50 S du ribosome.

II.2.4. Les cyclines

Les principaux produits sont: les tétracyclines, les minocyclines et la doxycycline. Elles inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30 S.

Les tétracyclines ont une activité antibiotique large, seulement bactériostatique.

II.2.5. Les phénicolés

Ce sont des bactériostatiques à large spectre dérivés de l'acide dichloro-acétique. Ils inhibent la synthèse protéique des bactéries en se fixant au niveau de la sous-unité 50 S des ribosomes et en empêchant la transpeptidation de l'ARN de transfert.

II.2.6. Les quinolones

Les quinolones de 1^{ère} génération ne sont pratiquement actifs que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries et ne sont indiquées que dans le traitement des infections urinaires. (Exemple : acide nalidixique).

Les produits les plus récents ont une plus grande activité par leur spectre large et leur pharmacocinétique (ciprofloxacine, péfloxacin, norfloxacine,...). Les fluoroquinolones inhibent la synthèse des acides nucléiques par le blocage de l'ADN gyrase.

II.2.7. Les polypeptides

Ce sont des antibiotiques bactéricides (colistine, polymyxine B). Les polypeptides agissent au niveau de la membrane cytoplasmique de certains bacilles à Gram négatif.

II.2.8. Les sulfamides

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre (sulfadiazine, sulfaguanidine). Leur mode d'action est lié à une inhibition de la dihydroptéroate synthétase en raison d'une analogie structurale avec l'acide para-aminobenzoïque.

II.3. Notion de résistance et associations d'antibiotiques

La résistance microbienne est la possibilité pour une bactérie, de se multiplier in vivo, en présence de concentrations d'antibiotiques supérieures à celles qui permettent normalement d'inhiber la croissance des souches bactériennes de la même espèce, ceci par modification de son capital génétique. Cette résistance peut ne pas se manifester sur le plan clinique.

Une résistance peut être naturelle ou constitutionnelle dans ce cas elle est chromosomique. La résistance peut être acquise par mutation ou d'origine plasmidique. La résistance peut également être clinique lorsqu'elle est due à des facteurs intervenant in vivo.

Il est intéressant d'associer des antibiotiques pour diverses raisons [4, 8, 12, 15] :

- l'élargissement du spectre qui peut s'avérer utile aussi bien pour les infections nosocomiales que communautaires ;
- la prévention de l'émergence des mutants résistants car la probabilité d'obtenir un mutant résistant à deux antibiotiques est très faible ;
- l'obtention d'une synergie qui correspond à une meilleure activité de l'association d'antibiotiques par rapport à chacune des molécules prise isolément.

II.4. Sensibilité de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa n'est sensible qu'à quelques antibiotiques et le choix des molécules pour le traitement est donc important. Malgré l'efficacité de certains, le succès n'est souvent que relatif et l'effort de lutte contre les infections à la bactérie pyocyanique doit passer avant tout par la prévention : mesures d'hygiène [19].

P. aeruginosa est résistant à de nombreux antibiotiques : benzylpénicillines, aminopénicillines, céphalosporines de 1^{ère} et de 2^{ème} générations, phénicolés, tétracyclines, triméthoprime. Cette résistance répond à 3 mécanismes [19]:

- l'imperméabilité de la paroi à certains antibiotiques entraîne une résistance naturelle pour les pénicillines M (méthicilline, cloxacilline) ou encore une résistance acquise faisant intervenir des porines vis-à-vis de la ticarcilline, la cefsulodine et l'imipénème ;
- l'inactivation enzymatique par les 17 bêta-lactamases plasmidiques qui comprennent plusieurs types comme les PSE = Pseudomonas Spécific Enzyme, PSE-1 et PSE-4, les carbénicillinases, les oxacillinases ;
- la résistance naturelle aux premières bêta-lactamines se fait par synthèse d'une bêta-lactamase chromosomique habituellement réprimée (Case = céphalosporinase inductible de Sabath) ;
- la modification de l'affinité de l'antibiotique pour la cible.

Il existe au moins une trentaine de plasmides de résistance connus chez *P. aeruginosa* pouvant coder pour une multi-résistance touchant les bêta-lactamines et les aminosides. Ils forment une dizaine de groupes d'incompatibilité. Ces groupes se distribuent schématiquement en trois catégories à savoir des plasmides spécifiques du genre *Pseudomonas*, des plasmides pouvant circuler entre *Pseudomonas* et entérobactéries et des plasmides habituels des entérobactéries retrouvés parfois chez *Pseudomonas* [19].

Ces quelques données générales expliquent les phénotypes de résistance très divers qui sont observés et combien il est difficile, sur la base de la valeur des CMI publiées, d'établir une hiérarchie parmi les molécules antipyocyaniques proposées. La conjoncture épidémiologique variable d'un hôpital et d'un service à l'autre, rend aléatoire toute prévision de sensibilité.

Le choix d'une bêta-lactamine pourra se faire en fonction de l'antibiogramme parmi les carboxypénicillines (ticarcilline, association ticarcilline + acide clavulanique) ayant une bonne vitesse de bactéricidie, les acyl-uréidopénicillines (pipéracilline), les acylpénicillines (apalcilline), certaines céphalosporines (cefsulodine et ceftazidime), les monobactames (aztréonam) et les carbapénèmes (imipénème). En outre, l'association la plus efficace d'une bêta-lactamine à un aminoside sera souvent recherchée afin d'être rapidement bactéricide dans les infections généralisées [19].

Parmi les aminosides plusieurs phénotypes de résistance sont observés, l'amikacine est la molécule la plus active. La diminution de la perméabilité aux bêta-lactamines affectant également les aminosides rend certaines souches particulièrement résistantes.

P. aeruginosa est résistant à l'acide nalidixique mais les quinolones de 2^{ème} génération, ont une activité intéressante : la péfloxacin, la norfloxacin, l'ofloxacin et la ciprofloxacine donnent ainsi les CMI les plus basses.

Les aminosides associés aux bêta-lactamines antipyocyaniques constituent le traitement de première intention.

La sensibilité de *P. aeruginosa* à la colistine est constante, mais son efficacité *in vivo* est décevante. Certaines souches sont sensibles à la fosfomycine, mais cet antibiotique doit être associé pour éviter l'émergence rapide de mutants résistants [19].

III. Quelques outils de la modélisation prédictive [6, 9]

L'hypothèse à la base de la microbiologie prédictive est que l'évolution d'une population bactérienne dans des conditions environnementales données est reproductible. Ainsi, en considérant les conditions environnementales comme les contraintes définissant un domaine d'étude, il est possible à partir d'observations passées de prédire la réponse des micro-organismes.

Un modèle est une représentation simplifiée de la réalité, facilitant la prédiction ou l'estimation et est exprimée en langage mathématiques (équation, langage informatique, forme géométrique etc.). La représentation doit être interprétable en termes biologiques. Toute la réalité ne pouvant être modélisée, un choix doit être fait sur la partie de la réalité à modéliser. L'espace du modèle est alors défini. Les informations qui pourront être extraites de la modélisation ne seront valables que pour l'espace choisi.

Deux types de modèles sont classiquement distingués : les modèles empiriques et les modèles mécanistes. Les premiers sont décrits par un nuage de points, ils correspondent à une démarche phénoménologique et sont plus pratiques. Les modèles mécanistes eux, prennent en compte beaucoup plus de paramètres et sont construits à partir d'hypothèses expliquant les processus donnant lieu aux phénomènes observés.

En microbiologie, étant donné les objectifs assignés à la modélisation ainsi que la complexité des processus physiologiques expliquant les phénomènes observés, ce sont les modèles empiriques qui sont majoritaires.

La modélisation est la démarche qui permet l'élaboration d'un modèle. Cette étape prend en compte :

- l'objet et/ou le phénomène à représenter ;
- le système formel choisi ;
- les objectifs du modèle ;
- les données relatives aux variables et les connaissances (relations entre les variables) disponibles ou accessibles par l'expérience ou par l'observation.

Cette démarche passe généralement par un processus de simplification.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. Méthodologie

I.1. Contexte

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif souvent responsable d'infections nosocomiales. Ayant beaucoup de résistances naturelles à l'état sauvage, il peut également du fait de la pression de sélection des antibiotiques, acquérir de nombreuses résistances d'où l'intérêt des associations.

Un des rôles principaux du bactériologiste consiste à aider le clinicien dans le choix d'une thérapeutique, en testant la sensibilité à divers antibiotiques d'un micro-organisme pathogène prélevé sur un patient. Il s'agit de prédire les aptitudes de croissance du micro-organisme en présence d'un antibiotique, et d'un point de vue plus pratique, de prédire la réussite ou l'échec d'un traitement.

Lors de la mise en œuvre de l'antibiogramme standard, seul l'effet bactériostatique est testé, cependant dans certaines circonstances (infection grave ou immunodépression) la détermination de l'effet bactéricide serait plus opportune.

Avoir des indications sur l'effet bactéricide d'une association d'antibiotiques serait donc pour le clinicien un atout de taille dans la prise en charge des infections.

I.2. Problématique

L'enjeu est de pouvoir décrire l'effet bactéricide d'un antibiotique ou d'une association d'antibiotiques en se basant sur des résultats de l'étude de l'effet bactériostatique.

L'atteinte de cet objectif nécessite d'avancer une hypothèse de taille : lors de cette étude nous partons du principe que les associations d'antibiotiques que nous allons étudier ont un effet bactéricide. A partir de ce point nous pourrions utiliser les acquis de la microbiologie prédictive pour décliner des modèles mathématiques de l'effet bactéricide de ces associations.

I.3. Objectifs

I.3.1. Objectif général

L'objectif général de notre étude est de réussir à établir un modèle prédictif de l'effet bactéricide d'associations d'antibiotiques à partir des résultats d'une étude antérieure à la notre, ayant visé à déterminer l'effet bactériostatique.

I.3.2. Objectifs spécifiques

Ils consistent à décliner des modèles de prédiction mathématiques de l'effet bactéricide de souches de *pseudomonas aeruginosa* sur différentes associations d'antibiotiques :

- bêta-lactamine + quinolone: ceftriaxone + ciprofloxacine ;
- bêta-lactamine + aminoside: ceftriaxone + amikacine.

I.4. Cadre d'étude

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II et de l'unité de recherche en microbiologie du laboratoire de microbiologie et virologie de l'hôpital Aristide LE DANTEC.

I.5. Ressources financières

L'étude a été financée par l'unité de recherche du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le DANTEC.

I.6. Chronogramme

L'étude a été effectuée selon le chronogramme suivant :

- juillet-décembre 2012, recueil et exploitation des résultats de l'étude de l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques ;
- décembre 2012 - mars 2013, discussions des modèles, corrections ;
- janvier 2014: soutenance du mémoire.

I.7. Souches bactériennes

Nous avons effectué nos tests sur des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes identifiées et conservées au laboratoire à une température de -20°C.

I.8. Antibiotiques testés

Divers antibiotiques ont été testés sous forme d'associations :

- bêta-lactamine + quinolone: ceftriaxone + ciprofloxacine ;
- bêta-lactamine + aminoside: ceftriaxone + amikacine.

I.9. Détermination de l'effet bactériostatique

I.9.1. Technique de détermination de l'effet bactériostatique

Des manipulations préalables à notre étude ont permis de déterminer l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques dont nous allons étudier l'effet bactéricide. Nous avons jugé nécessaire de décrire la technique utilisée pour aboutir aux données que nous allons devoir exploiter.

L'effet bactériostatique a été déterminé grâce à la méthode de l'échiquier. Cette technique met en évidence deux gammes de dilutions sériées de chacune des molécules, de façon à ce que chacune des concentrations d'un antibiotique A, soit combinée avec toutes les concentrations de B et inversement.

La CMI (concentration minimale inhibitrice) de chaque antibiotique sur la bactérie à étudier doit être préalablement déterminée grâce à la macro-méthode en milieu liquide. Cette étape permet de centrer sur les valeurs des CMI respectives chacune des gammes de dilution (**figure 1**).

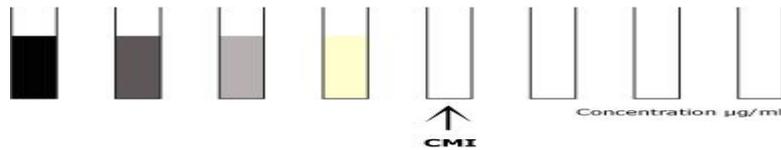


Figure 1 : détermination de la CMI par la macrométhode

Les solutions mères des deux antibiotiques (A et B) sont ensuite préparées. Arbitrairement, la plus forte concentration testée de l'antibiotique A est fixée à 16 fois la CMI de A ; et la plus forte concentration de l'antibiotique B est fixée à 8 fois la CMI de B. La dilution de chaque antibiotique est effectuée grâce à une dilution à raison de 2. La dernière rangée et la dernière colonne contiennent respectivement seul l'antibiotique B et seul l'antibiotique A. Une cupule qui ne contiendra que l'inoculum servira de témoin de la croissance bactérienne (**figure 2**).

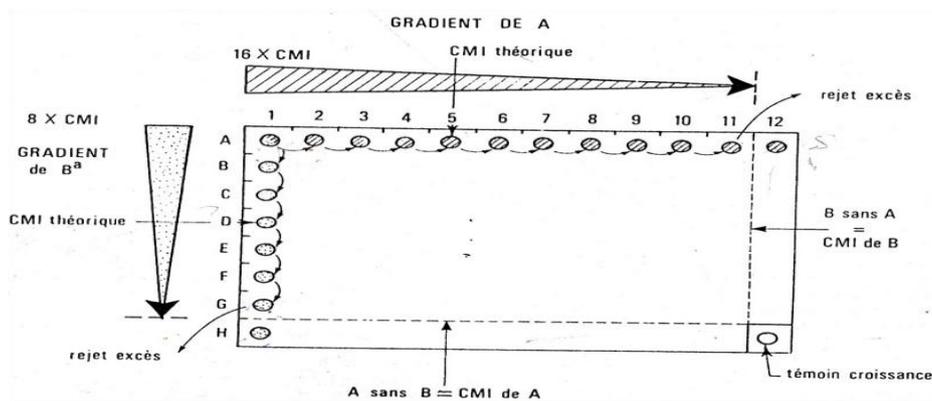


Figure 2 : représentation de la méthode de l'échiquier

Dans chacune des 96 cupules, 20µL d'inoculum à 5 Mac Farland sont déposés grâce à une micropipette multiple. La microplaque est ensuite incubée à l'étuve à 37°C, pendant 18 à 24h. Le lendemain, la lecture de l'activité des antibiotiques est effectuée. Pousse et inhibition de croissance des cupules de chaque colonne et chaque rangée sont relevées, il est alors possible de déterminer la FIC (Fraction Inhibitory Concentration) et la FIC index (Fraction Inhibitory Concentration index). Dans chaque rangée, les concentrations inhibitrices de A puis B en association seront relevées puis rapportées à leur CMI respectives déterminées précédemment. A partir de ces données, est calculée la FIC index dans chaque rangée. La FIC la plus petite sera considérée comme celle caractéristique de l'association. La FIC est déterminée à partir de la CI (concentration inhibitrice) rapportée à la CMI.

La CI est la plus faible concentration inhibant toute croissance bactérienne visible.

La FIC index est la somme des FIC des deux antibiotiques (A et B) associés :

$$FIC\ INDEX = \frac{CI(A)\ en\ combinaison}{CMI\ A} + \frac{CI(B)\ en\ combinaison}{CMI\ B}$$

La FIC index permet de définir la nature des interactions, l'association est:

- *synergique* si $FIC\ index \leq 0,5$;
- *additive* si $0,5 < FIC\ index \leq 1$;
- *indifférente* si $1 < FIC\ index \leq 2$;
- *et antagoniste* si $FIC\ index > 2$.

I.9.2. Données de l'étude de la bactériostase

Les manipulations décrites précédemment ont permis d'obtenir les données suivantes :

- Ceftriaxone (A) – Amikacine (B): CRO – AMK (*tableau II*)

CMI CRO = 64 μ g/ml

CMI AMK = 4 μ g/ml

TBLEAU II : effet bactériostatique de l'association ceftriaxone-amikacine

CI_A	CI_B	FIC_A	FIC_B	FIC_{INDEX}	Interprétations
8	0,5	0,1250	0,125	0,250	Synergie
8	1	0,1250	0,250	0,375	Synergie
4	2	0,0625	0,5	0,562	Addition
2	4	0,0312	1	1,031	Indifférence

Interprétation : SYNERGIE

- Ceftriaxone (A) – Ciprofloxacin (B): CRO – CIP (*tableau III*)

CMI CRO= 64µg/ml

CMI CIP= 1µg/ml

Tableau III : effet bactériostatique de l'association ceftriaxone-ciprofloxacin

CI _A	CI _B	FIC _A	FIC _B	FIC _{INDEX}	Interprétations
32	0,125	0,5	0,125	0,625	Addition
8	0,25	0,125	0,25	0,375	Synergie
4	0,5	0,062	0,5	0,562	Addition
2	1	0,031	1	1,031	Indifférence

Interprétation : SYNERGIE

I.10. Détermination de l'effet bactéricide

I.10.1. Technique de détermination de l'effet bactéricide : la modélisation

La modélisation prédictive de l'effet bactéricide nécessite de poser une hypothèse : les associations que nous étudions ont un effet bactéricide.

Nous sommes confortés dans notre hypothèse par le fait que l'ensemble des antibiotiques choisis pour notre étude ont un effet bactéricide connu lorsqu'ils sont utilisés seuls. En outre le fait d'avoir étudié les antibiotiques associés a entraîné une augmentation de leur activité par une synergie. Quand deux antibiotiques ont un effet synergique cet effet est valable aussi bien pour la bactéricidie que pour la bactériostase. Ainsi, l'effet d'une association d'antibiotiques peut être déterminé indifféremment par la FIC (fractional inhibitory concentration) ou la FBC (fractional bactericidal concentration).

Nous savons qu'un antibiotique ou une association d'antibiotiques est dit bactéricide si :

$$CMB \leq CMI \times 4$$

Nous obtenons ainsi la concentration limite de l'effet bactéricide.

L'étude de l'effet bactériostatique a permis de cibler des points intéressants pour lesquels nous avons une synergie. Ces points seront donc utilisés pour la construction des modèles.

Lors de la modélisation, la concentration d'un des antibiotiques est fixe et l'autre est variable.

La durée d'incubation varie de 18 à 24h.

L'inoculum de départ correspond à 5 Mac Farland mais l'action des antibiotiques va entraîner une diminution des bactéries vivantes de cet inoculum.

L'association d'antibiotiques est considérée comme bactéricide, si elle entraîne la mort de 99,99 % des bactéries de l'inoculum de départ.

La prise en compte de ces paramètres nous permettra de construire des modèles mathématiques de prédiction de l'effet bactéricide de nos associations aux points retenus précédemment.

L'exploitation des résultats est effectuée grâce à un logiciel d'analyses mathématiques Origin Pro 8.5.

Pour tracer les modèles nous avons représenté en ordonnée le pourcentage de croissance bactérienne pour les valeurs positives et le pourcentage de bactéries vivantes pour les valeurs négatives.

En abscisse les concentrations croissantes d'antibiotiques ont été représentées.

Pour chaque point à modéliser il existe deux courbes : une courbe dans laquelle la concentration l'antibiotique A est croissante et celle de B fixe, et une courbe pour laquelle la concentration de A est fixe et celle de B croissante.

La modélisation a été effectuée grâce à une courbe sigmoïde qui correspond à la courbe habituelle d'évolution des bactéries lorsqu'elles sont soumises à un antibiotique bactéricide.

Trois points ont été utilisés :

- l'origine qui correspond au point pour lequel il y a 100% de croissance bactérienne et 0 µg/ml d'antibiotiques ;
- le point de l'effet bactériostatique minimal, qui correspond au point pour lequel nous avons 0% de croissance avec la plus faible concentration en antibiotiques ;
- le point de l'effet bactéricide, qui correspond au point pour lequel il reste 0,01 % de l'inoculum initial et où la concentration en antibiotiques est égale à 4 fois la concentration bactériostatique minimale.

Une fois les points déterminés, la courbe est tracée en appliquant un modèle sigmoïde.

I.10.2. Résultats attendus

Les résultats obtenus devraient nous permettre de décrire l'allure des courbes de la bactéricidie de ces associations d'antibiotiques vis-à-vis de *P. aeruginosa* lorsqu'ils sont soumis aux mêmes conditions expérimentales.

II. RESULTATS

II.1. Association Ceftriaxone (A)-Amikacine (B) : CRO – AMK

Nous allons utiliser les données du *tableau IV* pour en déduire les modèles:

Tableau IV : points intéressants de l'association ceftriaxone-amikacine

	CI A	CI B	FIC A	FICB	FIC INDEX	Interprétation
Point 1	8	0,5	0,1250	0,125	0,250	Synergie
Point 2	8	1	0,1250	0,250	0,375	Synergie
Point 3	4	2	0,0625	0,5	0,562	Addition
Point 4	2	4	0,0 312	1	1,0 31	Indifférence

Dans le cadre de notre étude, nous n'exploiterons que les points pour lesquelles l'association a révélé une synergie c'est-à-dire les point 1 et 2. Pour chaque point, deux modèles sont décrits : un modèle pour lequel la concentration de A est fixe et celle B est croissante, et un modèle pour lequel la concentration de A est croissante et celle de B fixe.

II.1.1. Association ceftriaxone (A)-amikacine (B) pour A= 8 µg /ml et B = 0,5 µg /ml

Pour le point 1 (*tableau V*), *la figure 3* représente le cas pour lequel la concentration de A est fixe et celle B est croissante ; et *la figure 4*, le modèle pour lequel la concentration de A est croissante et celle de B fixe.

Tableau V : données de l'étude bactériostatique pour le point 1

CIA	CIB	FICA	FICB	FICINDEX	Interprétation
8	0,5	0,1250	0,125	0,250	Synergie

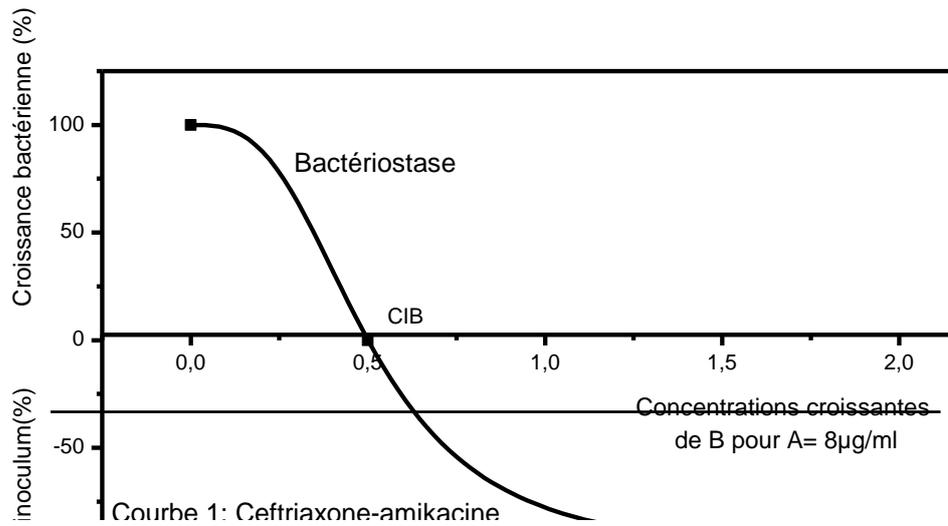


Figure 3: Prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour une concentration croissante de B et A fixe

La courbe ci-dessus est une prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone-amikacine pour une concentration de ceftriaxone fixe. L'effet bactéricide est obtenu à une concentration de B=2µg/ml, la concentration bactéricide à 50% est pour l'antibiotique B ≤ 0,75µg/ml. La courbe correspond à l'équation :

$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + 8x^3} \right)$$

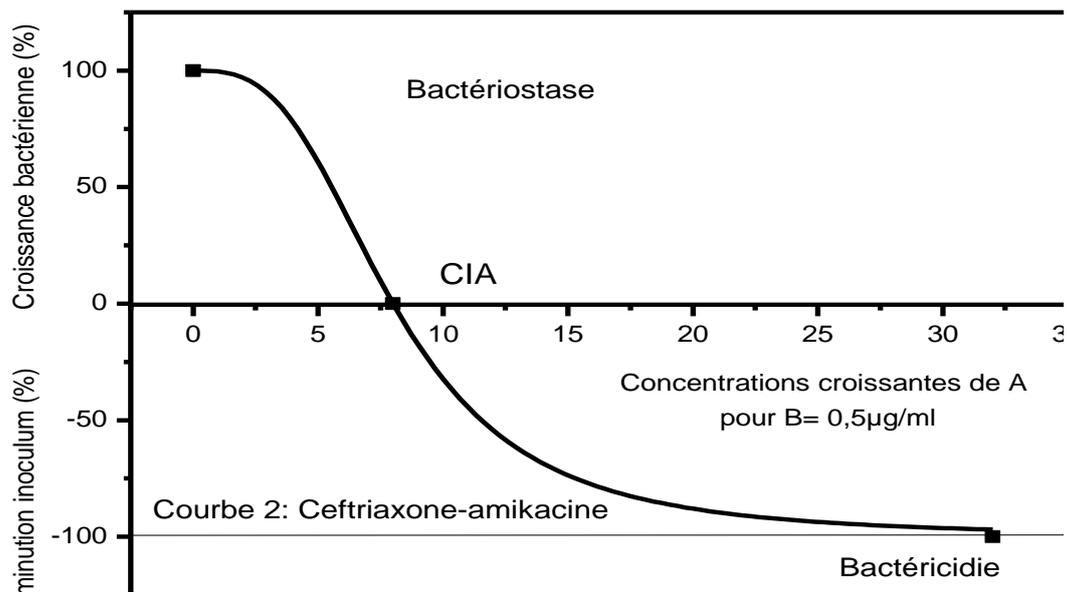


Figure 4 : prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour des concentrations croissantes de A et B=0,5 µg /ml

La figure 4 est une prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone-amikacine pour une concentration de l'amikacine fixe. L'effet bactéricide est obtenu à une concentration de A=32µg/ml, la concentration bactéricide à 50% est pour l'antibiotique A ≤ 12,5µg/ml. La courbe correspond à l'équation :

$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + 1,95 \cdot 10^{-3} x^3} \right)$$

II.1.2. Association amikacine (A)-ceftriaxone(B) pour A=8µg/ml et B = 1µg/ml

Pour le point 2 (tableau VI), le modèle de prédiction pour lequel la concentration de B est croissante et celle de A fixe est représenté par la figure 5 et le cas où la concentration de A est croissante et celle de B fixe par la figure 6.

Tableau VI : données de l'étude bactériostatique pour le point 2

CIA	CIB	FICA	FICB	FICINDEX	Interprétations
8	1	0,1250	0,250	0,375	Synergie

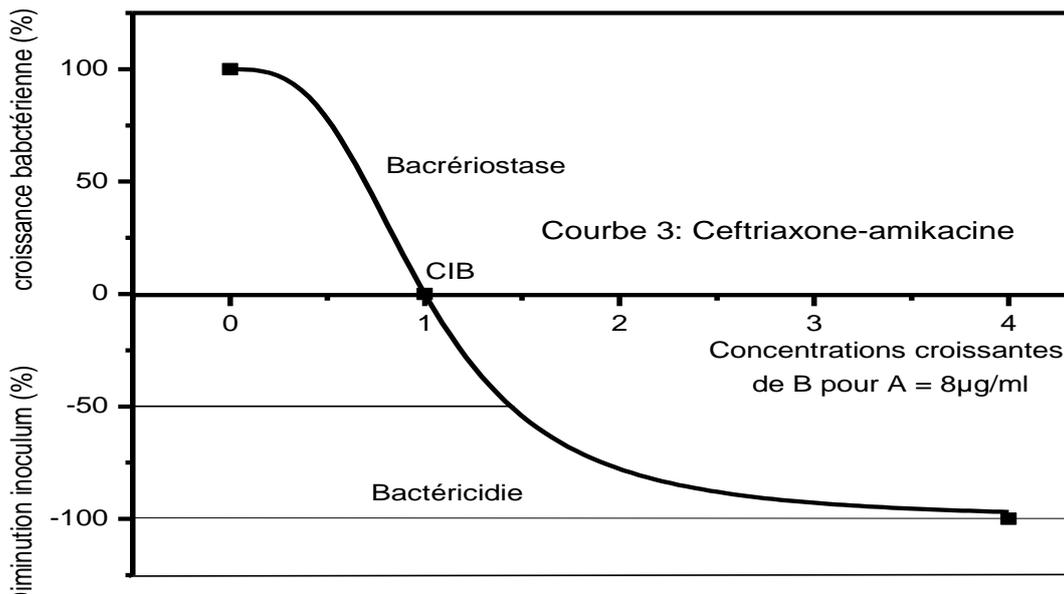


Figure 5: prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour une concentration fixe de A=8µg/ml et B croissante

Cette courbe est une prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone-amikacine pour des concentrations croissantes de B et avec une CIB=1µg/ml, la concentration de A est constante (8µg/ml). Pour un effet bactéricide obtenu à une concentration de B = 4µg/ml, l'effet bactéricide à 50% est $\leq 1,5\mu\text{g/ml}$. La modélisation nous permet d'obtenir une courbe d'équation :

$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + x^3} \right)$$

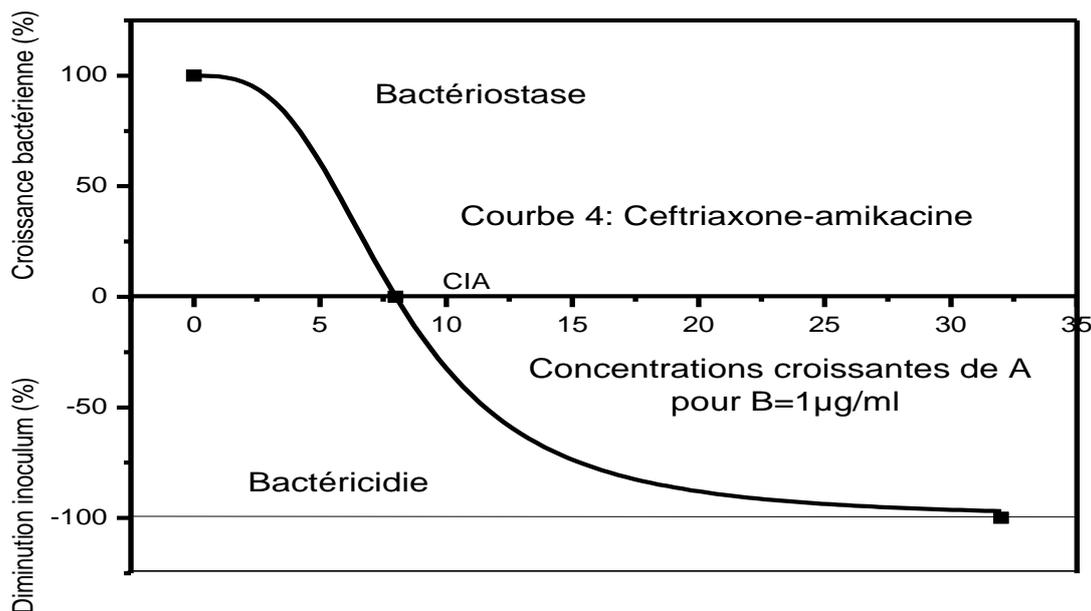


Figure 6: prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et amikacine (B) pour des concentrations croissantes de A et B =1μg/ml

La courbe ci-dessus est une prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone-amikacine pour une concentration de l'amikacine fixe. Pour un effet bactéricide obtenu à une concentration de A = 32μg/ml, la concentration bactéricide à 50% est pour l'antibiotique $A \leq 12\mu\text{g/ml}$. La courbe correspond à l'équation :

$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + 1,95 \cdot 10^{-3} x^3} \right)$$

II.2. Association Ceftriaxone (A) – Ciprofloxacin (B): CRO – CIP

Nous allons utiliser les données du *tableau VII* pour en déduire les modèles:

Tableau VII : points intéressants de l'association ceftriaxone-ciprofloxacin

	CIA	CIB	FICA	FICB	FICINDEX	Interprétation
Point α	32	0,125	0,5	0,125	0,625	Addition
Point β	8	0,25	0,125	0,25	0,375	Synergie
Point λ	4	0,5	0,062	0,5	0,562	Addition
Point γ	2	1	0,031	1	1,031	Indifférence

Pour l'association Ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B) le point β (*tableau VIII*) est le plus intéressant.

Tableau VIII: Résultats de l'étude bactériostatique pour le point β

CIA	CIB	FICA	FICB	FICINDEX	Interprétation
8	0,25	0,125	0,25	0,375	Synergie

La modélisation se fera selon la même démarche que pour l'association précédente, nous tracerons donc 2 courbes :

La modélisation de l'effet bactéricide pour des concentrations croissantes de B et celle de A=8 μ g/ml est représentée par la *figure 7* alors que le cas où A est croissante et B fixe est représentée par la *figure 8*.

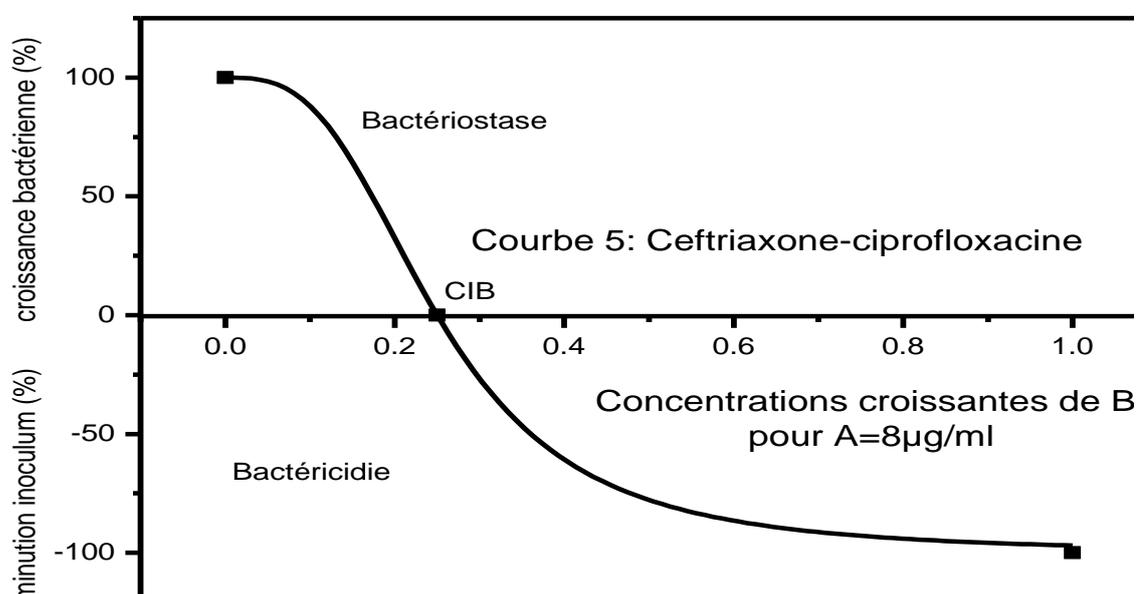


Figure 7: prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B), pour des concentrations croissantes de B et A=8 μ g/ml

La *figure 7* est une prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B), la CIB = 0,25 μ g/ml, l'effet bactéricide à 50 % est B \leq 0,4 μ g/ml. L'effet bactéricide est estimé à une concentration de B=1 μ g/ml, nous obtenons une courbe dont l'équation est :

$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + 64x^3} \right)$$

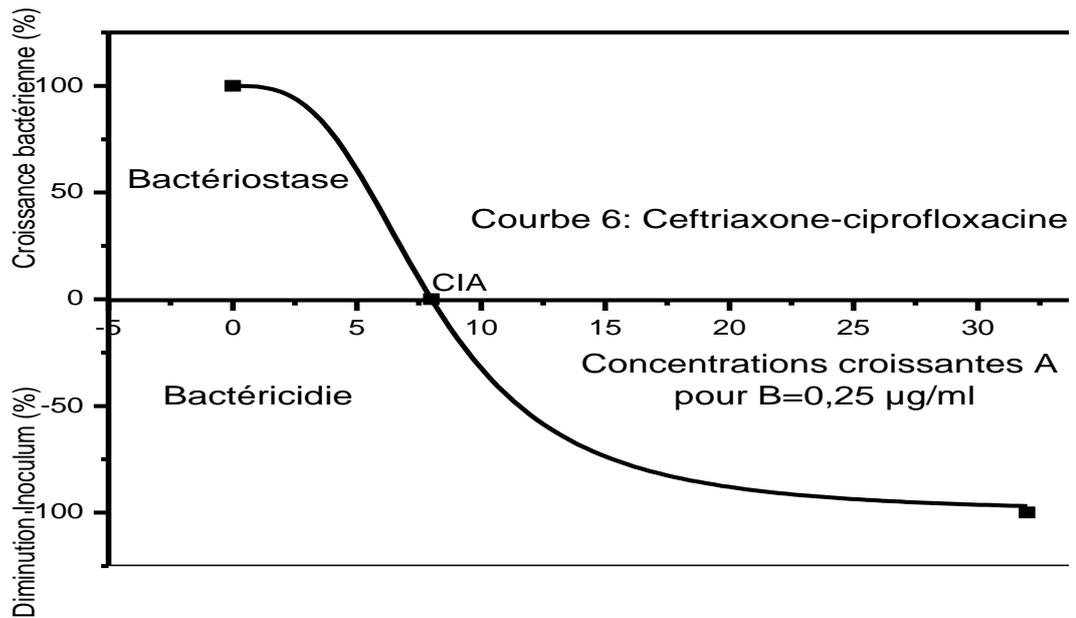


Figure 8 : Prédiction de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B) pour des concentrations de A croissantes et B= 0,25µg/ml

Cette courbe est une représentation de l'effet bactéricide de l'association ceftriaxone (A) et ciprofloxacine (B). Les concentrations de A sont croissantes avec une CIA=8µg /ml celle de B est fixée à 0,25µg/ml. La concentration bactéricide à 50% est inférieure à 12 µg/ml.

L'équation de la courbe est :
$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + 1,95 \cdot 10^{-3} x^3} \right)$$

III. COMMENTAIRES

L'effet bactéricide des associations d'antibiotiques a pu être prédit à partir des résultats de l'étude bactériostatique en utilisant des modèles mathématiques.

III.1. Souches bactériennes

Cette étude a porté sur *P. aeruginosa*. Le choix de cette espèce a été guidé par son importance en pathologie infectieuse. En effet, ce germe est intéressant du fait du type d'infections qu'il entraîne dont l'origine est souvent nosocomiale. Il constitue pour cela un des principaux germes dont la diffusion hospitalière est à contrôler dans le cadre de la lutte contre les infections nosocomiales. L'importance de cette bactérie est également relative à son profil de sensibilité. En effet, les souches sauvages de *P. aeruginosa* présentent beaucoup de résistances mais aussi, elles peuvent en acquérir de nouvelles sous l'influence de plusieurs facteurs dont la pression de sélection des antibiotiques.

Nous avons utilisé des souches identifiées à partir de produits pathologiques et qui se sont révélées être des bactéries multi-résistantes (BMR) ; bien que les germes aient déjà été identifiés avant leur conservation, leur identification a été vérifiée. Cette étape a notamment permis d'éviter d'éventuelles erreurs dans la suite de l'étude bactériostatique.

L'étude de l'effet bactériostatique a été effectuée à partir de souches issues de cultures jeunes. Cette précaution a permis d'optimiser les capacités de croissance des bactéries mais aussi, d'éviter une surestimation de l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques qui serait en réalité due à une diminution des capacités de croissance des bactéries suite à une trop longue conservation.

III.2. Choix des associations

Notre étude a porté sur 2 associations : ceftriaxone-amikacine et ceftriaxone-ciprofloxacine. Le choix de ces associations n'est pas fortuit; en effet, ces associations sont connues pour être synergiques et bactéricides [20]. Toutes les molécules sélectionnées sont considérées comme anti-pyocyaniques avec une réduction de la sélection de mutants résistants [17]. En outre, des auteurs tels que Faure and al. [17] ont suggéré l'utilisation de l'association quinolone-bêta-lactamine sur des souches de *P. aeruginosa* impliquées dans des pneumonies d'origine nosocomiale. De la même façon, Burgel et Kanaan [7], ont montré l'intérêt de l'association bêta-lactamine-aminoside sur des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes.

Le mécanisme d'action et la cible des antibiotiques étaient des critères importants dans le choix des combinaisons: les associations étudiées contiennent des molécules qui ont toutes des mécanismes et sites d'actions différents au niveau de la bactérie. Cette mesure permet de limiter la sélection de mutants résistants; d'autant plus que les fluoroquinolones utilisés seuls présentent un risque plus élevé d'entraîner des mutants résistants [26, 1].

Selon une étude menée par Bambeke et Al. en 1999 [3], les bêta-lactamines sont des antibiotiques temps dépendant alors que les aminosides et quinolones sont concentrations dépendantes. Il a donc été intéressant pour nous de comparer deux associations avec une molécule temps dépendant et une autre concentration dépendante. Les résultats ont été plus intéressants pour l'association bêta-lactamine-aminoside. Il faut cependant intégrer le paramètre de la susceptibilité des germes sélectionnés pour expliquer ce résultat.

Lors de l'étude de la bactériostase, un plus grand nombre d'associations avaient été testées telle que l'association ciprofloxacine-amikacine dont nous avons noté un effet d'addition et l'association ciprofloxacine-gentamicine pour lequel nous avons obtenu un effet d'indifférence. Lors de l'étude prédictive de l'effet bactéricide, ces deux associations n'ont pas été sélectionnées, car l'effet bactéricide est plus marqué lorsqu'il y a une synergie d'action entre deux antibiotiques bactéricides [1, 26].

III.3. Etude de l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques

La détermination de l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques a été effectuée grâce à la méthode de l'échiquier. Il faut noter qu'il existe d'autres méthodes d'études des associations d'antibiotiques telle la méthode de dilution en milieu gélosé très utilisée par certains auteurs tels par Dubreuil et al. en 2003 [13]. Même si cette méthode présente l'avantage de se faire en milieu gélosé, et donc plus familière à la microbiologie de routine, elle est moins complète en ce qui concerne le nombre de combinaisons testées. Il serait en effet difficile, d'ensemencer 96 boîtes de pétri pour chaque association ; en cela la méthode de l'échiquier est plus pratique et plus complète. Ainsi cette technique est considérée comme celle de référence car elle est exhaustive et permet non seulement d'encadrer la CMI mais aussi de tester toutes les combinaisons possibles en mettant en contact toutes les concentrations de l'antibiotique A avec toutes les concentrations de l'antibiotique B [8].

Il aurait été toutefois intéressant d'étudier les associations d'antibiotiques d'abord par la méthode de l'échiquier pour cibler toutes les combinaisons intéressantes puis vérifier ces points par la méthode de dilution en gélose parce que cette dernière est plus utilisée en pratique.

III.4. Choix des variables

Le choix des variables a été difficile. En effet nous devons à partir de données de la bactériostase nous projeter dans la bactéricidie tout en sachant que ces notions n'avaient pas la même action. Cependant, leurs cibles sont superposables. En effet, pour tout antibiotique ou association bactéricide, l'effet bactériostatique est une évidence même si le contraire n'est pas vrai. Ainsi une diminution de la taille de l'inoculum passe d'abord par son inhibition. Le pourcentage de croissance et de la diminution de l'inoculum sont deux notions distinctes mais qui peuvent être continus d'où leur superposition au niveau des graphiques.

Nous avons été tentés de prédire l'effet bactéricide en fonction du temps comme c'est le cas dans beaucoup d'études mais nous avons buté sur un manque de données. En effet, lors de l'étude bactériostatique, la cinétique de bactériostase n'a pas été prise en compte et la lecture a été effectuée une seule fois au bout de 18 à 24 heures. Il était impossible dans ces conditions de décliner une courbe de prédiction qui nécessite au moins trois points.

III.5. Allure de la courbe

Pour décrire l'effet bactéricide nous avons utilisé une courbe d'allure sigmoïde, car elle a été décrite comme étant la plus adaptée pour décrire l'effet bactéricide d'un antibiotique vis-à-vis d'un germe par *Carbonelle et Al.* [8]. Ce modèle prend en compte un temps de latence qui correspond au temps s'écoulant entre la mise en contact et le début de l'activité de l'antibiotique ; mais aussi, il intègre la notion d'épuisement de l'inoculum bactérien. Une fois la phase de latence terminée la courbe prend l'allure de la courbe de la décroissance bactérienne qui est connue pour être inversement exponentielle.

L'équation générale des courbes est de type $y = -a + \left(\frac{b}{1 + c \cdot x^3} \right)$, nous avons

remarqué que les valeurs de $a=99,99$ et $b=199,99$ sont restées invariables, quelque soit l'association étudiée. Nous pensons donc que la variation de l'allure de la courbe a été conditionnée par la valeur de c . Nous pouvons en déduire que l'équation est alors de type :

$$y = -99,99 + \left(\frac{199,99}{1 + c \cdot x^3} \right).$$

III.6. Limites de l'étude

Notre étude nous a permis de décrire l'allure générale de l'effet bactéricide de deux associations d'antibiotiques pouvant être utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*. La plus grande limite de ce travail est l'absence de validation. En effet après avoir posé des hypothèses et proposé des modèles, il aurait été tout à fait logique de valider nos modèles par la vérification des points essentiels.

Une autre limite a été de ne pas avoir disposé de la cinétique de la bactériostase. Cette donnée aurait pu nous permettre de faire une modélisation aussi bien en fonction des concentrations, mais aussi en fonction du temps. Cette démarche est importante, dans la mesure où, certaines des molécules utilisées ont une efficacité temps dépendante (bêta-lactamines) alors que d'autres ont une efficacité concentration dépendante [3].

CONCLUSION

Pseudomonas aeruginosa occupe une place importante en infectiologie, notamment dans la lutte contre les infections nosocomiales. La bonne prise en charge de ces dernières nécessite un bon choix thérapeutique. De nos jours il est recommandé de traiter ces infections avec des associations d'antibiotiques ayant un effet bactéricide. Les moyens habituels de détermination de la susceptibilité des bactéries aux antibiotiques n'explorent que l'aspect bactériostatique de ces derniers et ceci rarement sur des associations d'antibiotiques. C'est dans ce contexte, que l'unité de recherche du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec a initié ce projet de recherche. Il a consisté en la prédiction, grâce à des modèles mathématiques, de l'effet bactéricide d'associations d'antibiotiques.

L'étude a eu lieu de Juillet 2012 à Mars 2013 et a porté sur des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes isolées de produits pathologiques. Elle a été effectuée sur deux associations d'antibiotiques : ceftriaxone-amikacine et ciprofloxacine-ceftriaxone.

Nous avons utilisé des résultats de l'analyse de l'effet bactériostatique de ces associations d'antibiotiques sur les mêmes souches, ces données avaient été obtenues lors d'une étude antérieure à la notre. La prédiction repose sur l'hypothèse selon laquelle les associations que nous étudions sont bactéricides et $CMB < 4 \times CMI$. Seuls les points qui présentaient une synergie ont été exploités. La modélisation a été effectuée grâce au logiciel OriginPro 8.5. Le modèle de courbe sigmoïde a été utilisé. Ce dernier prend en compte : la phase de latence, la décroissance bactérienne d'allure exponentielle et la phase d'épuisement de l'inoculum de départ.

La démarche que nous avons décrite nous a permis de décliner des modèles mathématiques. Pour l'association ceftriaxone(A)-amikacine(B) ont été modélisés 2 points : le **Point 1** pour lequel $A=8\mu\text{g/ml}$ et $B=0,5\mu\text{g/ml}$ et le **Point 2** pour lequel $A=8\mu\text{g/ml}$ et $B=1\mu\text{g/ml}$. En ce qui concerne l'association ceftriaxone(A)-ciprofloxacine(B) un **Point β** a été modélisé : $A=8\mu\text{g/ml}$ et $B=0,25\mu\text{g/ml}$.

Les résultats obtenus nous ont permis de décliner l'aspect de la courbe de bactéricidie de ces associations en fonction des concentrations d'antibiotiques. L'équation générale des modèles

est de type :
$$y = -a + \left(\frac{b}{1 + c \cdot x^3} \right).$$

Pour le **Point 1** l'effet bactéricide a été obtenu pour A fixe et B croissant à **$B=2\mu\text{g/ml}$** ; et pour B fixe et A croissant à une concentration de **$A=32\mu\text{g/ml}$** . Pour le **Point 2** l'effet bactéricide a été obtenu pour A fixe et B croissant à **$B = 4\mu\text{g/ml}$** ; et pour B fixe et A croissant à une concentration de **$A = 32\mu\text{g/ml}$** . Enfin en ce qui concerne le **Point β** l'effet bactéricide a été atteint pour A fixe et B croissant à **$B = 1\mu\text{g/ml}$** et pour A croissant et B fixe la bactéricidie a été obtenue pour **$A = 32\mu\text{g/ml}$** .

Ces courbes pourraient constituer une base pour des études ultérieures. En effet, ces modèles ne pourront être validés qu'après la vérification de plusieurs de leurs points par des manipulations techniques. De même, il serait intéressant de contourner l'une des principales limites de ce travail, en l'occurrence l'absence de la cinétique de la bactériostase. Ce nouvel élément permettrait de modéliser en fonction du temps et non plus seulement en fonction de la variation de la concentration. Nous pensons que la détermination de ces paramètres pourrait permettre d'avancer de façon considérable dans la prise en charge des infections à *Pseudomonas aeruginosa* et par la même occasion de lutter efficacement contre les infections nosocomiales.

BIBLIOGRAPHIE

1. AUBOYER C., BEAUCAIRE G., DRUEON H., ET AL.

Associations d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie. *Le praticien anesthésie et réanimation*, 2002, 4, 3, 179.

2. AVRIL J. L., DABERNAT H., DENIS F. ET AL.

Bactériologie Clinique. 2ème édition. Paris : Ellipses, 1992. 511. ISBN 2-7298-9218-4.

3. BAMBEKE F. V., TYTECA D., OUADRHIRI Y. ET AL.

Optimisation des traitements antibactériens sur base de propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *Louvain Med.*, 1999, 118, 43-63.

4. BBL crystal E/NF ID

Système d'identification des entérobactéries / non fermentants. France : Becton Dickinson, 1999. 13-22.

5. BEBEAR C., BARBEYRAC B., DEWILDE A., ET AL

Etude multicentrique de la sensibilité in vitro des mycoplasmes génitaux aux antibiotiques. *Rev. Path. et bio.*, 1993, 41, 4, 289-293.

6. BREAND S.

Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. Thèse biométrie. Lyon : Université Claude Bernard, 1998. 266.

7. BURGEL P. R. ET KANAAN R.

Traitement de l'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant dans la mucoviscidose, comment progresser ? *Rev. mal. resp.*, 2010, 27, 411-413.

8. CARBONELLE B., DENIS F., PINON G. ET AL.

Bactériologie médicale: techniques usuelles. Paris : SIMEP, 1998. 323. ISBN : 285 334 276.

9. CORNU M.

Dynamique des populations bactériennes en culture mixte. Thèse biométrie. Lyon : Université Claude Bernard, 2000.199.

10. DENIS F., PLOY M. C., MARTIN C., ET AL.

Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Paris : Elsevier Masson, 2007. 563. ISBN: 978 2 294 01172 6.

11. DOSSO M.

Etude de la sensibilité in vitro aux antibiotiques de différents isolats bactériens à Abidjan : résultats à propos de 94 souches. *Méd. digest.*, 1995, 4, 32-38.

12. DRAME B.

Micro-méthode d'identification et étude de la sensibilité des entérobactéries, intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse Pharmacie. Dakar: Université Cheikh Anta Diop, 2001. 54.

13. DUBREUIL L., CALVET L., ROCQUES C. ET AL.

Etat de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies isolées lors d'infections odontogènes. Intérêt de l'association spiramycine-métronidazole. *Méd. buccale*, 2003, 9, 157-173.

14. EDLER L.

Biometry - The Role of the Biostatistician. Introduction to Clinical Drug Research. *Vienna School of Clinical Drug Research*, 2001, 15, 22 - 26.

15. FALL M. I.

Comportement vis à vis des antibiotiques de 94 souches de S. aureus isolées en situation pathogène au CHU de FANN de Dakar. Thèse Pharmacie. Dakar : Université Cheikh Anta Diop, 1992. 8.

16. FAUCHIER N.

Associations d'antibiotiques intéressantes dans le traitement systémique de pyodermites canines. *Dépêche vétérinaire*, 2010, 1077.

17. FAURE K., KIPNIS K. ET GUERY B.

Prise en charge des pneumonies liées à *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Tun. Infectiol.*, 2008, 2, 1-8.

18. GUEYE O.

Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles Gram négatif. Thèse pharmacie. Dakar : Université Cheikh Anta Diop, 2007. 104.

19. KHALILZADEH P.

Formation de biofilm à Pseudomonas aeruginosa: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse Microbiologie. Toulouse: Université Paul SABATIER, 2009. 329.

20. LAVIGNE J.P.

Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. Faculté de médecine de Montpellier-Nîmes. [en ligne]. 2010 (consulté le 28 Janvier 2013). Mise à jour 04/03/2013. Disponible sur < <http://www.med.univ-montp1.fr> >.

21. LOBRIL J. R.

Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse biométrie. Lyon : Université Claude Bernard, 1998. 177.

22. NDOYE R.

Algorithmes d'identification des entérobactéries et des bacilles à Gram négatifs non fermentaires. Thèse pharmacie. Dakar : Université Cheikh Anta Diop, 2004. 93.

23. PERRIERE G.

Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation de certains aspects de l'expression des gènes chez E. coli UCBL. Thèse biométrie. Lyon: Université Claude Bernard, 1992.

24. PILET C., BOURDON J. L., TOMA B., ET AL.

Bactériologie médicale et vétérinaire. 2^e édition. Paris: Doins, 1979. 431. ISBN : 2 7040 0362 9.

25. SECK K. B.

Micro-méthode d'étude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes, des staphylocoques et des entérobactéries. Thèse pharmacie. Dakar, Université Cheikh Anta Diop, 2004. 104.

26. THABAUT A.

Les antibiotiques anti-*Pseudomonas aeruginosa* en 1995 : éléments microbiologiques. *Lettre de l'infectiologue*, 1995, 10, 9-14.

RESUME

TITRE : ETUDE PREDICTIVE DE L'EFFET BACTERICIDE D'ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES SUR DES SOUCHES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA MULTI-RESISTANTES

Lors du traitement des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, il est recommandé d'utiliser des associations d'antibiotiques bactéricides. Notre étude a consisté en la prédiction, grâce à des modèles mathématiques, de l'effet bactéricide d'associations d'antibiotiques.

L'effet bactéricide, sur des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes de deux associations d'antibiotiques: ceftriaxone-amikacine et ciprofloxacine-ceftriaxone, a été étudié. La prédiction a été effectuée grâce aux résultats de l'étude bactériostatique et repose sur l'hypothèse selon laquelle $CMB < 4 \times CMI$. Seuls les points qui présentaient une synergie lors de l'étude de la bactériostase ont été exploités grâce au logiciel OriginPro 8.5. Le modèle de courbe sigmoïde a été utilisé.

Pour l'association ceftriaxone(A)-amikacine(B) ont été modélisés 2 points: le **Point 1** (A=8µg/ml, B=0,5µg/ml) et le **Point 2** (A=8µg/ml, B=1µg/ml). En ce qui concerne l'association ceftriaxone(A)-ciprofloxacine(B) un **Point β** a été modélisé (A=8µg/ml, B=0,25µg/ml). Pour chaque point deux modèles ont été déclinés : un modèle pour lequel A est fixe et B croissant et un deuxième pour lequel A est croissant et B fixe.

L'équation générale des modèles est de type: $y = -a + \left(\frac{b}{1 + c \cdot x^3} \right)$. Pour le

Point 1 l'effet bactéricide a été obtenu pour A fixe et B croissant à **B=2µg/ml** ; et pour B fixe et A croissant à une concentration de **A=32µg/ml**. Pour le **Point 2** l'effet bactéricide a été obtenu pour A fixe et B croissant à **B = 4µg /ml**; et pour B fixe et A croissant à une concentration de **A = 32µg/ml**. Enfin en ce qui concerne le **Point β** l'effet bactéricide a été atteint pour A fixe et B croissant à **B = 1µg/ml** et pour A croissant et B fixe la bactéricidie a été obtenue pour **A = 32µg/ml**.

Ces courbes pourraient constituer une base pour des études ultérieures mais ne pourront être validées qu'après la vérification pratique de plusieurs de leurs points.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, bactéricidie, prédiction, modélisation, antibiotiques.