

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 15 OCTOBRE 2012
Par M. BELMILOUDI Soufien**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Evaluation du potentiel de l'UF-1000i® à mesurer l'action antibactérienne
des antibiotiques en milieu liquide. Application à des isolats cliniques multi-
résistants de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Luc DUBREUIL

Assesseur(s) : Monsieur le Professeur René COURCOL
Monsieur le Docteur Eric KIPNIS
Monsieur le Docteur Rodrigue DESSEIN



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Patrick PELAYO Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Monique CAPRON Professeur Salem KACET Madame Stéphanie DAMAREY Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Edouard DANJOU
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie

Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique

M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)
----	--------	-------	------------------------------

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique

M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)
----	---------	---------	--------------------------

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire

M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Melle	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A Monsieur le Professeur L. DUBREUIL

Professeur de bactériologie à la faculté de Pharmacie de Lille
Doyen de la faculté de Pharmacie de Lille

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence
de cette thèse. Je vous en remercie vivement et
vous exprime mon profond respect

A Monsieur le Professeur R. COURCOL

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef de service du laboratoire de Bactériologie-Hygiène du centre hospitalier régional universitaire de Lille.

Vous m'avez accueilli dans votre service au sein duquel j'ai reçu une formation bactériologique de qualité. Vous m'avez permis de réaliser cette étude. Aujourd'hui vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur E. Kipnis

Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Praticien Hospitalier du service de réanimation chirurgicale du centre hospitalier régional universitaire de Lille.

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.
Veuillez trouver ici mes sincères et respectueux
remerciements.

A Monsieur le Docteur R. DESSEIN

Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Praticien Hospitalier au laboratoire de Bactériologie-Hygiène du centre hospitalier régional universitaire de Lille.

Vous m'avez fait l'honneur de me confier et d'encadrer ce travail. Vous m'avez guidé dans l'élaboration de cette thèse par vos précieux conseils et votre rigueur. Je vous remercie pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger ce travail. Vous avez su vous rendre disponible dès que nécessaire et, par votre capacité de synthèse, me conseiller quotidiennement, avec pertinence. Permettez-moi d'exprimer ici toute ma reconnaissance et ma plus chaleureuse estime pour vous.

A Monsieur le Docteur F. WALLET

Praticien Hospitalier au laboratoire de Bactériologie-Hygiène du centre hospitalier régional universitaire de Lille.

Je vous remercie pour vos conseils. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance.

A tous les biologistes

Nadine, Caroline, Marie-Odile, Nicolas...

J'adresse tous mes remerciements et ma gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire de Bactériologie-Hygiène du centre hospitalier régional universitaire de Lille et en particulier au service des milieux, Madame Patricia Pishedda et à Bruno.

A vous, Maman et Papa, pour vos encouragements, votre soutien et surtout votre amour...

A mes frères et sœurs

A mes amis

A mes co-internes

Aux repreneurs de gardes...

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail

Et surtout, à TOI...

Table des matières

INTRODUCTION	1
I- Les paramètres descriptifs de l'action des antibiotiques	2
A) Interaction hôte-antibiotique ou la pharmacocinétique	2
B) Interaction antibiotique-agent infectieux ou la pharmacodynamie	3
1) Paramètres définis par les modèles statiques	3
2) Paramètres définis par les modèles dynamiques	4
II- Les paramètres descriptifs de l'efficacité des antibiotiques	8
A) La CMI comme paramètre de la relation PK/PD	8
1) Rapport ASC/CMI	9
2) Temps > CMI (T>CMI %)	11
3) Rapport Cmax/CMI	12
4) La relation PK/PD dans l'optimisation de l'antibiothérapie	12
B) Les courbes de bactéricidie comme paramètre de la relation du PK/PD	13
1) Modèle basé sur la concentration	13
2) Modèle basé sur l'ASC et la dose	14
III- L'étude d'associations d'antibiotiques	15
A) Méthode en point fixé	15
1) Méthodes par diffusion	15
2) Méthode par dilution ou méthode de l'échiquier	15
B) Méthode en cinétique	16
OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE	17
MATERIELS ET METHODES	19
I-Première étape: validation de l'UF-1000i® à dénombrer les bactéries en présence d'antibiotique	20
A) Le cytomètre d'urine UF-1000i®	20
B) Souches utilisées	21
C) Gamme de linéarité de la quantification bactérienne par l'UF-1000i® comparé au dénombrement en milieu solide	22
D) Courbe de bactéricidie par l'UF-1000i® sur des souches sensibles comparé à la méthode de référence en milieu solide	22
1) Principe	22
2) Souches utilisées	23
3) Nature et concentration d'antibiotiques utilisées	23
4) Mode opératoire	24
4) Mesure de la concordance des deux méthodes	24
II-Deuxième étape: Courbe de bactéricidie avec l'UF-1000i® sur des souches cliniques multi-résistantes de <i>P. aeruginosa</i>	25
A) Souches utilisées et antibiotiques testés	25
B) Choix des associations testées et leur concentration	26
RESULTATS	28
I-Capacité de l'UF-1000i® à dénombrer les bactéries	29
A) Numération de suspension bactériennes en absence d'antibiotique comparé au dénombrement sur gélose	29
1) Gamme de linéarité de la quantification bactérienne par l'UF-1000i®	29
2) Comparaison de la qualité de mesure de l'UF-1000i® au dénombrement par dilution en milieu solide gélosé à l'intérieur de l'intervalle de linéarité	30
	16

B) Courbe de bactéricidie par l'UF-1000i® sur des souches sensibles comparé à la méthode de référence en milieu solide	32
1) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	32
2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	34
A) Exemple d'association d'antibiotique additive correspondant aux patients « PAR » et « LEF »	37
B) Exemple d'association d'antibiotique synergique correspondant aux patients « BUR » et « LAB »	39
C) Exemple d'association d'antibiotique indifférente correspondant aux patients « BUR » et « DEL »	41
DISCUSSION	42
ANNEXES	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	66

INTRODUCTION

I- Les paramètres descriptifs de l'action des antibiotiques

A) Interaction hôte-antibiotique ou la pharmacocinétique

La pharmacocinétique (PK) définit le devenir sérique et tissulaire en fonction du temps de tout xénobiotique (figure 1). Quatre étapes fondamentales caractérisent le PK qui sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et enfin l'élimination (système ADME) (35, 58). L'absorption varie en fonction de la voie d'administration employée. En effet, un traitement administré par voie entérale, par exemple, nécessite une bonne biodisponibilité de la molécule pour passer la barrière digestive et atteindre une concentration suffisante dans la circulation générale pour être efficace. La distribution de la molécule dans les différents compartiments de l'organisme est fonction de la molécule, du taux de liaison aux protéines plasmatiques, des différentes barrières anatomo-physiologiques et de l'état clinique du patient (30, 34, 38, 53). Le métabolisme définit la biotransformation du principe actif en composés inactifs ou au contraire en composés plus actifs que la molécule administrée. Le foie constitue un des organes clés dans ce métabolisme. Enfin, l'excrétion de la molécule se fait majoritairement par la voie urinaire et/ou hépatique. Cette donnée est importante à connaître pour anticiper d'éventuels surdosages en cas de dysfonction de l'organe responsable de l'excrétion du produit.

De manière générale, ces facteurs vont interférer avec la concentration de la molécule au cours du temps modifiant l'exposition globale de l'organisme à la drogue. Lorsqu'une molécule antibiotique est administrée par voie orale, sa concentration sérique va augmenter jusqu'à atteindre un pic ou C_{max} qui est le maximum de concentration plasmatique en principe actif obtenue après administration. Il va être éliminé selon sa demi-vie. Dans le cas d'une injection par voie intraveineuse, le pic est atteint plus rapidement. Cet élément est apprécié par le T_{max} qui est le temps nécessaire pour atteindre la C_{max} après administration. Cette concentration d'antibiotique décroît jusqu'à atteindre la C_{min} qui est la concentration la plus faible d'antibiotique réellement obtenue entre 2 administrations. Le temps d'élimination de l'antibiotique est matérialisé par la demi-vie plasmatique ($T_{1/2}$) qui est le temps nécessaire pour que la concentration plasmatique de la drogue à l'instant t soit diminuée de moitié. Cette diminution dépend entre autre de l'élimination du produit authentifié par le calcul de la clairance plasmatique.

Globalement, l'aire sous la concentration en antibiotique au cours du temps (matérialisée par la ligne bleue, figure 1) détermine la quantité de drogue auquel est exposé l'individu et est dénommée aire sous la courbe (ASC).

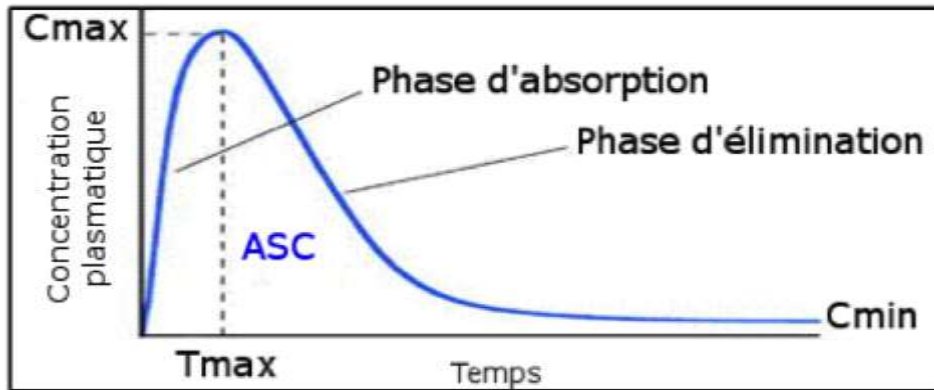


Figure 1. Courbe pharmacocinétique théorique rapportant la concentration d'un antibiotique circulant dans le sang

Enfin l'antibiotique se répartie dans tout le corps humain. Cette répartition est définie par le volume de distribution (VD) qui est un facteur de proportionnalité entre la quantité de principe actif dans l'organisme et sa concentration plasmatique. Il dépend de la liaison aux protéines plasmatiques et cellulaires, du débit sanguin au niveau des tissus ou des organes, des volumes liquidiens de l'organisme et de la nature physicochimique de la molécule.

B) Interaction antibiotique-agent infectieux ou la pharmacodynamie

La pharmacodynamie (PD) définit la relation entre la concentration de l'antibiotique, sérique et au site d'infection, et l'effet antimicrobien (7) (13, 15). Deux approches sont utilisées pour apprécier le PD. La première étudie l'action de l'antibiotique à un temps donné et à une concentration d'antibiotique fixe définissant des modèles statiques et la seconde fait varier le temps et/ou la concentration d'antibiotique définissant des modèles dynamiques.

1) Paramètres définis par les modèles statiques

Les principaux paramètres utilisés *in vitro* pour quantifier l'activité antibactérienne d'un antibiotique sont la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide.

a) La concentration minimale inhibitrice (CMI)

Elle correspond à la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute culture visible, à partir d'un inoculum standard d'environ 5.10^5 Unité Formant Colonie (UFC)/mL après 18 heures d'incubation à une température de 37°C (11, 35), donnant ainsi une valeur indicative de son activité bactériostatique (2).

b) La concentration minimale bactéricide (CMB)

Elle correspond à la plus petite concentration d'antibiotique qui ne laisse que 0,01% au moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C (2, 11, 35). La CMB est une valeur indicative de l'activité bactéricide de l'antibiotique.

Ainsi, un antibiotique sera considéré comme bactéricide lorsque la CMB est au moins égale à 4 fois la CMI (11); au dessous il sera considéré comme bactériostatique. Les antibiotiques bactéricides seront donc préférés en cas d'infection grave, d'inoculum important ou chez le patient immunodéprimé.

c) Intérêt de la CMI et de la CMB pour l'étude de l'action des antibiotiques

Les CMI permettent de classer la sensibilité de la bactérie en catégories thérapeutiques définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) : sensible, intermédiaire, ou résistant. L'étude des CMI est à la base de l'antibiogramme effectué en routine de laboratoire pour tester les antibiotiques actifs sur la souche isolée. Ces paramètres sont de bons prédicteurs de la puissance de l'interaction antibiotique-bactérie (1, 20, 28, 55).

2) Paramètres définis par les modèles dynamiques

Les informations apportées par les méthodes statiques ne reflètent pas de façon détaillée l'activité antibactérienne. L'évolution standard d'un inoculum bactérien en fonction du temps pour une concentration donnée d'antibiotique suit 3 phases qui ne sont pas mises en évidence avec les méthodes statiques (figure 2) : la phase de latence (lettre a, figure 2), la phase de bactéricidie (lettre b, figure 2), la phase de recroissance (lettre c, figure 2).

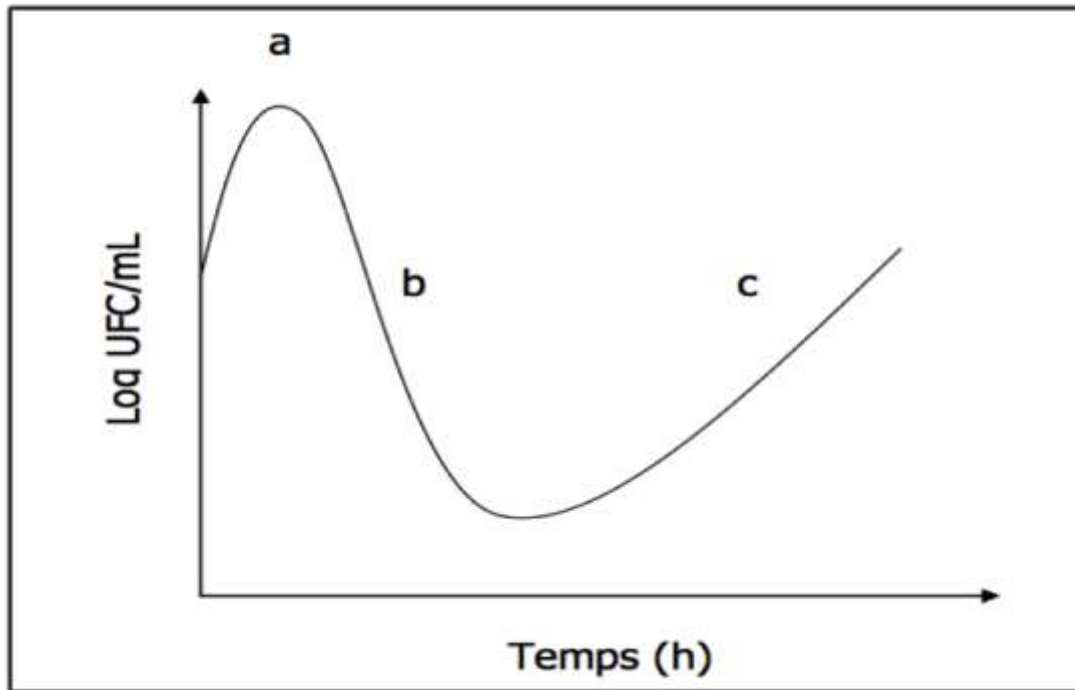


Figure 2. Cinétique d'évolution d'un inoculum bactérien sous l'action d'un antibiotique. a = phase de latence ; b = phase de bactéricidie ; c = phase de recroissance.

Cette courbe peut prendre des allures totalement différentes selon la bactérie et l'agent antimicrobien. C'est pourquoi, les méthodes dynamiques permettent de définir d'autres paramètres jugeant de l'effet des antibiotiques sur les bactéries.

a) Définition de la bactéricidie dans les modèles dynamiques à partir des courbes de bactéricidie

L'étude de l'action des antibiotiques au cours du temps révèle que l'augmentation de la concentration de certains antibiotiques est associée à une augmentation de l'effet bactéricide définissant des antibiotiques concentration-dépendants pour un temps d'exposition donné. C'est le cas des aminosides, des fluoroquinolones, du métronidazole, de la colistine, de la daptomycine et des kétolides. A l'inverse d'autres antibiotiques voient leur bactéricidie augmentée non pas par augmentation de leur concentration mais par augmentation de leur temps d'exposition sur la bactérie définissant les antibiotiques temps-dépendants. C'est le cas par exemple des β -lactamines et des macrolides (13, 14, 29). Néanmoins, il est nécessaire d'avoir une concentration minimale optimale d'antibiotiques. Dans le cas des β -lactamines, au

delà de 4 fois la CMI plus aucun gain de bactéricidie n'est constaté (73) (5, 17, 47, 59).

Les courbes de bactéricidie permettent d'évaluer, *in vitro*, la décroissance d'un inoculum bactérien en fonction du temps et des concentrations d'antibiotiques. Elles informent lors de la phase précoce sur le mode d'action de l'antibiotique par la dynamique temporelle de la destruction bactérienne et lors de la phase tardive sur l'éventuelle existence de résistance adaptative, sélection de mutants ou dégradation de l'antibiotique mis en évidence par un effet rebond ou recroissance.

La bactéricidie est l'activité d'un antibiotique qui entraîne une réduction accélérée d'un inoculum bactérien, elle dépend de la concentration de l'antibiotique, de son mode d'action et de sa durée d'activité. Un antibiotique est dit bactéricide lorsque pour une concentration donnée après 18 heures d'incubation à 37°C il détruit 99,99% (99,9% pour les Anglo-saxons) d'un inoculum bactérien. Ce qui correspond à une diminution de 4 logarithmes de base 10.

b) L'effet post-antibiotique, sub-inhibiteur et de sensibilisation aux leucocytes

L'effet post-antibiotique (EPA), l'effet sub-inhibiteur (ESI) et l'effet de sensibilisation aux leucocytes (ESL) dépendent de la bactérie, de la nature de l'antibiotique, sa concentration et de la durée d'exposition (39, 40, 49).

L'EPA *stricto-sensu* correspond au maintien de la suppression de la croissance bactérienne pendant un temps plus ou moins prolongé, après le retrait complet de l'antibiotique. Cet effet a été décrit par Eagle et Musselman (23). Modeste pour tous les antibiotiques vis-à-vis des bactéries à Gram positif, Il est par contre important pour les bactéries à Gram négatif dans le cas des antibiotiques ayant pour cible la synthèse protéique ou d'ADN et ayant une action concentration-dépendante (aminosides, fluoroquinolones)(27, 60). Il est dû à des altérations irréversibles ou lentement réversibles du métabolisme bactérien, probablement à la lenteur de l'efflux de ces antibiotiques après leur capture et leur transfert dans le cytoplasme bactérien. Les pénicillines, les céphalosporines et les monobactames ont un EPA court ou nul vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, probablement parce que ces antibiotiques agissent sans pénétrer le cytoplasme et peuvent donc être élués rapidement. Par contre, les carbapénèmes montrent un EPA supérieur aux autres β -lactamines mais plus faible que celui des aminosides. Enfin, l'association aminoside - β -lactamines peut produire un EPA synergique (58).

L'ESI correspond quant à lui à une diminution de croissance et/ou une perte de viabilité de bactéries exposées à une concentration en antibiotique inférieure à sa CMI. Ces bactéries montrent des altérations morphologiques (36, 37) indiquant des perturbations de leur métabolisme, ainsi qu'une sensibilisation aux mécanismes de défenses immunitaires de l'hôte (58).

Enfin l'ESL rend les bactéries exposées à des concentrations d'antibiotiques inhibitrices mais viables plus sensibles à la phagocytose et pourraient être aussi plus sensible à la lyse intra-phagocytaire. Ce phénomène est clairement démontré pour les antibiotiques dont la cible thérapeutique est la synthèse protéique et résulte probablement d'altérations des constituants de surface (58).

Ces différents effets peuvent se cumuler au cours du temps révélant la complexité de l'interaction antibiotique-bactéries.

c) La concentration prévenant la sélection de mutants

La CMI est mesurée pour un inoculum bien standardisé ($5 \cdot 10^5$ UFC.mL⁻¹) avec des concentrations fixes d'antibiotique. Cependant sur le site de l'infection, l'inoculum peut être bien plus important et les concentrations d'antibiotique variables au cours du temps. En effet, plus l'inoculum bactérien est important, plus la probabilité d'isoler des mutants naturellement résistants à l'antibiotique administré augmente également aboutissant à un risque d'échec thérapeutique (3). Ainsi, il est possible de définir *in vitro* une concentration d'antibiotique capable de prévenir l'émergence de mutants (CPM) (6, 21). Cette CPM correspond à la plus faible concentration d'antibiotique capable de prévenir la croissance de mutants résistants face à un inoculum bactérien de 10^{10} UFC.mL⁻¹. La probabilité de sélection de mutants varie d'une espèce bactérienne à l'autre et d'un antibiotique à l'autre. Elle a surtout été décrite en utilisant comme famille d'antibiotique celle des fluoroquinolones.

II- Les paramètres descriptifs de l'efficacité des antibiotiques

Le paragraphe précédent nous a permis de définir un certain nombre de paramètres PK et PD descriptifs de l'action des antibiotiques. Si l'on considère maintenant la mesure de l'efficacité d'un antibiotique au cours du temps, elle dépend à la fois de l'exposition globale de la bactérie à l'antibiotique apprécié par le PK, et l'effet direct de l'antibiotique, sur la bactérie apprécié par le PD (figure 3) (19, 41).

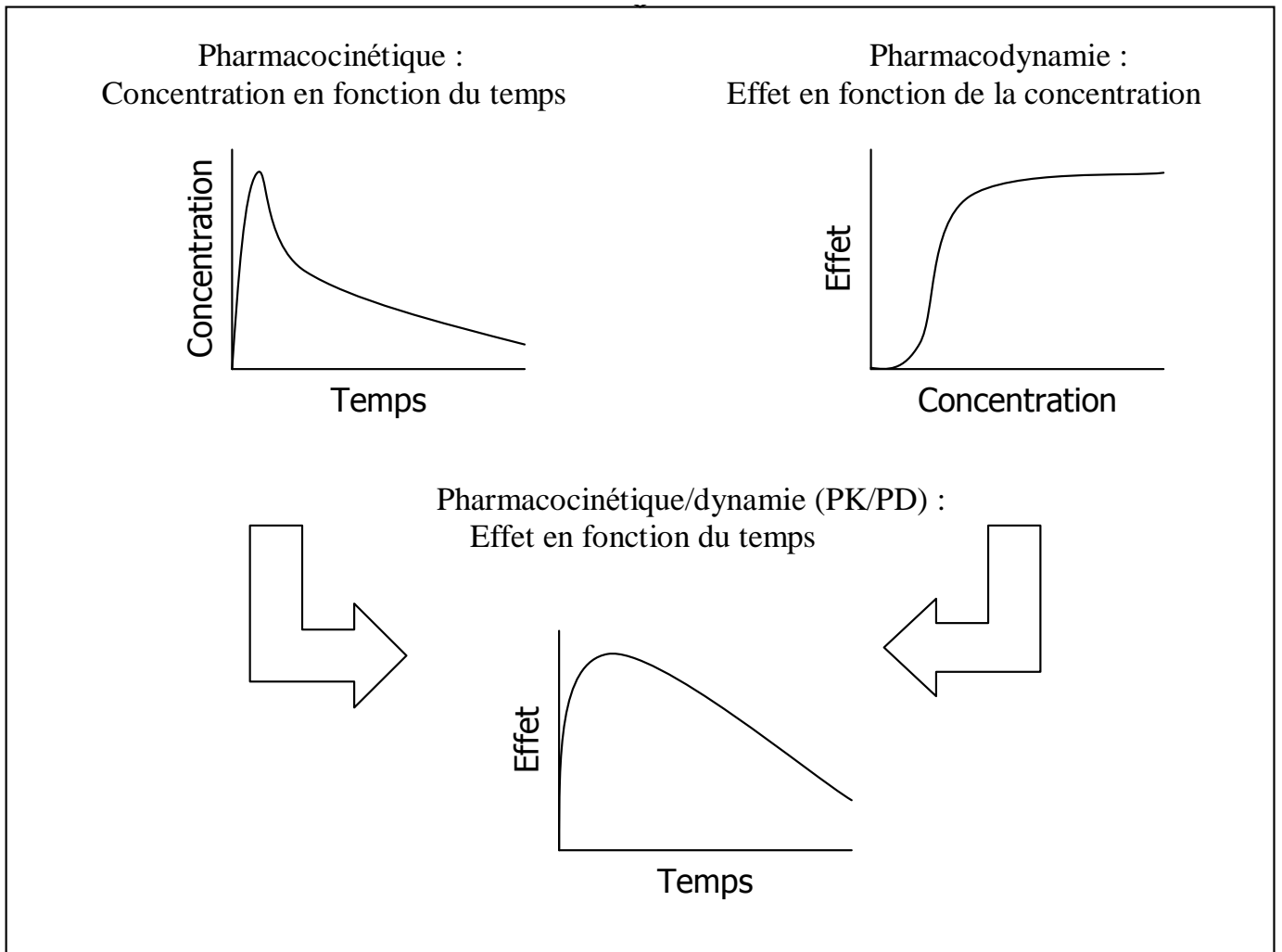


Figure 3. Définition de la relation PK/PD ou l'efficacité d'un antibiotique

A) La CMI comme paramètre de la relation PK/PD

Lorsque les caractéristiques pharmacocinétiques de l'antibiotique au cours du temps sont confrontés avec la CMI, nous obtenons la courbe présentée en figure 4. Cette approche permet d'individualiser plusieurs facteurs descriptifs de l'effet des antibiotiques chez l'homme. Il est important de noter dès à présent que ces différents

paramètres PK/PD ainsi individualisés n'influencent pas l'efficacité ou la toxicité des différentes familles d'antibiotiques de façon semblable.

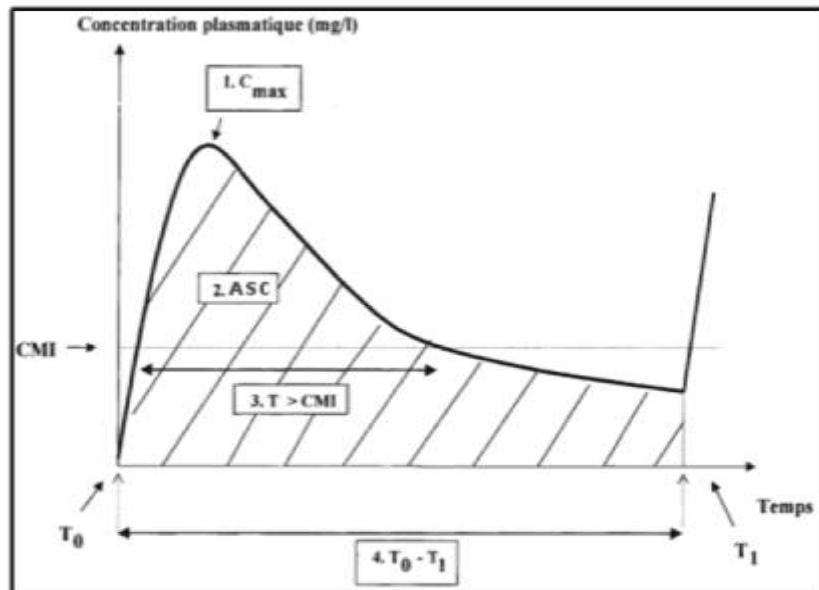


Figure 4. Paramètres PK/PD dépendant de la CMI. 1. C_{max} = concentration maximale ; 2.ASC = aire sous la courbe concentration-temps ; 3. $T > CMI$ = intervalle de temps pendant lequel la concentration plasmatique est au-dessus de la CMI ; 4. $T_0 - T_1$ = intervalle entre deux administrations ; CMI = concentration minimale inhibitrice.

1) Rapport ASC/CMI

L'ASC quantifie l'exposition à un principe actif. Ce facteur lorsqu'il est rapporté à la CMI définit l'exposition optimale efficace de l'antibiotique. A titre d'exemple nous prendrons celui des fluoroquinolones. Comme le révèle un modèle de souris neutropéniques infectées à *Streptococcus pneumoniae*, l'augmentation de l'ASC des fluoroquinolones est associée à une décroissance du nombre de bactérie dans les organes infectés (52). Pour les ASC faibles, une absence d'effet de l'antibiotique est observée. Mais, Drusano et al. vont plus loin et démontre dans un modèle de rat infecté à *Pseudomonas aeruginosa* et traité par fluoroquinolone que l'efficacité de l'antibiothérapie dépend non seulement de l'ASC mais aussi de la CMI de la souche infectante (figure 5) (22).

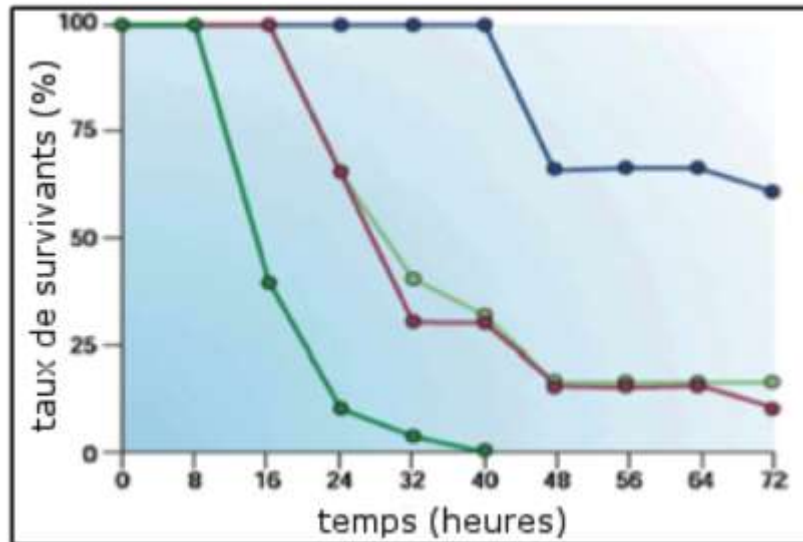


Figure 5. (d'après 25) Taux de survie de quatre groupes de rats neutropéniques infectés par des souches de *P. aeruginosa* isogéniques ayant différentes valeurs de CMI pour la lomefloxacin et traités avec des doses journalières (DJ) différentes. Tracé bleu : CMI = 1mg.L⁻¹, DJ = 80mg.kg⁻¹ ; tracé vert pâle : CMI = 4mg.L⁻¹, DJ = 80mg.kg⁻¹ ; tracé rouge : CMI = 1mg.L⁻¹, DJ = 20mg.kg⁻¹ ; tracé vert foncé : CMI = 8mg.L⁻¹, DJ = 80mg.kg⁻¹. Nous observons une réponse similaire des deux groupes (tracés rouge et vert pâle) ayant des CMI et aires sous courbes (ASC), exprimées en dose journalière, différentes mais un rapport ASC/CMI identique ainsi qu'une meilleure réponse pour le groupe avec le rapport ASC/CMI le plus élevé (tracé bleu).

La réponse thérapeutique est donc fonction du rapport entre l'exposition et la puissance de l'antibiotique ou ASC/CMI. De manière générale, pour pouvoir observer une amélioration de l'efficacité de l'antibiothérapie le rapport ASC/CMI doit avoir une valeur minimum dépendant de l'antibiotique et de l'agent infectieux.

En effet, il a été montré pour la ciprofloxacine qu'un rapport ASC/CMI < 125 était associé à un échec thérapeutique alors qu'au dessus la guérison était atteinte dans 80% des cas (26). Certains auteurs suggèrent même d'avoir comme cible un rapport ASC/CMI > 250 voire 350 lorsque l'index thérapeutique le permet pour augmenter la vitesse de bactéricidie des fluoroquinolones et d'augmenter les chances de succès clinique mais également de réduire l'émergence de mutants résistants.

En effet, il existe une relation entre l'exposition et la sélection de résistants (figure 6) (44).

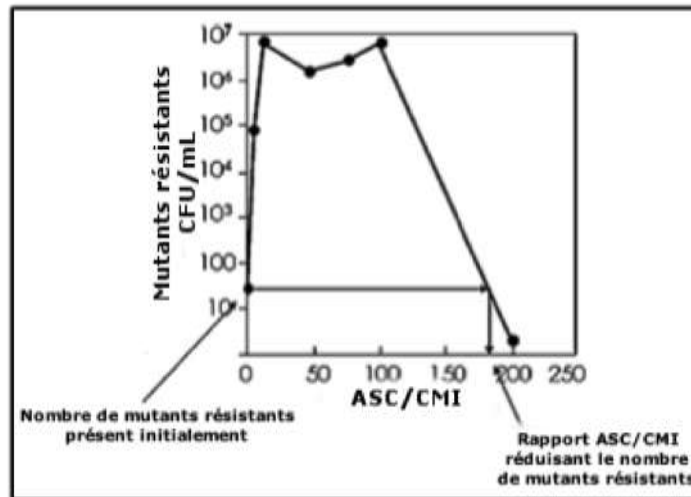


Figure 6. Variation de l'effectif d'une sous-population moins sensible à une quinolone en fonction du rapport aire sous la courbe (ASC) / concentration minimale inhibitrice (CMI). Représentation de la taille en UFC/mL de la sous-population résistante en fonction du rapport ASC/CMI. L'origine correspond au nombre de colonies résistantes avant l'initiation du traitement. Nous constatons que de faibles expositions provoquent une amplification considérable de la sous-population résistante. Nous observons alors une diminution de cette population résistante seulement lorsque le rapport $ASC/CMI > 190$ c'est à dire lorsque la dose est supérieure à la CPM. Cette sélection de mutants résistants dépend de l'inoculum de départ (risque proportionnel à sa taille), de la durée de traitement (augmente avec la durée) et enfin de l'immunité du patient.

Dans le cas des fluoroquinolones, nous avons vu que l'optimisation de l'ASC/CMI augmente l'efficacité. Néanmoins, ce rapport n'est pas le plus pertinents pour apprécier tous les antibiotiques ; notamment pour les β -lactamines ou les aminosides.

2) Temps > CMI (T>CMI %)

Ce paramètre mesure la fraction de temps pendant lequel les concentrations sériques d'antibiotique sont maintenues au dessus de la CMI entre 2 administrations (45). Ce paramètre est tout à fait adapté pour évaluer l'efficacité des antibiotiques temps-dépendants comme les β -lactamines. D'ailleurs, Craig et al. ont démontré chez des animaux infectés par *S. pneumoniae* que le taux de survie était de 90%-100% lorsque le taux sérique de β -lactamine étaient supérieurs à la CMI pendant au

moins la moitié de l'intervalle entre deux doses (12, 16, 46). De manière globale, un $T > CMI$ de 50 à 70% est nécessaire pour obtenir une activité bactéricide. En raison d'un EPA plus important, ce pourcentage peut être diminué pour les carbapénèmes lorsque des bactéries à Gram négatif sont visées (13, 17, 57). L'augmentation du temps passé au dessus de la CMI est empêché par les demi-vies des β -lactamines qui sont en général courte obligeant à réitérer avec un faible intervalle la perfusion qui peut même être administré en continue. Toutefois, le contrôle de la cible thérapeutique peut se faire par dosage de l'antibiotique mais qui peut surestimer l'efficacité clinique dans le cas de diffusion tissulaire faible des β -lactamines (7, 8).

3) Rapport Cmax/CMI

Le rapport Cmax/CMI définit le quotient inhibiteur (QI) qui est un paramètre prédicteur d'efficacité des antibiotiques concentration-dépendants. De nombreuses études démontrent l'intérêt de ce paramètre pour évaluer l'efficacité des aminosides (4, 5, 18, 32, 33, 43). Moore et al. (43) mettent en évidence chez des patients souffrant d'infections graves à bactéries à Gram négatif qu'une Cmax atteignant d'emblée une valeur de 8 fois la CMI est associé à un taux de succès thérapeutique approchant les 95%. De même, ils démontrent l'inutilité d'administrer des doses rapprochées et valide l'administration unique journalière de cette famille de molécule. L'autre avantage est la diminution de la toxicité des aminosides.

4) La relation PK/PD dans l'optimisation de l'antibiothérapie

L'avancée notable de ces dernières années a été l'individualisation d'une corrélation entre certains paramètres PK/PD caractéristique d'une famille particulière d'antibiotique et le succès thérapeutique observé chez les patients. Autrement dit, une amélioration des valeurs de ces paramètres PK/PD améliore la guérison des patients. Dans le tableau 1 sont présenté les paramètres PK/PD clefs de chaque famille d'antibiotique qu'il faut optimiser pour améliorer l'efficacité du traitement (d'après (13)).

Tableau 1. Paramètres PK/PD et optimisation d'antibiothérapies.

Effet antibactérien	Antibiotiques	Indices PK/PD prédominants	Objectif de l'antibiothérapie
Concentration-dépendant	Aminosides	C_{max}/CMI	Augmenter les concentrations
	Fluoroquinolones Kétolides Daptomycine	ASC_{0-24}/CMI	
Temps-dépendant			
Avec effets persistants minimes ou nuls	Toutes les β -lactamines	$T_{>CMI}$	Augmenter la durée de l'exposition
Avec effets persistants prolongés	Azithromycine Clindamycine Glycopeptides Linézolide Macrolides Tétracyclines	ASC_{0-24}/CMI	Augmenter l'exposition

Cependant, bien que ces paramètres soient des prédicteurs utiles de l'efficacité de l'interaction antibiotique-bactérie, cette approche a deux inconvénients. Du point de vue pharmacocinétique, l'ensemble de ces modèles comparent la CMI à des mesures obtenues à partir de la courbe de concentration-temps mesuré dans le plasma. Ainsi, deux facteurs importants sont négligés: la liaison aux protéines et la distribution dans les tissus qui doit être prise en compte, étant donné que la plupart des infections ne se produisent pas dans le plasma, mais dans l'espace interstitiel des tissus.

B) Les courbes de bactéricidie comme paramètre de la relation du PK/PD

Bien que les courbes de bactéricidie permettent une interprétation dynamique des interactions antibiotique-bactérie, la puissance de cette approche n'est pleinement exploitée que si les données sont analysées au moyen de modèles mathématiques. Fondés sur des données expérimentales ces modèles servent ensuite de base pour simuler différents scénarii de posologie. Plusieurs modèles mathématiques basés sur la concentration d'antibiotique, sur l'ASC ou la dose ont été proposés à cet effet(46).

1) Modèle basé sur la concentration

Zhi et al. ont publié les solutions mathématiques représentant les interactions pharmacodynamiques linéaires et non linéaires entre β -lactamines et micro-

organismes (61). Ces modèles ont été appliqués à l'activité de la pipéracilline vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris neutropénique et ont permis de mettre en évidence un modèle non linéaire saturable.

Des modèles similaires basés sur la concentration « EC50 » induisant la moitié de l'effet maximal (Emax) sont très utilisés pour décrire la pharmacodynamie des β -lactamines (48) et permettent de déterminer la CMI pour un couple antibiotique-souche donné.

2) Modèle basé sur l'ASC et la dose

Firsov et al. ont utilisé un modèle *in vitro* dynamique avec dilution, et étudié l'effet des antibiotiques. Ils ont proposé deux paramètres afin de caractériser ces interactions qui sont la durée de l'effet antimicrobien (TE) et l'intensité de cet effet (IE). Le premier paramètre, TE, est défini par le temps écoulé entre le moment de l'administration et celui où le nombre de bactéries atteint à nouveau son niveau initial, et IE est le différentiel entre les courbes de croissance microbienne, en présence et en absence d'antibiotique (24). Ces paramètres ont été comparés à des indicateurs de bactéricidie et de cinétique de repousse en fonction des relations ASC-effet pour des quinolones. Les comparaisons ont été faites sur la base de quatre critères: la relation à l'ASC, la sensibilité, la robustesse et la capacité prédictive. Les auteurs concluent que l'IE et le TE ont respecté les quatre critères et proposent l'IE comme une mesure plus universelle de l'effet antimicrobien (25). Sur le même modèle, les paramètres prédictifs les plus couramment utilisés (ASC/CMI, ASC>CMI, et t>CMI) ont été comparés et des corrélations linéaires ont été établies entre IE et log ASC/CMI, log ASC>CMI et log t>CMI.

III- L'étude d'associations d'antibiotiques

Classiquement, l'emploi d'association de un ou plusieurs antibiotique(s) permet d'élargir le spectre antibactérien, d'obtenir un effet synergique pour renforcer la bactéricidie ou prévenir l'émergence de mutants résistants aux antibiotiques. En pratique clinique, les associations sont particulièrement utilisées pour traiter les infections graves non documentées. Enfin, la présence d'une bactérie multirésistante aux antibiotiques peut justifier l'emploi de plusieurs antibiotiques inefficaces lorsqu'administrés seuls.

Cependant, associer les antibiotiques n'est pas toujours heureux. *In vitro*, il existe quatre résultats possibles de l'utilisation d'association antibiotiques. Tout d'abord, l'association de plusieurs antibiotiques diminue la quantité bactérienne plus fortement que lorsqu'un seul antibiotique de l'association est utilisée, définissant la synergie. Cette différence sera significative pour un écart de deux logarithmes entre les deux valeurs. Lorsque l'association est égale à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément, cela définit un effet additif. En outre, certaines associations n'offrent aucun avantage par rapport à l'utilisation des antibiotiques seuls, on parle alors d'indifférence. Enfin, il existe des antibiotiques dont l'association aboutit à un effet bactéricide significativement inférieur à celui de l'antibiotique le plus actif on parle alors d'antagonisme. *In vitro*, l'étude de ces associations est réalisée en général à l'aide de courbe de bactéricidie, méthode *in vitro* considérée comme la plus informative sur l'action des antibiotiques obtenus *in vivo*.

A) Méthode en point fixé

1) Méthodes par diffusion

Elles permettent une évaluation qualitative à 24 heures des effets bactériostatiques des associations. Il s'agit de placer deux disques rapprochés ou de disposer perpendiculairement deux bandelettes imprégnées d'antibiotique, à la surface d'une géloseensemencée par la bactérie à étudier. L'observation des zones d'inhibition permet de détecter les synergies ou les antagonismes.

2) Méthode par dilution ou méthode de l'échiquier

Ici différentes concentrations de deux antibiotiques, A et B, sont associées entre

elles deux à deux. Après ensemencement avec la bactérie à étudier et incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures on note les concentrations pour lesquelles se produit une inhibition de la croissance. Le résultat est exprimé en Fraction de Concentration Inhibitrice (FIC), index équivalent à la somme des FIC pour chaque molécule :

$$\text{avec } FIC = FIC_A + FIC_B = CMI_{A+B}/CMI_A + CMI_{B+A}/CMI_B$$

(CMI_{A+B} correspond à la CMI de l'antibiotique A en présence de l'antibiotique B, CMI_{B+A} correspond à la CMI de l'antibiotique B en présence de l'antibiotique A).

Le profil de l'isobogramme, FIC_A en fonction de FIC_B , est différent selon que l'effet est synergique ou antagoniste. Si le FIC est inférieur à 0,75, l'association est synergique, elle est additive s'il est équivalent à 1, indifférente s'il est compris entre 1 et 2 et antagoniste s'il est supérieur à 2.

A l'inverse de l'effet bactériostatique, la bactéricidie n'est généralement pas proportionnelle à la concentration de l'antibiotique et le nombre de survivants peut demeurer stable pour une large gamme de concentrations. Il est donc le plus souvent impossible de définir l'interaction de deux antibiotiques en fractions de concentrations actives et de calculer un index comme dans le cas précédent.

B) Méthode en cinétique

Cette méthode consiste à analyser l'évolution d'un inoculum bactérien dans le temps, en fonction de différentes concentrations d'antibiotiques seuls ou en association. Le dénombrement bactérien est effectué avant incubation (T_0), après différents temps définis d'incubation à 37°C au cours des 6 premières heures (phase précoce) puis à 24 heures d'incubation (phase tardive). Le dénombrement, phase fastidieuse, s'effectue par ensemencement des différentes dilutions géométrique de raison 10 sur milieu gélosé. La cinétique est représentée graphiquement par une courbe indiquant le \log_{10} du nombre d'UFC par ml de culture bactérienne en fonction du temps. La courbe dite « témoin » correspond au comportement de l'inoculum bactérien ne recevant aucun antibiotique. Cette méthode permet d'apprécier la bactéricidie de façon quantitative et qualitative, l'éventuelle recroissance bactérienne et les effets persistants. Les résultats sont obtenus 24 à 48 heures après, délai nécessaire à la phase de dénombrement.

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Sur le plan pharmacodynamique, le clinicien ne dispose seulement en pratique clinique que de la CMI en méthode statique. Elle est très utile car corrélée au succès thérapeutique sur des souches qui ont des CMI basses aux antibiotiques. Cependant dans un certain nombre de services cliniques comme les secteurs de réanimation, une augmentation de fréquence des infections graves à bactéries multi-résistantes est observée, souvent sur des terrains débilisés, justifiant le recours à des associations d'antibiotiques pour espérer améliorer l'efficacité des molécules sur la bactérie causale ou de maintenir un large spectre d'activité dans le cadre d'infection poly-microbienne.

Dans ce contexte, bon nombre d'auteurs ont décrit *in vitro* à l'aide de courbe de bactéricidie en milieu liquide, une capacité de certains antibiotiques, caractérisés par leur CMI élevée envers la bactérie causale et répondus résistants sur l'antibiogramme, à diminuer quand même l'inoculum lorsqu'ils sont associés. Cet effet est dépendant de la souche et de son mécanisme de résistance aux antibiotiques. Mais, l'étude de ces associations en modèle dynamique est longue et lourde sur le plan technique, coûteux à implémenter et n'est donc pas disponible au quotidien.

Nous avons émis l'hypothèse que l'automate d'analyse urinaire UF-1000i® de Sysmex-BioMérieux pouvait être utilisé pour dénombrer les bactéries à différents temps d'incubation après mise en contact avec un ou plusieurs antibiotiques et être ainsi utilisé pour effectuer des équivalents de courbes de bactéricidie. Cet appareil utilise une technologie de fluorocytométrie en flux qui permet la discrimination des différents éléments, ainsi que leur quantification grâce à un marquage des acides nucléiques par un fluorochrome. Il peut ainsi dénombrer les bactéries présentes dans un liquide en quelques secondes. Appliqué à la courbe de bactéricidie, cet outillage raccourcirait le délai de résultat en évitant les 24 heures d'incubation nécessaires pour dénombrer les bactéries comme c'est le cas avec la méthode de référence. Si sa performance est validée, cette analyse pourrait, en outre, devenir accessible à tout laboratoire possédant ce type d'automate.

Nous avons donc évalué, dans ce travail, si l'automate d'analyse urinaire UF-1000i® de Sysmex-BioMérieux peut être détourné de son usage premier pour effectuer des courbes de bactéricidie et évalué son application à l'étude de souches infectantes de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistantes aux antibiotiques.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons divisé notre approche en 2 étapes. La première a été d'évaluer les limites de l'UF-1000i® dans le dénombrement des bactéries avec ou non ajout d'antibiotique en utilisant des souches bactériennes sensibles. Nous l'avons comparé à la méthode de référence. La deuxième a consisté à évaluer notre appareil sur des associations validées dans la littérature pour être active ou au contraire inactive sur des souches de *P. aeruginosa* multirésistant.

I-Première étape: validation de l'UF-1000i® à dénombrer les bactéries en présence d'antibiotique

A) Le cytomètre d'urine UF-1000i®

L'UF-1000i® de Sysmex-BioMérieux (figure 7) discrimine les différents éléments, ainsi que leur quantité, par la mesure de la diffusion (fonction de la taille de l'élément), de la dispersion (liée à la structure interne de l'élément) et de la fluorescence liée au marquage des acides nucléiques par un fluorochrome. Il utilise deux fluorochromes différents, un dans chaque chambre réactionnelle, qui sont des polyméthines, un pour les bactéries (UF II Search Bac), l'autre pour tous les autres éléments cellulaires (UF II Search Sed). La mesure se fait dans 2 canaux distincts, un dédié aux bactéries et l'autre à la cytologie afin d'éviter toute interférence.



Figure 7. Cytomètre d'urine UF-1000i®.

Le principe est basé sur la mesure des propriétés optiques des éléments transportés par un liquide vecteur jusqu'à une source d'excitation lumineuse (un laser à semi-conducteur). Après avoir placé les échantillons sur le passeur, ces derniers sont automatiquement homogénéisés par aspiration-refoulement et traités à une cadence très variable (de 15 à 100 échantillons par heure) selon la concentration en

particules, le temps de décontamination étant fonction de cette concentration. Un volume de 1,2 mL (0,8 mL en mode manuel) est aspiré puis distribué après dilution dans deux chambres réactionnelles où le marquage au fluorochrome est effectué. Pour l'analyse de bactéries il y a une phase de perméabilisation par l'UF II Pac Bac précédent le marquage.

L'échantillon marqué est injecté dans un canal d'écoulement entouré d'un liquide de gaine où il subit une focalisation hydrodynamique permettant la séparation et l'alignement des particules. Chaque particule ainsi individualisée sera irradiée par le faisceau laser et pourra être analysée après collection de ses propriétés optiques et analyse multi-variée de ces signaux. La lumière diffusée, dispersée ou émise par fluorescence par les particules doit être convertie en voltage par un détecteur pour être mesuré, voltage qui est ensuite converti en valeur numérique. Le détecteur dépend du nombre de photons à mesurer. Il s'agira de photodiode pour les signaux très intenses (diffusion, dispersion) et de photomultiplicateur pour les signaux faibles (fluorescence) car plus sensible.

Il est recommandé lors de la numération bactérienne par cytométrie en flux d'analyser des suspensions bactériennes après croissance en milieu liquide (42) afin de limiter le nombre de débris (produit de lyse bactérienne), événements parasites car de taille trop proche des bactéries.

B) Souches utilisées

Nous avons utilisé 5 souches multi-sensibles aux antibiotiques. Trois d'entre elles étaient des souches de référence : *Staphylocoque aureus* ATCC 25923, *Eschericia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ces souches sont conservés au sein du laboratoire à -80°C sur milieu glycérolé et réensemencées sur gélose Mueller Hinton incliné 24 heures avant chaque série de techniques. Les deux dernières souches, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* dénommées respectivement STABER et LAPVER, ont été isolées en routine à partir d'hémocultures de patients issus du service d'urgences médicales. L'identification de ces souches a été vérifiée à l'aide de l'automate Microflex® Bruker basée sur la technologie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight).

C) Gamme de linéarité de la quantification bactérienne par l'UF-1000i® comparé au dénombrement en milieu solide

A partir d'une culture pure sur gélose BCP Biomérieux® ou gélose au sang Oxoid® selon la bactérie, deux ou trois colonies sont émulsionnées dans un tube stérile à fond conique type Falcon de 50 mL contenant 10mL de bouillon MH CM0405 Oxoid® reconstitué. Le tube est incubé quelques heures, selon le temps de croissance de la bactérie (3 à 4 heures pour les entérobactéries et les cocci Gram positif et 6 à 7 heures pour *Pseudomonas aeruginosa*), dans une étuve à 37°C sur agitateur afin d'obtenir un inoculum en phase exponentielle à 0,5 Mc Farland soit environ 10^8 UFC.mL⁻¹. Cet inoculum subit une série de dilutions décimales consécutives.

Après homogénéisation de la dilution à prélever, 0.1mL précisément, de chaque dilution, sont ensemencés à l'aide d'un étaleur, par ordre décroissant, sur une gélose BCP Biomérieux® pour les bacilles Gram négatif et sur une gélose au sang Oxoid® pour les cocci Gram positif. Les géloses sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures au terme desquels seront dénombrés les colonies en choisissant les boîtes qui contiennent entre 30 et 300 colonies tout en vérifiant la cohérence inter-dilution.

Les mêmes inocula et dilutions sont mesurées en parallèle par l'UF-1000i®

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieur d'un intervalle de mesure des résultats directement proportionnels.

Les valeurs s'échelonnant de 10 à 10^{10} UFC.mL⁻¹, il est ainsi plus approprié de travailler sur les logarithmes des valeurs obtenues. K correspond au facteur reliant les logarithmes des valeurs X_{10}^n mesurées par l'UF-1000i® à leur dilution décimale X_{10}^{n-1} :

$$\log_{10} X_{10}^n = \log_{10} X_{10}^{n-1} + K$$

D) Courbe de bactéricidie par l'UF-1000i® sur des souches sensibles comparé à la méthode de référence en milieu solide

1) Principe

La cinétique de l'activité bactéricide par la technique de référence est déterminée en dénombrant à intervalles de temps définis les bactéries survivantes cultivées en

présence d'antibiotique(s). Après préparation d'un inoculum en phase exponentielle puis dilué au 1/100^{ème} afin d'obtenir un inoculum à environ 10⁶ UFC.mL⁻¹, la méthode a consisté à dénombrer les bactéries viables à intervalles de temps définis (0h, 2h, 4h, 6h, 12h et 24h) après incubation en milieu liquide de chaque souche avec des antibiotiques seuls ou en association.

2) Souches utilisées

Nous avons utilisé 2 souches multi-sensibles aux antibiotiques. Toutes deux étaient des souches de référence : *Eschericia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3) Nature et concentration d'antibiotiques utilisées

Nous avons utilisé les formes pharmaceutiques disponibles à la pharmacie centrale du centre hospitalier régional et universitaire de Lille en privilégiant les formes injectables (Tableau 2).

Tableau 2. Antibiotiques utilisés pour établir les courbes de bactéricidie sur des souches bactériennes sensibles.

Caractéristiques des antibiotiques utilisés				
Pricipe actif	Nom de la spécialité	Forme galénique	Fabricant	Numéro de lot et date de péremption
Ceftazidime	Ceftazidime PANPHARMA®	Poudre 1g pour solution injectable	Panpharma	203196 01/2015
Ceftriaxone	Ceftriaxone PANPHARMA®	Poudre 1g pour solution injectable	Panpharma	202120 02/2015
Ciprofloxacine	Ciprofloxacine PANPHARMA®	Solution injectable 2mg/1mL	Panpharma	00289 09/2013
Gentamicine	Gentamicine PANPHARMA®	Solution injectable 10mg/1mL	Panpharma	10467 10/2014

Les concentrations d'antibiotiques testées s'échelonnent de trente-deux fois la CMI à une fois la CMI avec un facteur de dilution de 2 entre chaque concentration. Les concentrations des solutions mères d'antibiotiques, sont toutes préparées extemporanément dans du MH CM0405 Oxoid® (ne nécessitant aucune supplémentation en magnésium et calcium).

Les CMI des souches aux antibiotiques testés en courbe de bactéricidie a été déterminée par la méthode E-test®. Le E-test® permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de

l'antibiotique à tester. Il associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencée selon la technique de Kirby-Bauer avec un inoculum de la souche et séchée 10 minutes à 37°C. Après incubation à 37°C pendant 24h, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent une estimation de la valeur de la CMI.

4) Mode opératoire

Les solutions d'antibiotique(s) et l'inoculum bactérien sont distribués dans des tubes stériles de 50 mL à fond conique de type Falcon selon le tableau 3 avant de les homogénéiser et de dénombrer les bactéries sur le tube témoin au temps zéro (t0).

Tableau 3. Composition des milieux réactionnels en fonction du nombre d'antibiotiques associés.

	Inoculum (mL)	ATB 1 (mL)	ATB 2 (mL)	ATB 3 (mL)	MH oxoid® (mL)	Total milieu réactionnel (mL)
Tube témoin	17	0	0	0	3	20
Tube ATB 1	17	1	0	0	2	20
Tube ATB 2	17	0	1	0	2	20
Tube ATB 3	17	0	0	1	2	20
Tube ATB 1+2	17	1	1	0	1	20
Tube ATB 1+2+3	17	1	1	1	0	20

Puis tous les tubes sont mis en agitation dans une étuve à 37°C.

4) Mesure de la concordance des deux méthodes

a) Droite de régression et coefficient de corrélation

Les mesures de 25 suspensions bactériennes de concentrations différentes incluses dans l'intervalle de linéarité, pour chaque bactérie, par l'UF-1000i® sont comparées au dénombrement par la technique des dilutions sériées sur milieu gélosé.

Les mesures suivant une loi logarithmique-normale, les équations des droites de régression linéaire seront de type :

$$\log_{10} Y = A \log_{10} X + \log_{10} B$$

Avec Y = UF-1000i®; X = Culture ; A la pente et B l'ordonnée à l'origine

b) Méthode de Bland et Altman

La méthode de Bland et Altman représente les différences des résultats obtenus par les deux techniques (en ordonnées) en fonction de la moyenne de ces résultats (en abscisses). Elle permet de calculer un intervalle de confiance de la différence des mesures.

Son intérêt est double, il permet d'abord de visualiser les erreurs en fonction de la valeur des résultats et ainsi repérer les zones où ces erreurs sont élevées et enfin donner un ordre de grandeur de l'erreur de mesure facilement interprétable et donc beaucoup plus informative que le simple coefficient de corrélation.

II-Deuxième étape: Courbe de bactéricidie avec l'UF-1000i® sur des souches cliniques multi-résistantes de *P. aeruginosa*

A) Souches utilisées et antibiotiques testés

Dix souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* issues de divers isolats cliniques (hémoculture, cathéter, liquide de drain, urine, dépistage BMR anal) de patients hospitalisés dans le service de Réanimation Chirurgicale du CHRU de Lille ont été sélectionnées sur plusieurs années chez des patients indépendant d'un contexte épidémique. Ces souches ont été gardé dans les mêmes conditions que les souches précédentes et ont été réensemencées sur gélose BCP Biomérieux® 24 heures avant chaque série de techniques. Le caractère phénotypique de résistance aux antibiotiques des souches choisies est présenté dans le tableau ci dessous.

Tableau 4. Origine et antibiotype des différentes souches utilisées.

souche	nature du prélèvement	service	Caractéristiques principales des dix souches étudiées												
			sensibilité aux antibiotiques												
			ticarcilline	ticarcilline/acide clavulanique	pipéracilline	pipéracilline/tazobactam	ceftazidime	céfépime	imipénème	aztréonam	tobramycine	amikacine	gentamycine	colistine	ciprofloxacine
LEF	liquide de drain	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R
BUR	urine	neurologie	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
DIB	dépistage anal	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
STA	cathéter	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
DEL	trachéal	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
PAR	hémoculture	chirurgie digestive	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	S	R
LAB	urine	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
DEM	trachéal	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R	R	S	R
BOD	hémoculture	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	I	R	R
CHE	trachéal	réanimation chirurgicale	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	I	S	R

Les CMI de chaque antibiotique testé a été vérifiées par méthode E-test.

Nous avons utilisé les formes pharmaceutiques disponibles à la pharmacie centrale en privilégiant les formes injectables. Concernant la colistine, la forme utilisée en santé humaine est une pro-drogue inactive *in vitro* nécessitant une hydrolyse, nous avons alors utilisé du sulfate de colistine directement actif disponible en médecine vétérinaire. Les caractéristiques des antibiotiques sont présentées ci-dessous.

Tableau 5. Antibiotiques utilisés pour établir les courbes de bactéricidie sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants.

Caractéristiques des antibiotiques utilisés				
Pricipe actif	Nom de la spécialité	Forme galénique	Fabricant	Numéro de lot et date de péremption
Amikacine	Amikacine MYLAN®	Solution injectable 50mg/1mL	Mylan	H1009 02/2014
Aztréonam	Azactam®	Poudre 1g pour solution injectable	Sanofi aventis	1G67191 07/2014
Azithromycine	Zithromax®	Poudre 1500mg/37,5mL pour suspension buvable	Pfizer	134200 12/2014
Ceftazidime	Ceftazidime PANPHARMA®	Poudre 1g pour solution injectable	Panpharma	203196 01/2015
Ciprofloxacine	Ciprofloxacine PANPHARMA®	Solution injectable 2mg/1mL	Panpharma	00289 09/2013
Colistine	Colistine Sulfate Virbac®	Solution buvable 2 000 000 UI/mL	Virbac Santé animale	3LTW 11/2013
Imipénème	Imipenem Cilastatin PANPHARMA®	Poudre 500mg pour solution injectable	Panpharma	IC0003D2 10/2013
Pipéracilline	Pipéracilline PANPHARMA®	Poudre 1g pour solution injectable	Panpharma	110010 10/2014
Rifampicine	Rifadine®	Poudre 600mg pour solution injectable	Sanofi aventis	A1391 05/2013

B) Choix des associations testées et leur concentration

Nous avons choisi d'utiliser les différents antibiotiques à des concentrations reconnues dans la littérature comme étant efficace quand elles sont utilisées selon certaines associations sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistants.

Notre stratégie était d'utiliser des combinaisons à des concentrations issues d'article publié par Oie en 2003 et 2009 (50, 51), ainsi que par Landman en 2005 (9). Nous avons donc utilisé des associations dont l'efficacité a été montrée dans ces travaux mais aussi des associations reconnues comme inefficaces par Oie en 2003 (51).

Les concentrations utilisées correspondent aux concentrations critiques définis par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) en 1990. La colistine est utilisée à 2 mg.L⁻¹, la rifampicine à 1 mg.L⁻¹, l'imipénème à 4 mg.L⁻¹,

l'azithromycine à 4 mg.L^{-1} (9, 51), l'aztréonam à 16 mg.L^{-1} , la ceftazidime à 16 mg.L^{-1} , l'amikacine à 4 mg.L^{-1} (50, 51) et enfin la piperacilline à 64 mg.L^{-1} et la ciprofloxacine à 2 mg.L^{-1} (50).

RESULTATS

I-Capacité de l'UF-1000i® à dénombrer les bactéries

A) Numération de suspension bactériennes en absence d'antibiotique comparé au dénombrement sur gélose

1) Gamme de linéarité de la quantification bactérienne par l'UF-1000i®

Le facteur $K = 1,0 \pm 0,1$ seulement entre 10^8 et 10^3 UFC.mL⁻¹ quelque soit la bactérie, en dehors de cet intervalle K prend des valeurs totalement aléatoire.

Tableau 6. Facteur de linéarité reliant les dilutions successives.

	Dilutions décimales successives									
	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
<i>K.E.faecalis</i>	0	0,3	0,9	1,0	1,1	1,0	1,0	0,3	-0,5	
<i>K.S.aureus</i>	0	0,3	1	0,9	1,1	1,1	0,9	0,3	-0,5	
<i>K.E.coli</i>	0	0,2	1,0	1,0	1,0	0,9	1,1	0	0,3	
<i>K.K.pneumoniae</i>	0	0,2	1,0	1,1	1,1	0,9	0,9	-0,18	0,5	
<i>K.P.aeruginosa</i>	0	0	0,9	1,0	1,1	0,9	1,0	0,6	0,0	

En conclusion, la numération par l'UF-1000i® est linéaire dans une gamme comprise entre 10^3 et 10^8 UFC.mL⁻¹, en dehors de ces bornes la linéarité n'est plus respectée. La représentation graphique de l'intervalle de linéarité est représenté en annexe 1, graphique 1.

2) Comparaison de la qualité de mesure de l'UF-1000i® au dénombrement par dilution en milieu solide gélosé à l'intérieur de l'intervalle de linéarité

a) Droite de régression et coefficient de corrélation

Les équations de droite et coefficients de corrélation de Pearson, R^2 , liant les deux méthodes sont représentées dans le tableau ci-dessous.

	Equation droite de régression	Coefficient de Corrélation
<i>E.faecalis</i>	$\log_{10} Y = 1,00 \log_{10} X - 0,23$	$R^2 = 0,9979$
<i>S.aureus</i>	$\log_{10} Y = 1,00 \log_{10} X - 0,21$	$R^2 = 0,9990$
<i>E.coli</i>	$\log_{10} Y = 1,04 \log_{10} X - 0,38$	$R^2 = 0,9829$
<i>K.pneumoniae</i>	$\log_{10} Y = 1,06 \log_{10} X - 0,44$	$R^2 = 0,9866$
<i>P.aeruginosa</i>	$\log_{10} Y = 1,00 \log_{10} X - 0,17$	$R^2 = 0,9920$

En conclusion, les équations obtenues montre bien une relation linéaire forte entre ces deux méthodes dans l'intervalle 10^3 à 10^8 UFC.mL⁻¹. Le détail des nuages de points, accompagné de la représentation des droites sont représentés en annexe 1, graphiques 6 à 10.

b) Méthode de Bland et Altman

La méthode de Bland et Altman a montré un biais négatif compris entre $0,166 \log_{10}$ et $0,296 \log_{10}$ UFC.mL⁻¹ selon la bactérie. Ce biais est représenté pour chaque bactérie dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8. Biais de mesure lors de dénombrement par l' UF-1000i®.

	Biais \log_{10} UFC.mL ⁻¹
<i>E.faecalis</i>	-0,244
<i>S.aureus</i>	-0,218
<i>E.coli</i>	-0,271
<i>K.pneumoniae</i>	-0,296
<i>P.aeruginosa</i>	-0,166

En conclusion, nous constatons une sous-estimation du dénombrement effectué par l'UF-1000i® dans l'intervalle de linéarité de 10^3 à 10^8 UFC.mL⁻¹. Pour le détail des graphiques de Bland et Altman concernant chaque bactérie se référer à l'annexe 1, graphiques 6 à 10.

B) Courbe de bactéricidie par l'UF-1000i® sur des souches sensibles comparé à la méthode de référence en milieu solide

1) *Escherichia coli* ATCC 25922

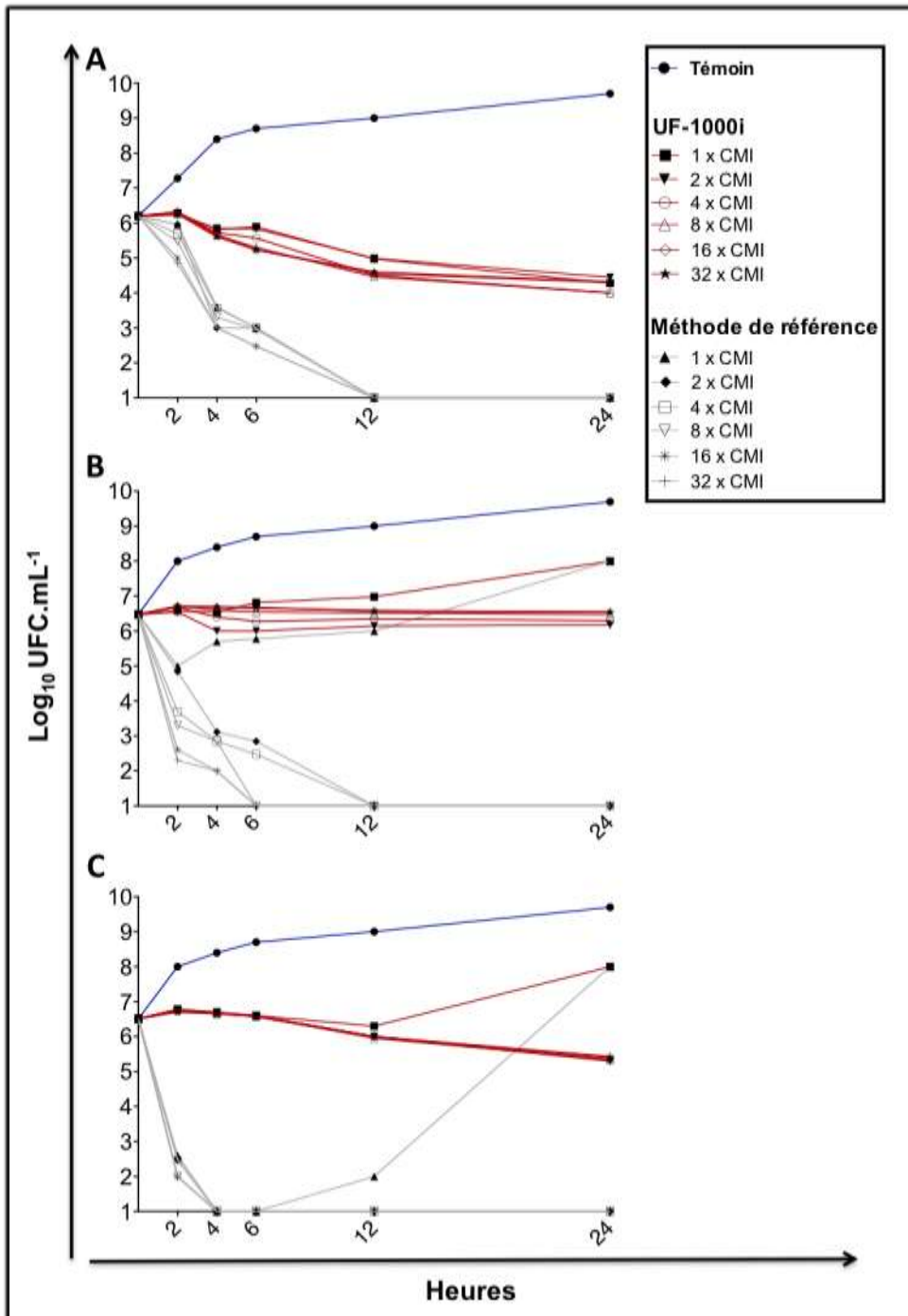


Figure 8. Courbe de bactéricidie d'une souche de *E.coli* multi-sensible effectuée avec l'UF-1000i® et la méthode de référence. A = *E. coli* soumis à des concentrations croissantes de ceftriaxone ; B = *E. coli* soumis à des concentrations croissantes de ciprofloxacine; C = *E. coli* soumis à des concentrations croissantes de gentamicine.

En présence de ceftriaxone une diminution de l'inoculum de $5,2 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ à 24 heures est observée avec la méthode de référence quelque soit la CMI alors qu'elle est de $2,2 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour les concentrations supérieures à 2 fois la CMI avec l'UF-1000i®, et de $1,9 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour la concentration inférieure.

Pour une concentration de ceftriaxone strictement égale à la CMI, aucune repousse n'est visible que ce soit avec la méthode de référence ou l'UF-1000i®.

Lorsque la ciprofloxacine est mise en contact avec *P. aeruginosa* il est observé une diminution à 24 heures de $5,5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour toutes les concentrations supérieures à la CMI alors qu'elle est n'est pas visible avec l'UF-1000i®. Cependant, pour une concentration de ceftriaxone strictement égale à la CMI, une repousse est notée avec les deux méthodes.

Enfin, la réduction de l'inoculum observée après ajout de la gentamicine avec la méthode de référence est comprise entre $3,9 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour les concentrations inférieures ou égale à 4 fois la CMI, et $4,5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour les concentrations supérieures, dans les deux premières heures pour atteindre à 24 heures $5,5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour toutes les concentrations sauf pour celle égale à la CMI pour laquelle une repousse est visible à partir de la 6^{ème} heure. L'UF-1000i® quantifie une diminution de $1,2 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ à 24 heures pour toutes les concentrations strictement supérieures à la CMI. Lorsque une concentration égale à la CMI est utilisée, une repousse est visible à partir de la 12^{ème} heure.

2) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

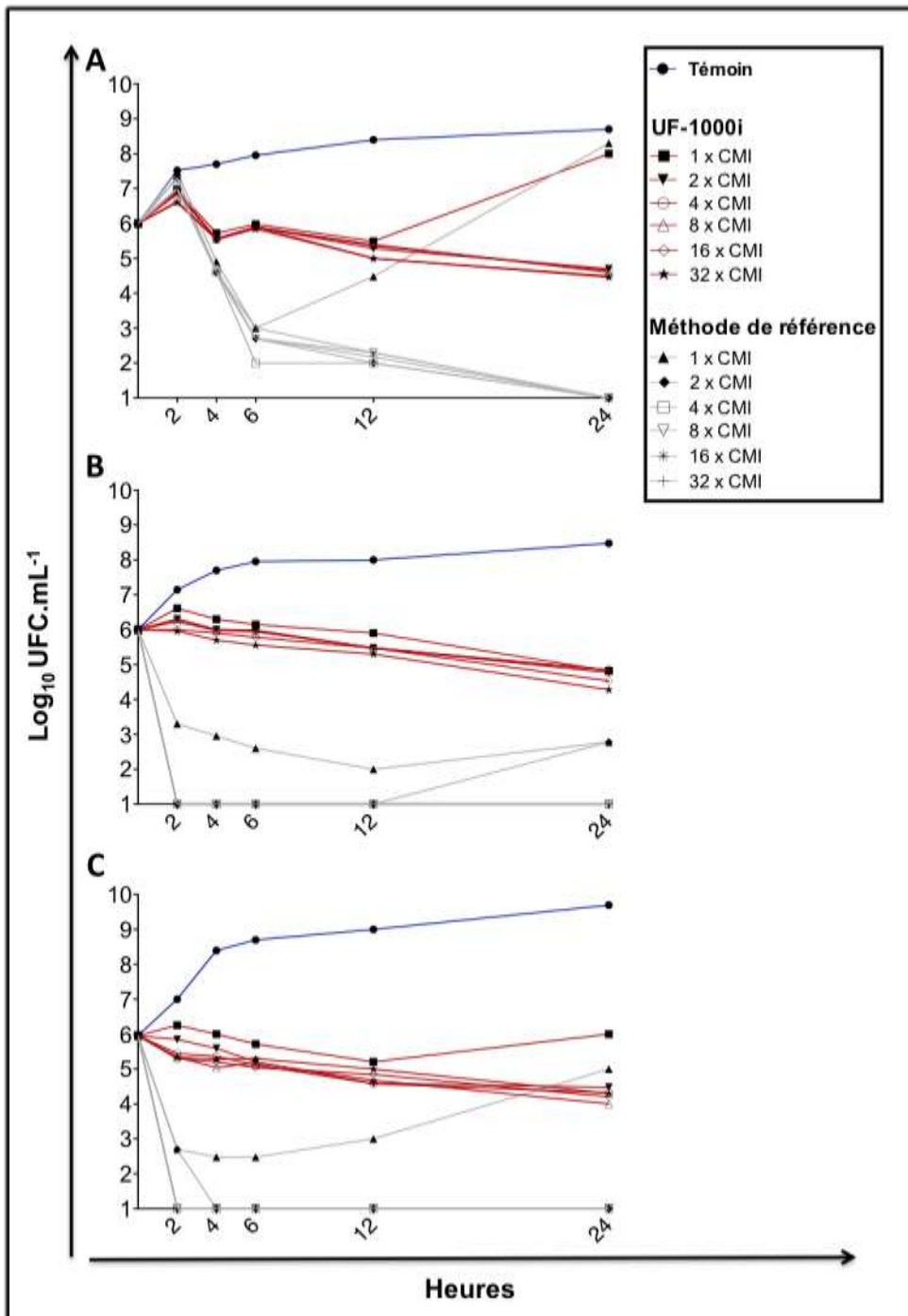


Figure 9. Courbe de bactéricidie d'une souche de *P. aeruginosa* multi-sensible effectuée avec l'UF-1000i® et la méthode de référence. A = *P. aeruginosa* soumis à des concentrations croissantes de ceftazidime ; B = *P. aeruginosa* soumis à des concentrations croissantes de ciprofloxacin ; C = *P. aeruginosa* soumis à des concentrations croissantes de gentamicine.

En présence de ceftazidime une phase de latence pendant laquelle la taille de l'inoculum augmente de 0,6 à 1,5 \log_{10} UFC.mL⁻¹ est visible avec les deux méthodes. Il s'ensuit une décroissance importante, de 4 à 5,3 \log_{10} UFC.mL⁻¹ pour les

concentrations supérieures à la CMI, avec un maximum atteint pour la concentration égale à 4 fois la CMI avec la méthode de référence, et d'une baisse moins conséquente pour l'UF1000-i® de seulement $1,4 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour toutes les concentrations strictement supérieure à la CMI. Pour une concentration égale à la CMI, une repousse est observée à la 6^{ème} heure avec la méthode de référence et à la 12^{ème} heure avec l'UF-1000i®.

Lorsque la ciprofloxacine est mise en contact avec *P. aeruginosa*, une diminution de l'inoculum comprise entre $3,2 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour les concentrations inférieure ou égale à 2 fois la CMI, et $5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour les concentrations strictement supérieures à 2 fois la CMI, est observée à 24 heures avec la méthode de référence alors qu'elle est comprise entre $1,2$ à $1,7 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ avec l'UF-1000i® quand les concentrations augmentent.

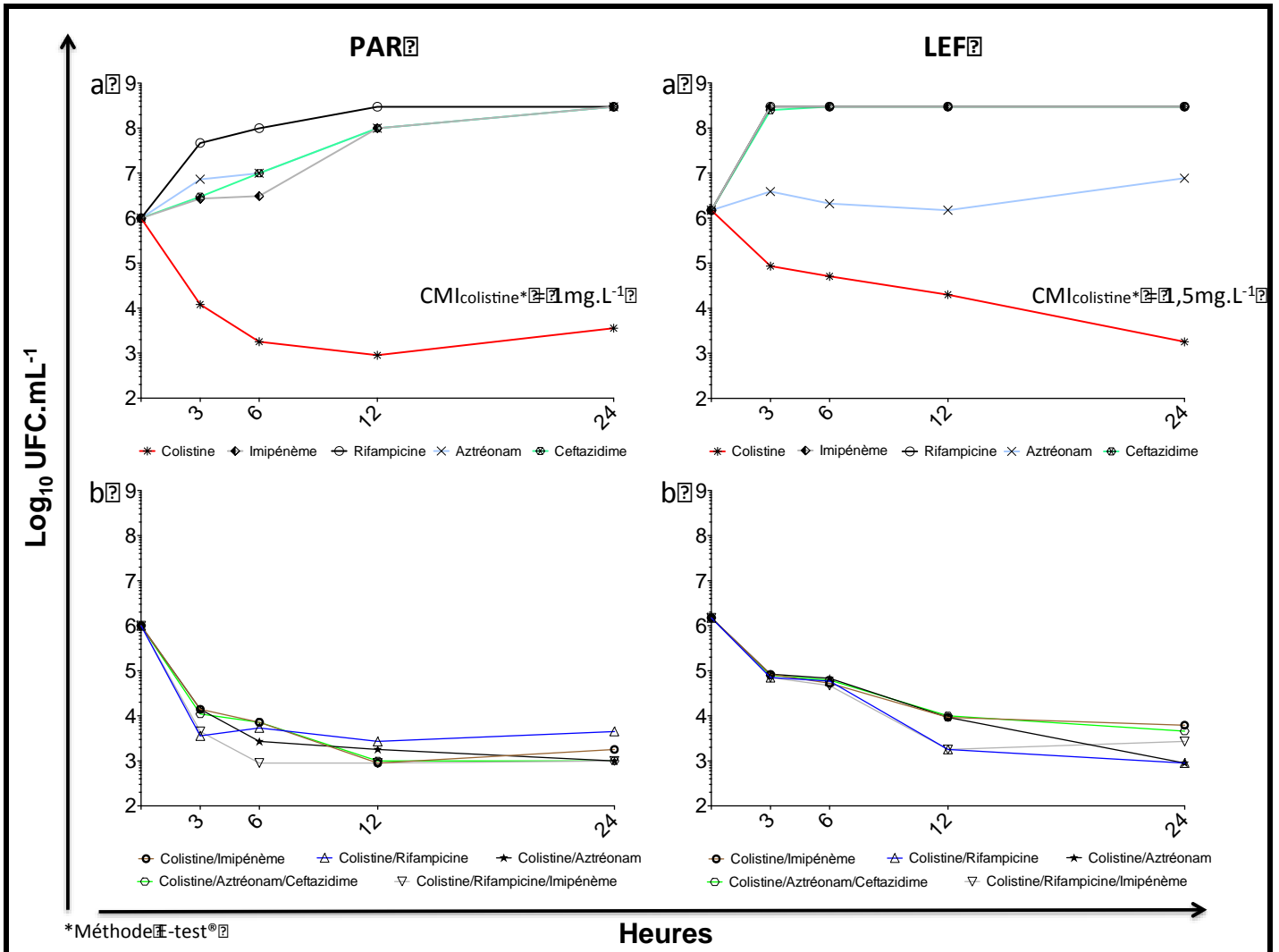
En ce qui concerne l'effet de la gentamicine, une diminution brutale de l'inoculum comprise entre $3,3 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour les concentrations inférieure ou égale à 2 fois la CMI, et $5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour celles qui sont supérieures, est constatée à la 2^{ème} heure pour atteindre $5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour toutes les concentrations supérieures à la CMI à 24 heures avec la méthode de référence, alors qu'elle est comprise entre $1,5 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour les concentrations inférieures ou égales à 4 fois CMI, et $2 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, pour les concentrations supérieures, à 24 heures avec l'UF-1000i®. Lorsqu'une concentration égale à la CMI est utilisée, une recroissance est visible à partir de la 6^{ème} heure avec la méthode de référence et à la 12^{ème} heure avec l'UF-1000i®.

Cette première étape de validation montre une différence importante entre l'étude de la bactéricidie effectuée par l'UF-1000i® et la méthode de référence. Pour l'UF-1000i® une diminution de 1 ou $2 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ correspond à une bactéricidie alors qu'avec la méthode de référence la bactéricidie correspond à une diminution de $4 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$. Il sous-estime donc le pouvoir bactéricide réel des antibiotiques et ne peut en aucun cas être considéré comme un équivalent de la méthode de référence. En revanche, l'UF-1000i® met bien en évidence les phases de latence, de repousse et de bactériostase.

II-Courbe de bactéricidie avec l’UF-1000i® sur des souches cliniques multi-résistantes de *P. aeruginosa*

La facilité d’utilisation de l’ UF-1000i® nous a permis d’étudier un grand nombre d’associations contre nos 10 souches de *P. aeruginosa* multi-résistants. Nous avons décidé par soucis de clarté de présenter les résultats les plus marquants observés avec cette méthode, c’est dire les associations que nous pouvons considérer comme additives, synergiques ou indifférentes. Néanmoins, toutes les associations réellement testées sont présentées en annexe 2 du document. Dans cette annexe, chaque patient testé a fait l’objet d’une fiche reprenant l’antibiogramme et les différentes associations d’antibiotiques testées en courbe de bactéricidie avec l’UF-1000i®.

A) Exemple d'association d'antibiotique additive correspondant aux patients
« PAR » et « LEF »



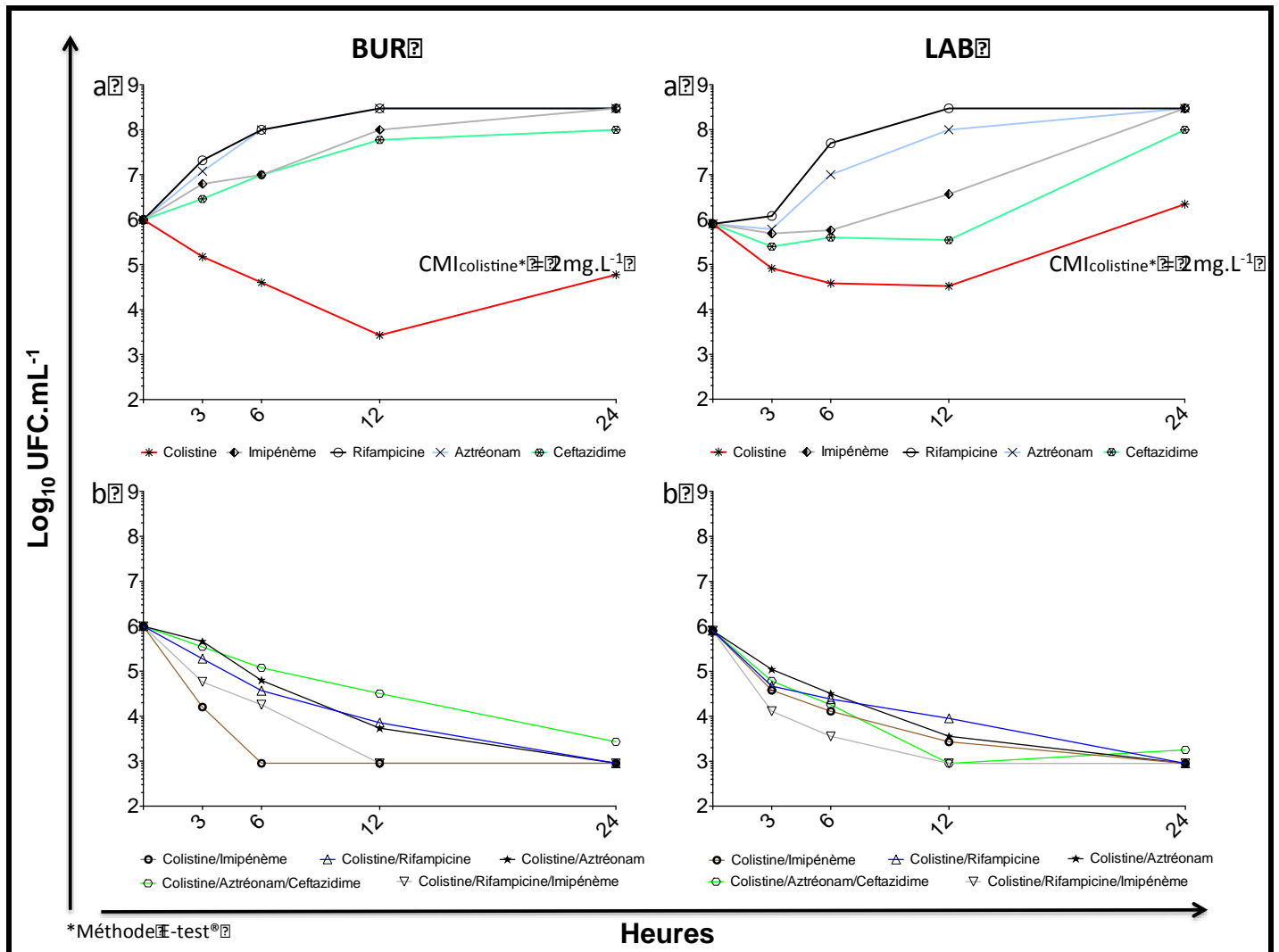
Excepté pour la colistine, tous les antibiotiques testés seuls sont inactifs sur *P. aeruginosa* (graphes PAR a et LEF a). Ces résultats sont cohérents avec les CMI élevées de ces molécules envers *P. aeruginosa* objectivées sur l'antibiogramme et vérifiées par la méthode des E-tests (annexe 2).

Par rapport à la colistine seule, nos différentes associations testées n'entraînent au mieux qu'une diminution de $0,6 \text{ log}_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ de *P. aeruginosa* (graphe PAR b et LEF b). Ces associations peuvent être qualifiées tout au plus d'additif.

En considérant sur nos 10 souches les 3 dont la CMI de la colistine est inférieure à 2 mg.L⁻¹, 2 d'entre elles sont additives pour l'association de la colistine/rifampicine ± imipénème et colistine/aztréonam ± ceftazidime (voir annexe 2 patient PAR, LEF et STA).

Il est à noter que pour les 3 souches de *P. aeruginosa* dont la CMI de la colistine est inférieure à 2 mg.L⁻¹, une repousse est observée chez 2 d'entre elles. Cette repousse n'est pas observé lorsque la colistine est associée à la rifampicine ± imipénème et à l'aztréonam ± ceftazidime (voir annexe 2 patient PAR et STA).

B) Exemple d'association d'antibiotique synergique correspondant aux patients « BUR » et « LAB »



Excepté pour la colistine, tous les antibiotiques testés seuls sont inactifs sur *P. aeruginosa* (graphes BUR a et LAB a). Ces résultats sont cohérents avec les CMI élevées de ces molécules envers *P. aeruginosa* objectivées sur l'antibiogramme et vérifiées par la méthode des E-tests (annexe 2).

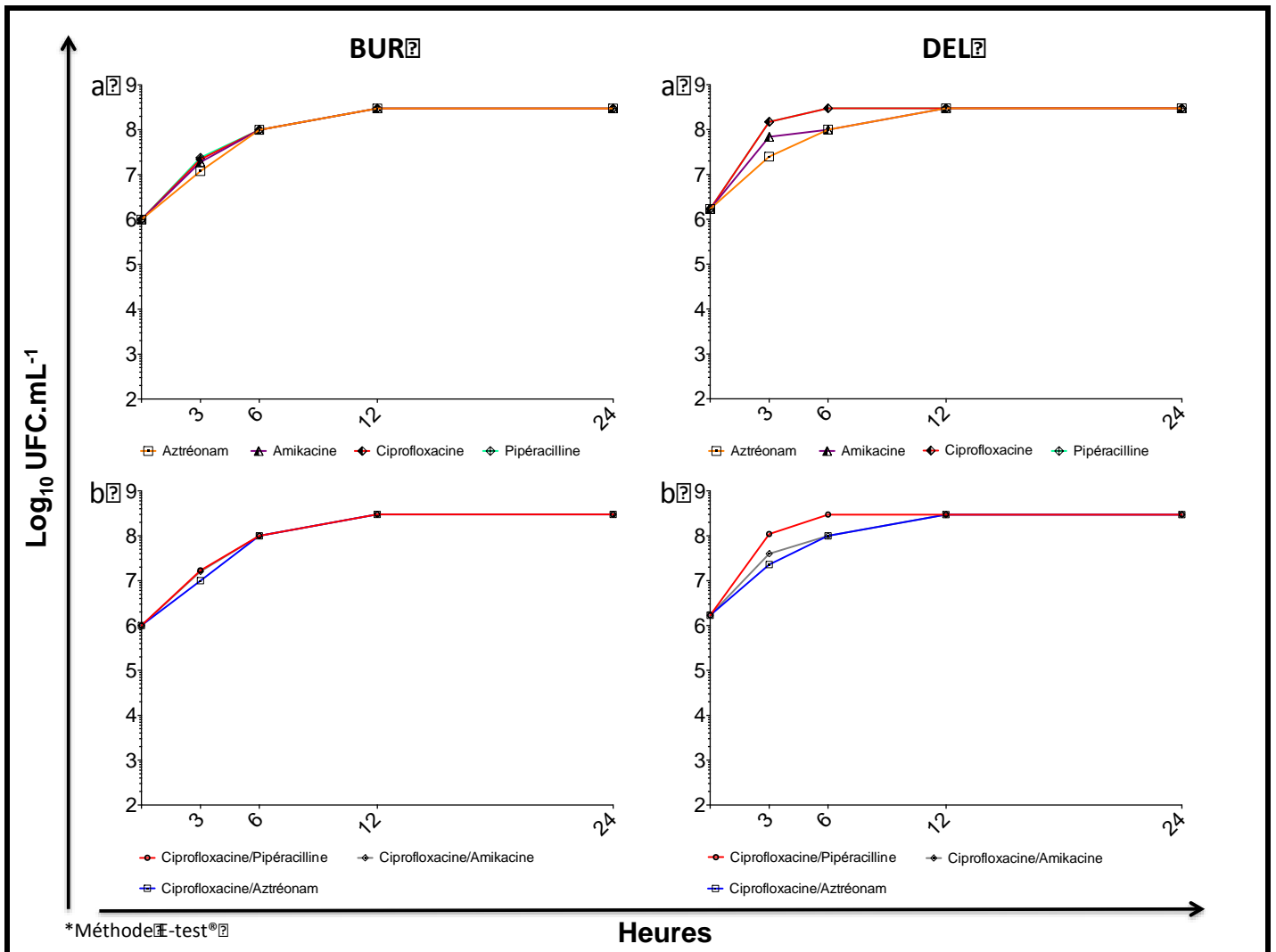
Une recroissance importante est observée à partir de la 12^{ème} heure. Les associations colistine/impipénème, colistine/rifampicine ± impipénème et colistine/aztréonam entraînent toutes une diminution de l'inoculum à 24 heures supérieur de 2 log₁₀ UFC.mL⁻¹ par rapport à la colistine seule. Nous pouvons conclure à un effet synergique de ces associations.

En considérant sur nos 10 souches les 7 dont la CMI de la colistine est supérieure ou égale à 2 mg.L^{-1} , 4 d'entre elles sont synergiques pour l'associations de la colistine/rifampicine \pm imipénème et colistine/aztréonam \pm ceftazidime (voir annexe 2 patient BUR, BOD, LAB et CHE).

Un patient ayant une CMI de la colistine égale à 1 mg.L^{-1} a une repousse telle qu'il est possible d'observé un effet synergique équivalente aux patients BUR et LAB. (annexe 2 patient STA).

Enfin sur les 10 souches testées nous observons avec 7 souches (annexe 2 souches BOD, LAB, CHE, DEM, PAR, DEL ET DIB) que l'association colistine/rifampicine/imipénème entraine la diminution la plus importante de l'inoculum pendant la phase précoce.

C) Exemple d'association d'antibiotique indifférente correspondant aux patient « BUR » et « DEL »



Aucun effet des associations testées n'est observé pour les associations ciprofloxacine/pipéracilline, ciprofloxacine/aztréonam et ciprofloxacine/amikacine (51). La croissance de *P. aeruginosa* sans antibiotique est superposable à celle de *P. aeruginosa* mis en contact avec un ou la combinaison d'antibiotique. Sur nos 10 souches, cette situation est observée dans 9 cas avec ces associations (annexe 2 toutes les souches sauf DEM).

DISCUSSION

Ce travail a évalué la capacité du cytomètre d'analyse d'urine UF-1000i® à être détourné de son usage premier pour effectuer des courbes de bactéricidie. Nous avons constaté que l'appareil est tout à fait adapté pour dénombrer les bactéries dont la concentration se situe entre 10^3 UFC.mL⁻¹ et 10^8 UFC.mL⁻¹. Nous avons simplement observé dans notre étude une sous estimation de l'UF-1000i® de l'ordre de $0,239 \log_{10}$ UFC.mL⁻¹ en moyenne comparé au dénombrement en milieu gélosé. L'incapacité à dénombrer les bactéries en dessous du seuil de 10^3 UFC.mL⁻¹ est en partie due au fait que la chambre réactionnelle dans laquelle se passe la perméabilisation et le marquage des bactéries par le fluorochrome est de l'ordre du microlitre. Ce seuil est tout à fait adapté à la fonction de l'appareil qui est de détecter les bactéries potentiellement responsables d'infection urinaire. Ainsi, partant de 10^6 UFC.mL⁻¹ comme inoculum de départ, il n'est possible avec cet appareil que de détecter des diminutions de maximum $3 \log_{10}$ UFC.mL⁻¹. L'ajout d'antibiotiques ne change rien à ces capacités. En outre, les fluorochromes (les polyméthines) utilisés dans cet appareillage ne sont pas des marqueurs de viabilité mais simplement des marqueurs d'acides nucléiques. Ainsi l'UF-1000i® ne peut différencier les bactéries viables des non viables. Il peut seulement distinguer les bactéries ayant conservées leur intégrité membranaire et/ou nucléaire de celles l'ayant perdu. Ces 2 limites pourraient expliquer qu'il sous-estime le pouvoir bactéricide réel des antibiotiques et ne peut en aucun cas être considéré comme un équivalent de la méthode de référence. En revanche, l'UF-1000i® met bien en évidence les phases de latence, de repousse et de bactériostase.

Cependant, l'étude de l'action d'associations d'antibiotiques sur des souches multi-résistantes peut quand même trouver ici un intérêt. Il est rare de diminuer l'inoculum de plus de 3 log même en associant des antibiotiques chez ces bactéries hautement résistantes et les phases de repousse ou d'antagonisme sont des données importantes à connaître lorsqu'une association est choisie. De plus, le clinicien va quand même traiter ces bactéries si elles sont infectantes et la seule information qu'il existe ou pas une diminution même si elle est légère avec telle ou telle association peut constituer une avancée. Sur cette partie du travail, les résultats de l'étude d'associations d'antibiotiques effectuée avec l'UF1000i sont plus encourageants.

Nous avons pu ainsi confirmer les résultats de la littérature. Parmi les associations testées, nous avons par exemple observé une synergie de l'association entre colistine et la rifampicine ou l'imipénème, comme l'a décrit Landman et al (9). De même, nous avons également observé l'inefficacité de certaines associations décrites comme telle dans la littérature (51). Comme le montre Oie et al. dans ses travaux publiés en 2003, l'association de la ceftazidime avec l'aztréonam peut être suivie d'une recroissance bactérienne que nous observons dans 5 cas sur 10 dans notre population (51) et, l'ajout de la ciprofloxacine à cette association n'améliore pas la bactéricidie contrairement à celle de l'amikacine (51); résultats que nous trouvons dans 8 cas sur 10 dans notre population. Enfin, dans un seul cas sur 10 l'association ceftazidime, aztréonam et amikacine est bactéricide ; Oie et al. l'observent dans 2 cas sur 7 (51). Nous avons également mis en évidence que des associations classiquement décrites pour être efficaces ne l'étaient pas sur certaines souches. Ces résultats pointent l'intérêt de personnaliser l'étude des associations à la souche isolée du patient.

Sur le plan pratique, le temps de réponse est de quelques secondes après incubation au lieu de 24 à 48 heures plus tard pour la technique de référence. De même l'ensemencement des dilutions sériées est beaucoup plus fastidieux et limite le nombre d'associations testées. Avec l'UF-1000i®, nous avons pu tester dans le même temps opératoire un grand nombre d'associations sans avoir une surcharge de travail trop importante. Ceci nous a permis de trouver plusieurs associations d'efficacité équivalente et des alternatives potentielles. En effet, les patients concernés par ses infections souffrent également d'insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque rendant la prescription de certain antibiotique délicat. En outre, nous avons constaté que, dans un bon nombre de cas, l'efficacité de l'association est déjà perceptible dès la 3^{ème} heure, se confirmant définitivement à la 24^{ème}. Il est ainsi possible de détecter rapidement les associations potentiellement inefficaces.

La principale limite de l'UF-1000i® est sa difficulté à différencier l'efficacité des associations additives entre elles lorsqu'elles réduisent l'inoculum autour de 10^3 UFC.ml⁻¹. Le cas de la colistine est tout à fait intéressant. Selon nos résultats, un bon nombre d'associations sont équivalentes à l'effet de la colistine mise en contact isolément avec *P. aeruginosa*. Cependant, lorsque la CMI de la colistine s'élève, notre technique arrive à mettre en évidence un effet synergique dès la 12^{ème} heures

jusqu'à la 24^{ème} de l'association de la colistine à d'autres molécules antibiotiques. Cette synergie est visible du fait d'une repousse de la bactérie sous colistine à partir de la 12^{ème} heure. Cette observation pointe le handicap de l'UF-1000i® lorsque la concentration bactérienne se situe aux alentours de 10^3 UFC.ml⁻¹ elle ne peut différencier quelle association est la meilleure et ne peut démasquer si l'association à une efficacité au delà d'une réduction de 10^3 UFC.ml⁻¹ de l'inoculum de départ. Pour finir, une contamination par une bactérie de l'environnement ou de la flore commensale du manipulateur ne peut être perçue par le cytomètre qui énumèrera toutes les bactéries en solution que ce soit *P. aeruginosa* ou une autre espèce bactérienne.

Au delà de l'UF-1000i®, notre travail démontre l'intérêt d'utiliser la cytométrie de flux pour effectuer des courbes de bactéricidie. Quelques études ont utilisé la cytométrie afin d'étudier le comportement individuel de la cellule bactérienne (54, 56) mais très peu pour étudier l'évolution d'un inoculum mis en contact avec des antibiotiques (10). Il existe des marqueurs de viabilité bactérienne qui permettent la quantification de la division cellulaire, de l'activité enzymatique ou métabolique (31) permettant de résoudre le problème rencontré avec l'UF-1000i® sur son incapacité à distinguer les bactéries intègres des autres.

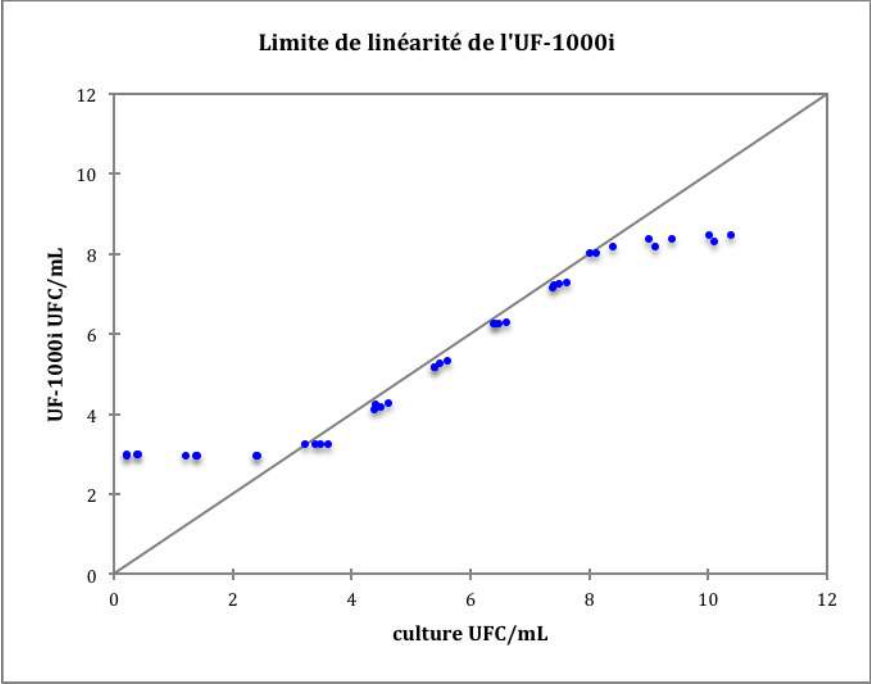
Ce travail questionne enfin l'utilité d'étudier des associations d'antibiotiques en pratique clinique courante de laboratoire d'analyse. Il est vrai que chaque souche peut exprimer une susceptibilité différente à des associations antibiotiques selon le mécanisme de résistance hébergé par la bactérie. De plus, l'étude de l'activité des antibiotiques seuls ou associés en cinétique de bactéricidie permet une approche dynamique de leur efficacité en fonction du temps. Nous avons vu dans l'introduction les raisons expliquant les informations différentes tirées de l'action d'antibiotique lorsque celles-ci sont cultivées en milieu liquide. Néanmoins, à la différence de la CMI, peu d'études cliniques ont évalué si la prescription d'associations d'antibiotiques trouvés efficaces *in vitro* sur des souches multi-résistantes l'étaient également *in vivo*. Les patients testés dans ce travail ont été traités durant leur hospitalisation par des associations d'antibiotiques calqués sur des schémas décrits dans la littérature. Ce travail se poursuit donc aujourd'hui par l'étude complète des dossiers cliniques de ces patients avec évaluation de l'effet de ces associations sur

la résolution clinique de l'infection et comparaison aux courbes de bactéricidie effectuées avec l'UF-1000i®.

ANNEXES

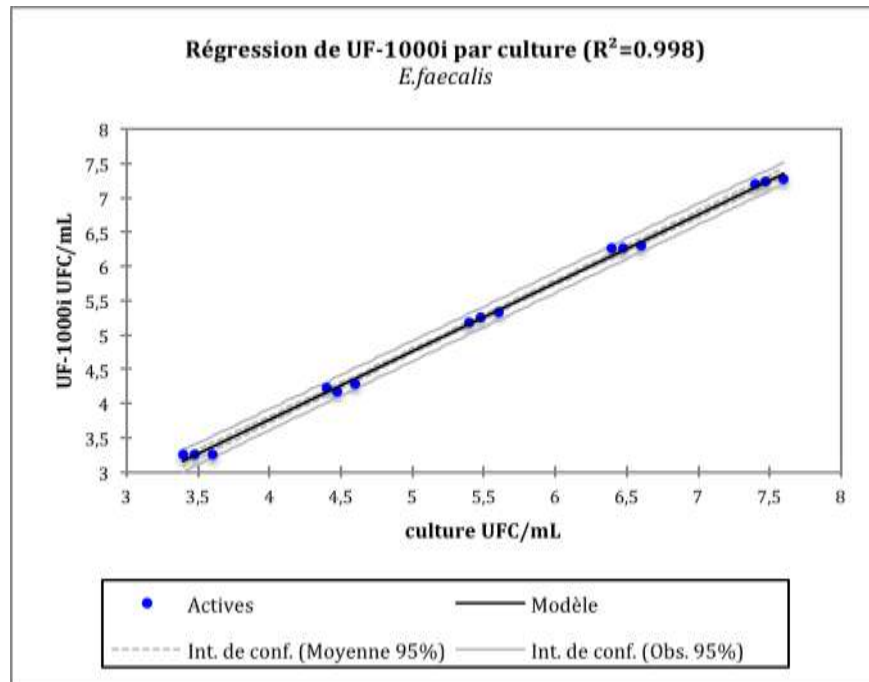
ANNEXE 1

Graphique 1

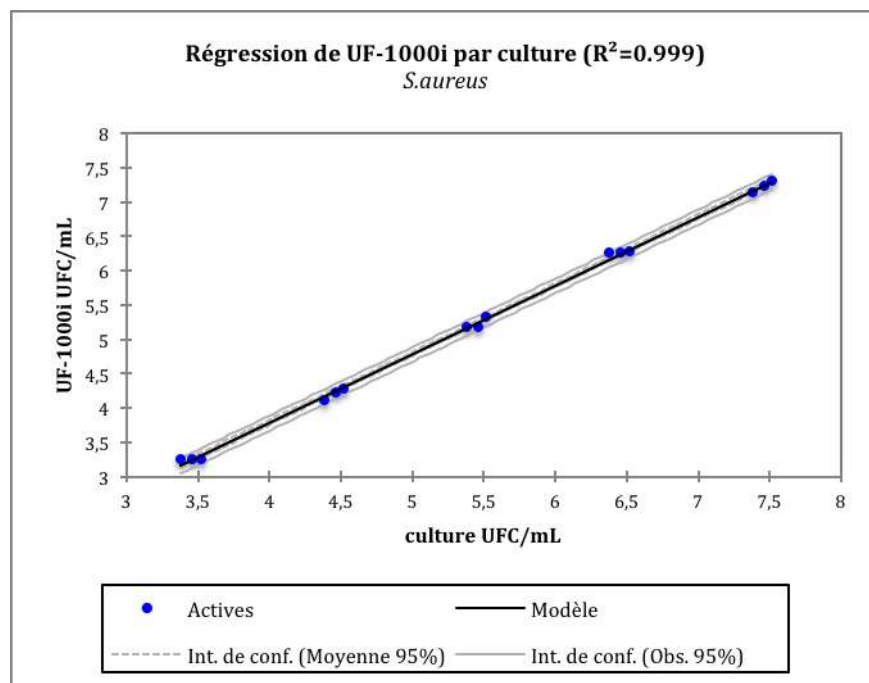


ANNEXE 1

Graphique 2

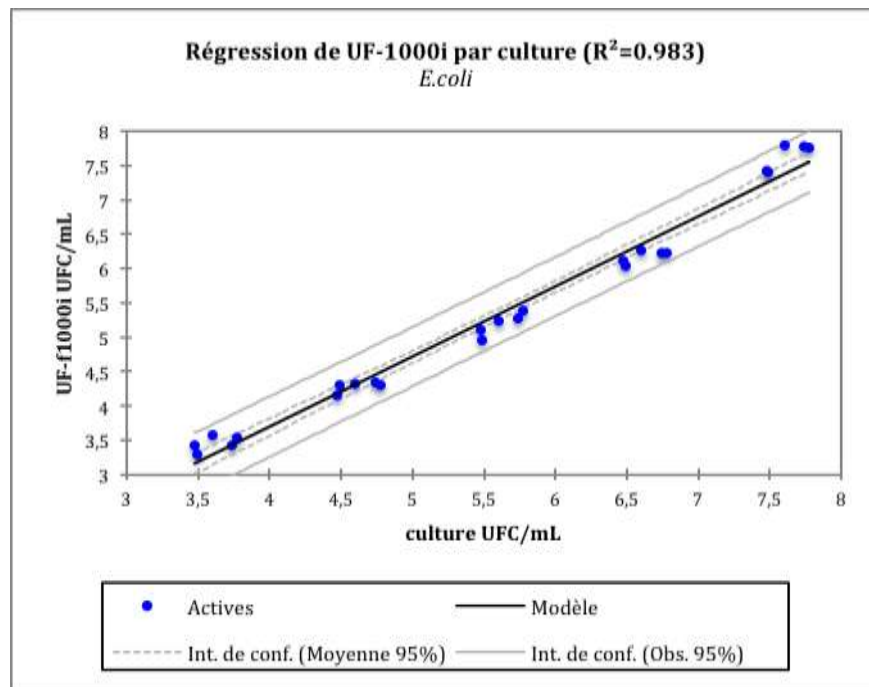


Graphique 3

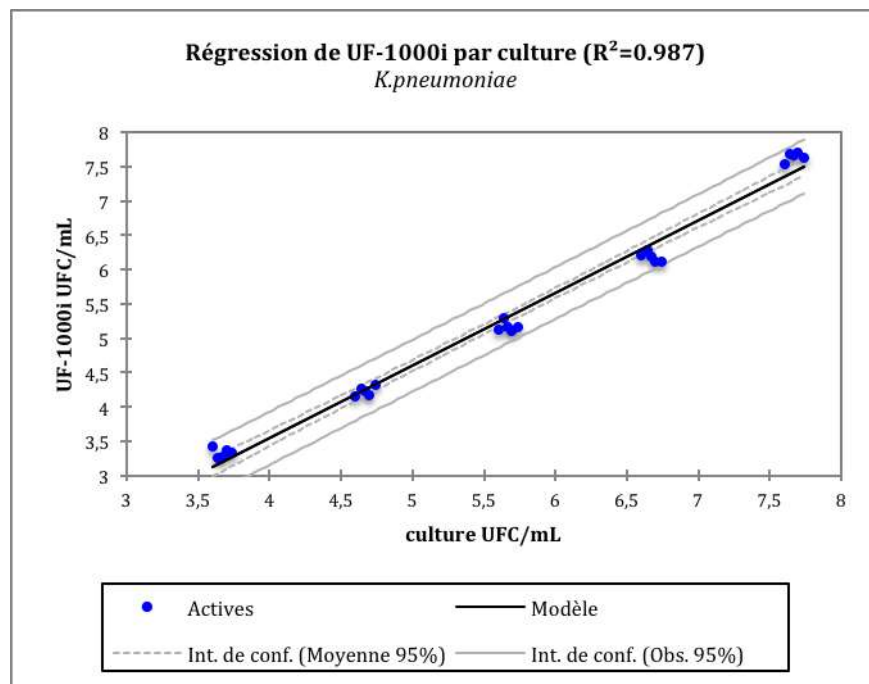


ANNEXE 1

Graphique 4

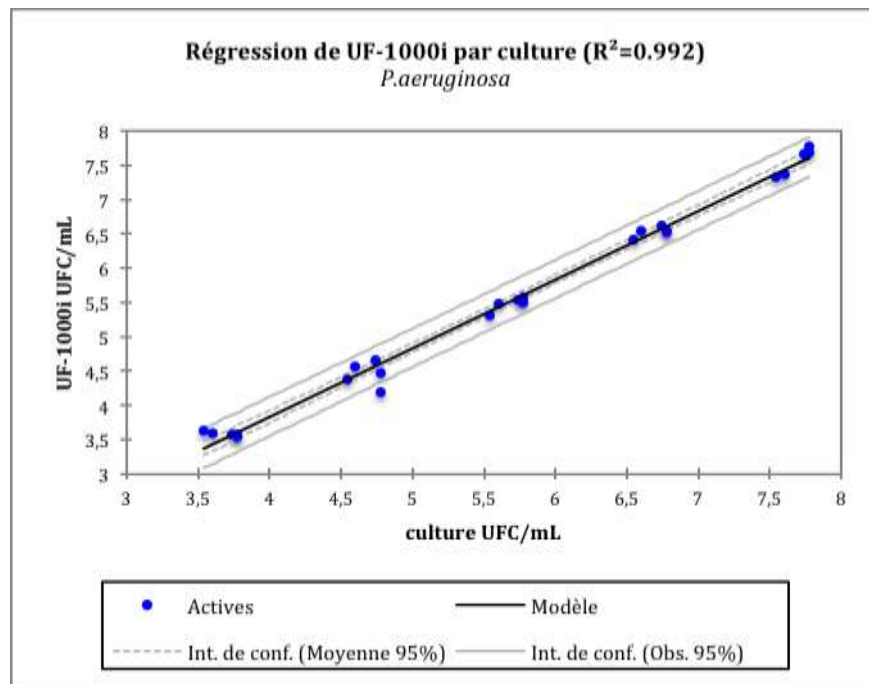


Graphique 5



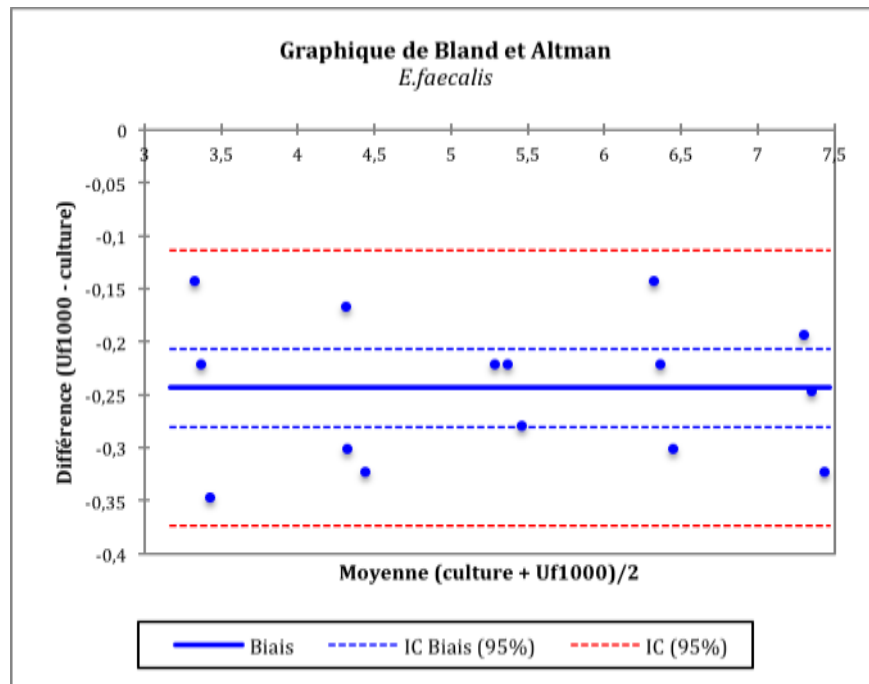
ANNEXE 1

Graphique 6

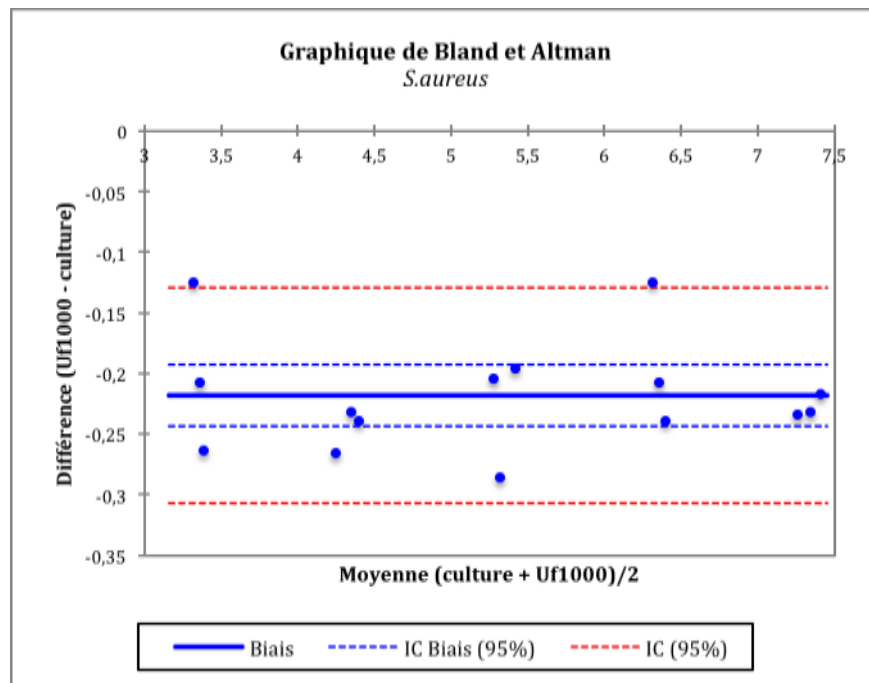


ANNEXE 1

Graphique 7

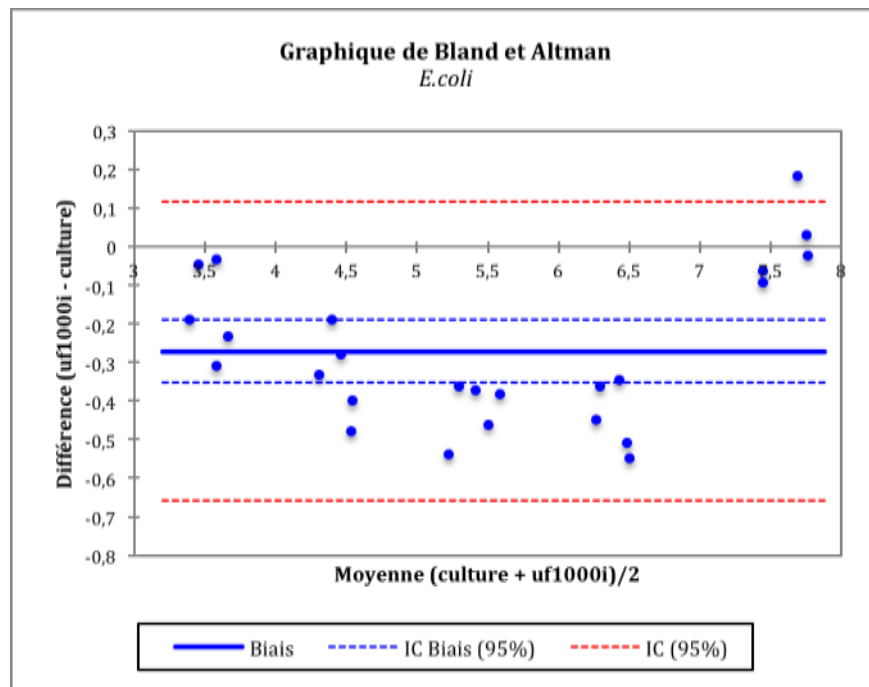


Graphique 8

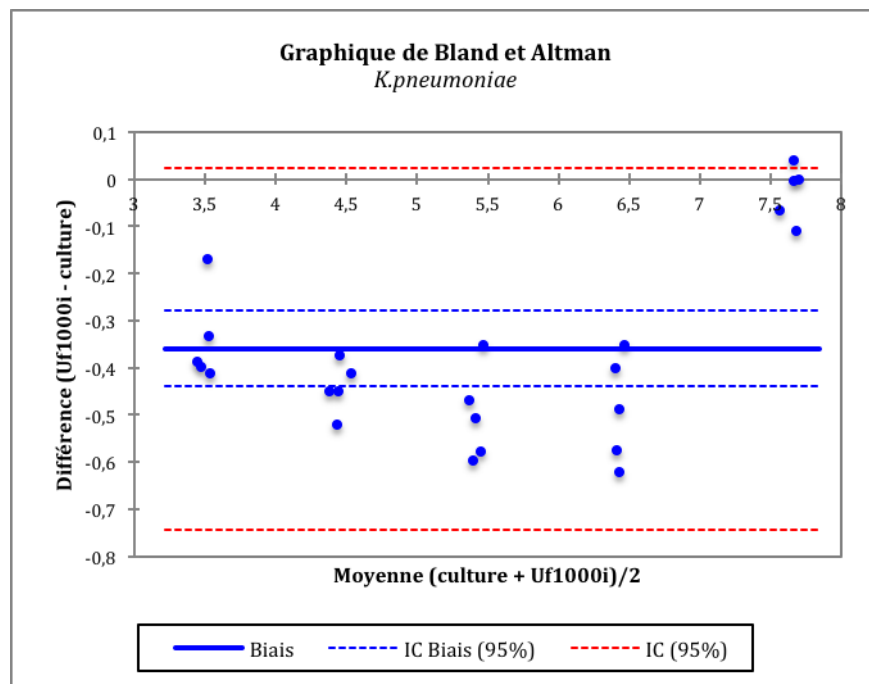


ANNEXE 1

Graphique 9

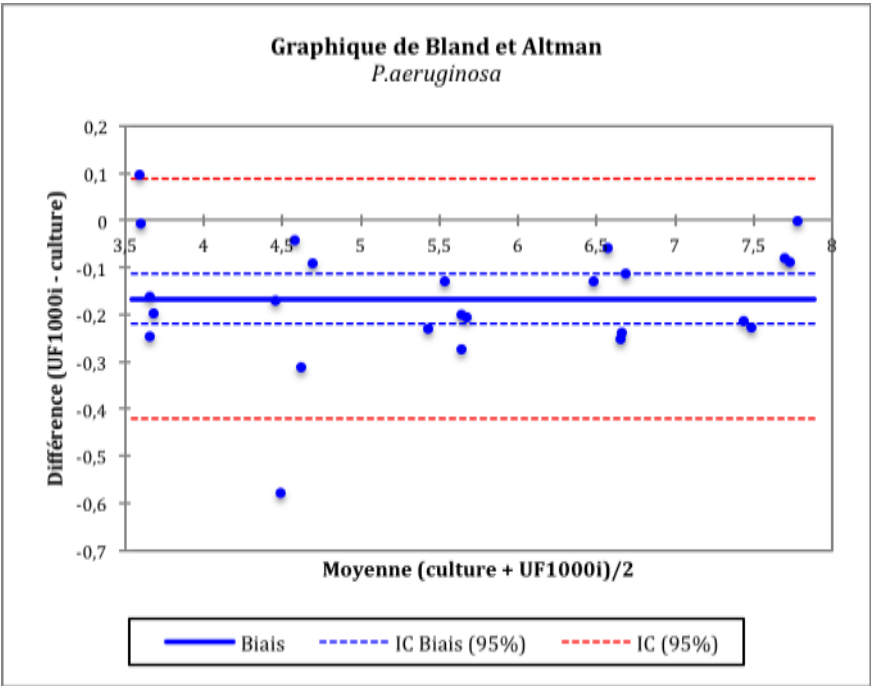


Graphique 10



ANNEXE 1

Graphique 11



ANNEXE 2 : Fiche patient 1

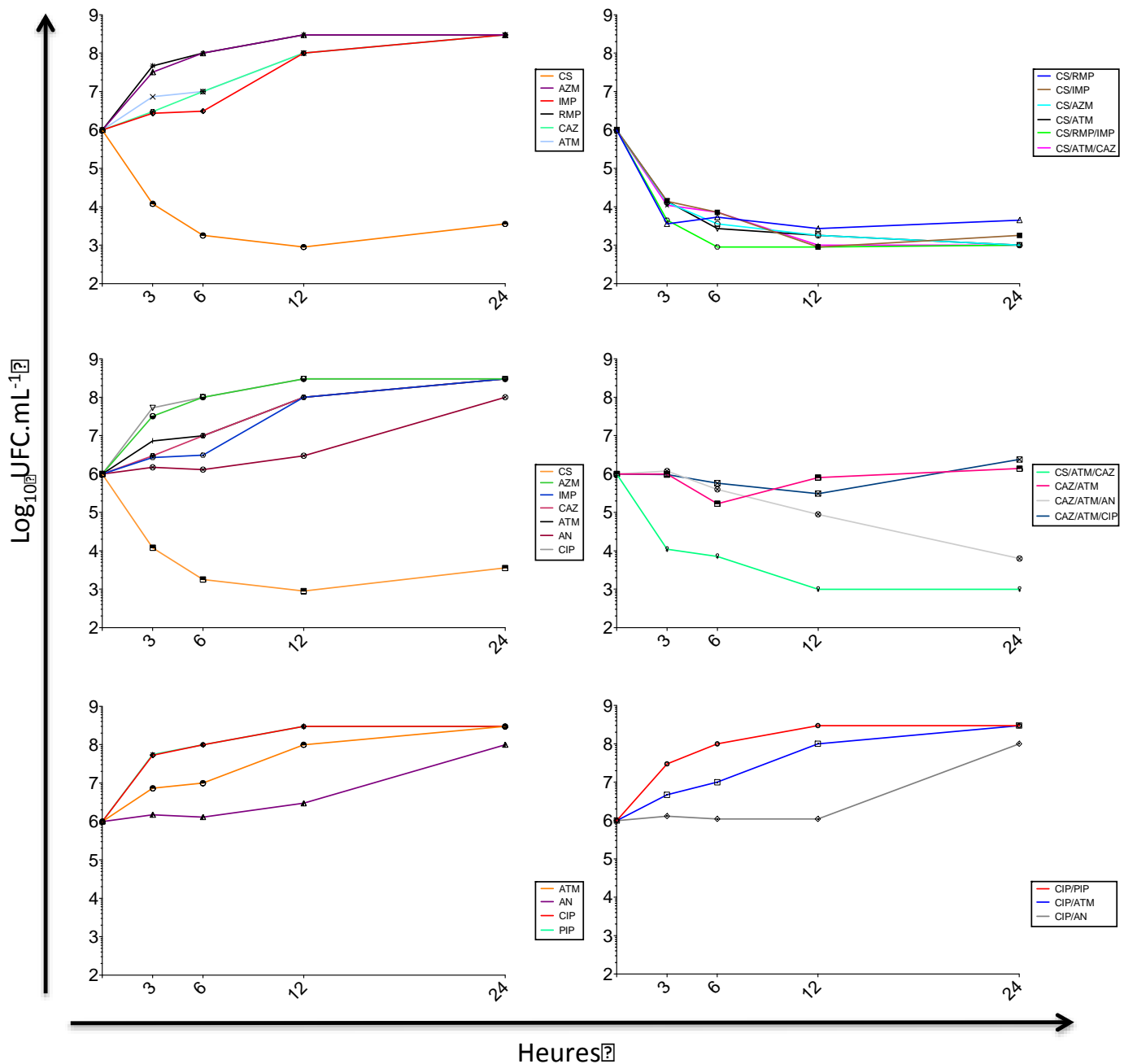
Patient PAR : *P. aeruginosa* isolé sur une hémoculture

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcilline	R	>=128	Aztréonam	R	16
Ticarcilline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	>=16
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	R	>=64
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	16	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	32	Colistine	S	1*
Imipénème	I	8			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 2

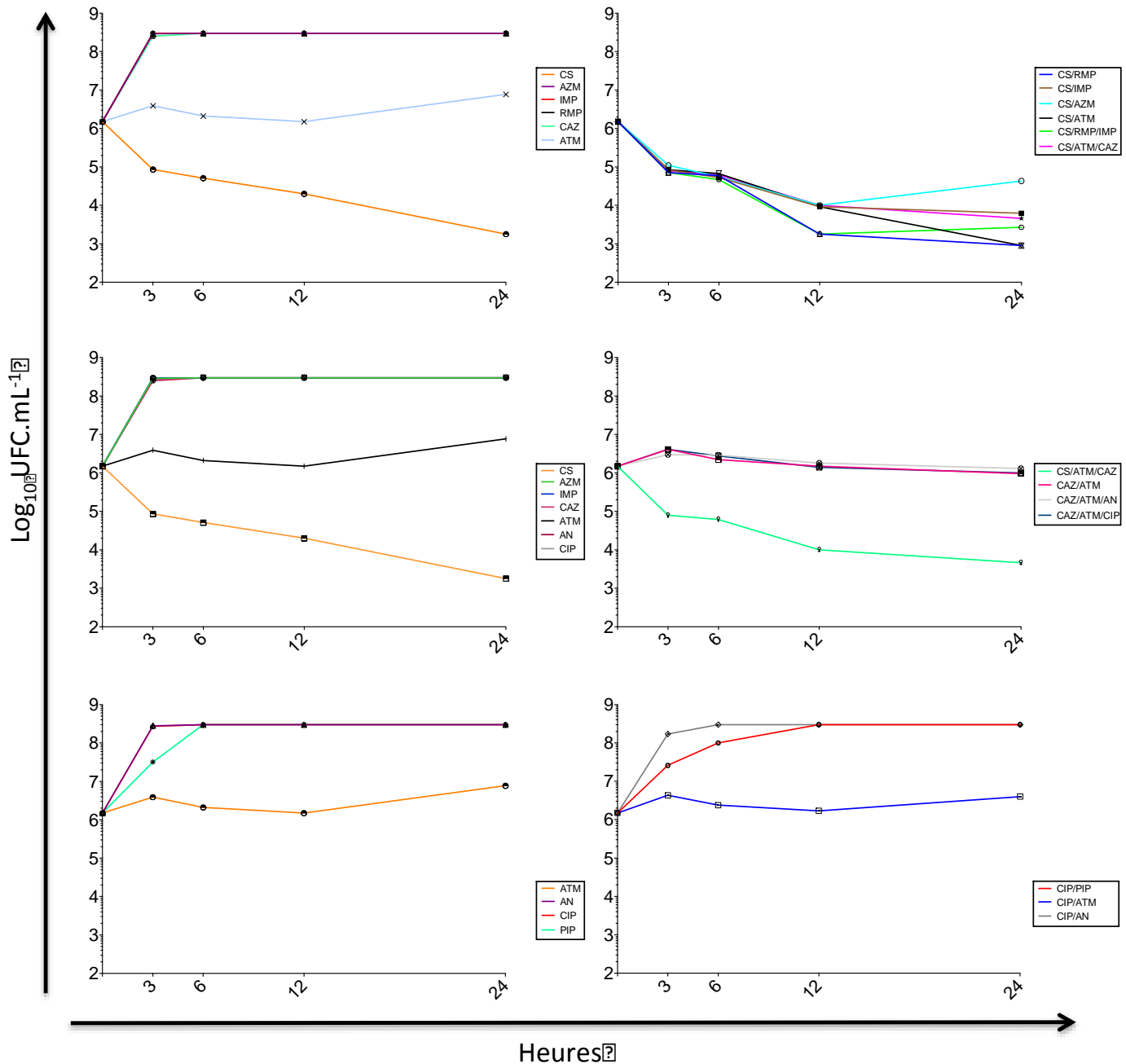
Patient LEF : *P. aeruginosa* isolé sur un liquide de drain

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcilline	R	>=128	Aztréonam	I	4
Ticarcilline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	>=16
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	R	>=64
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	>=64	Colistine	S	1,5*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 3

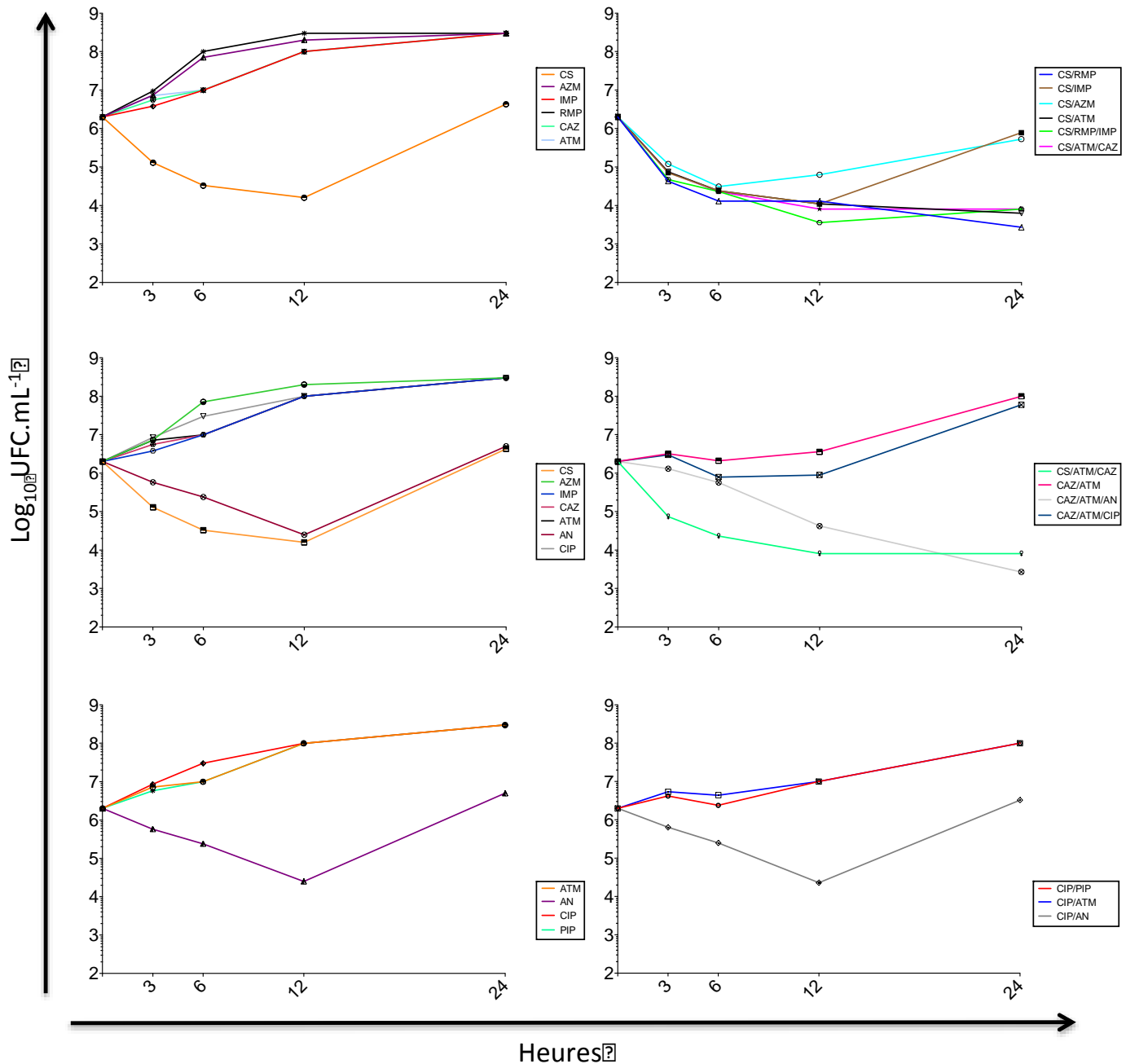
Patient STA : *P. aeruginosa* isolé sur un cathéter

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcilline	R	>=128	Aztréonam	R	32
Ticarcilline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	>=16
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	R	32
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	>=64	Colistine	S	1*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 4

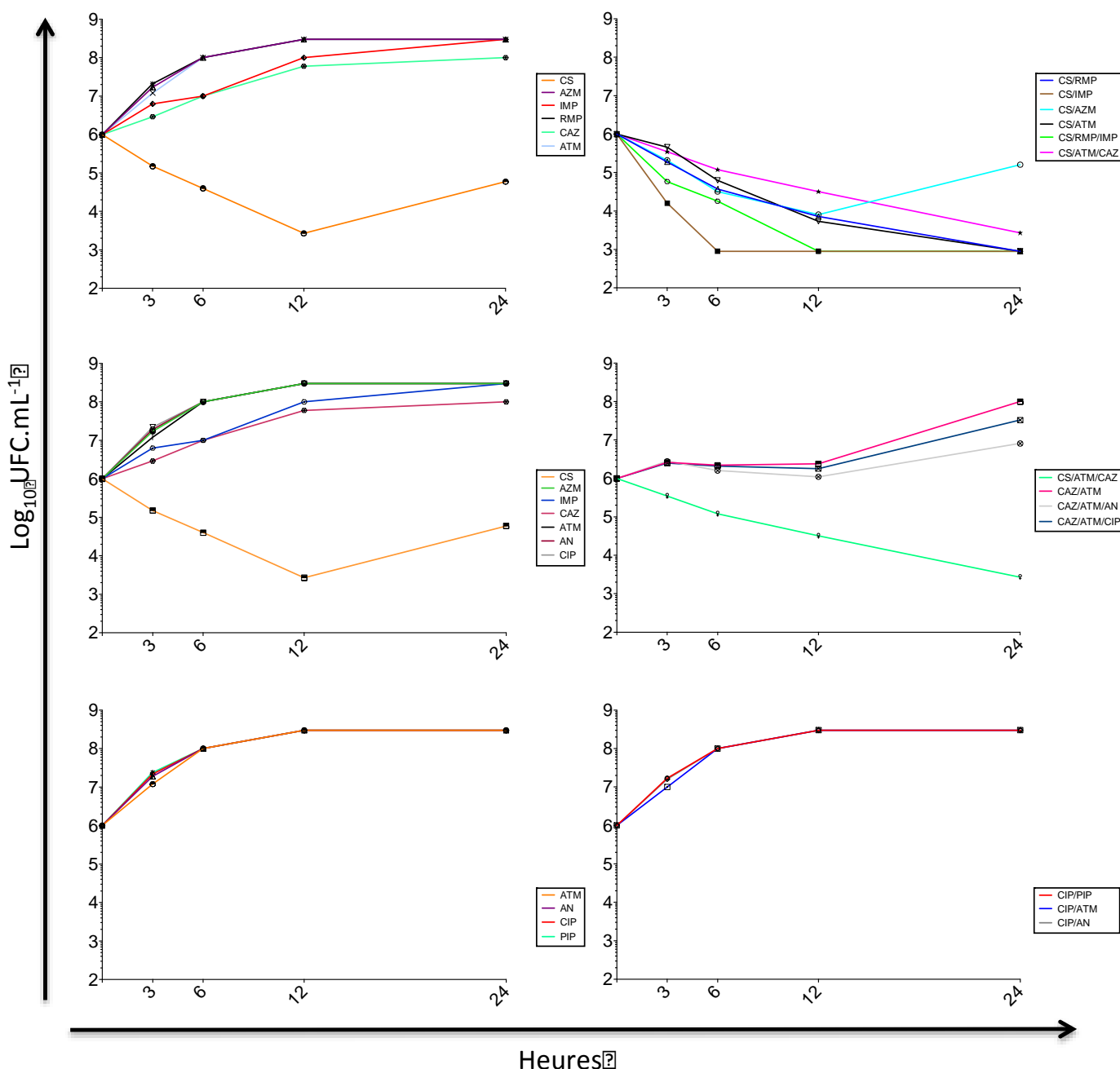
Patient BUR : *P. aeruginosa* isolé sur un prélèvement urinaire

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcline	R	>=128	Aztréonam	R	32
Ticarcline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	8
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	R	>=64
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	16	Colistine	S	2*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 5

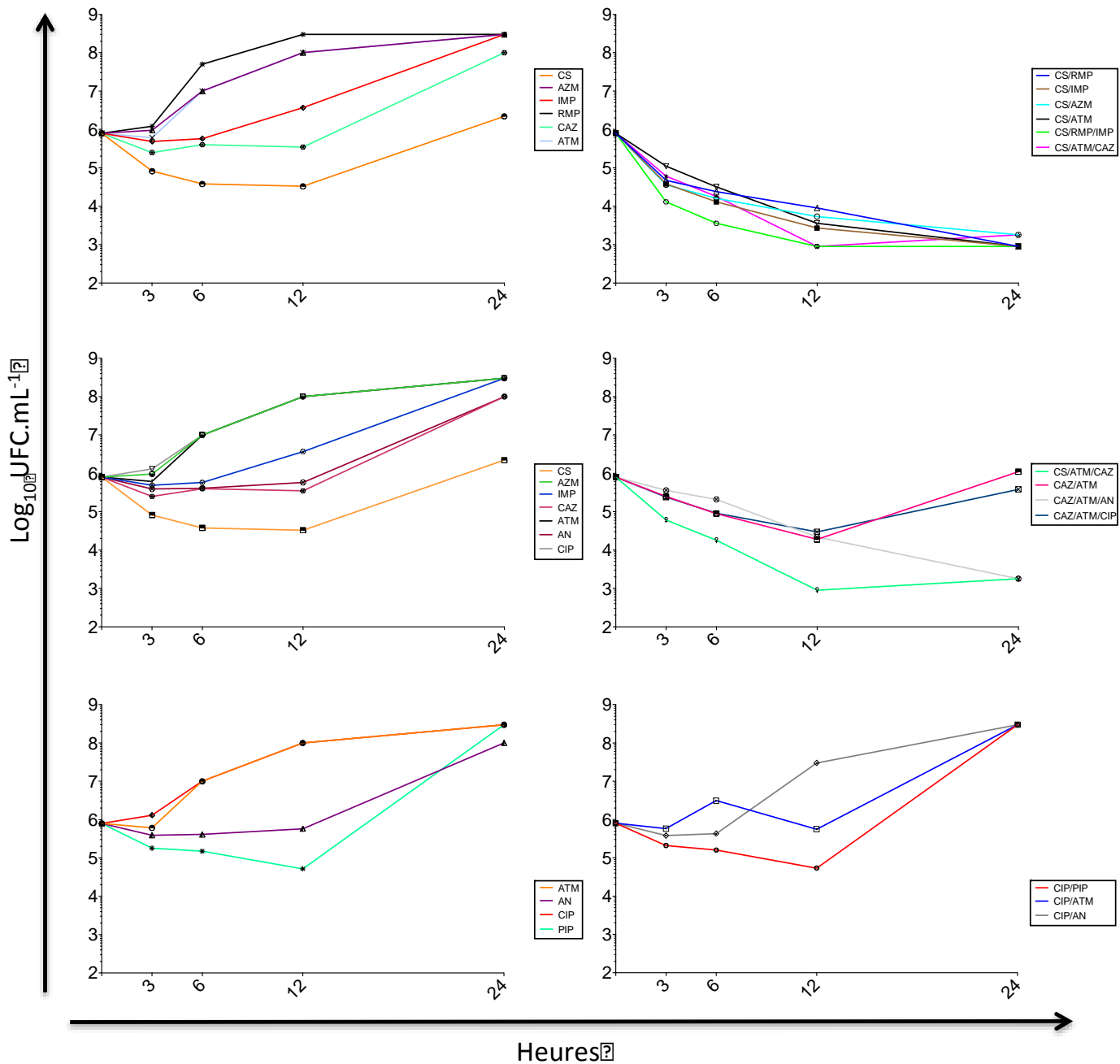
Patient LAB : *P. aeruginosa* isolé sur un prélèvement urinaire

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcline	R	>=128	Aztréonam	R	32
Ticarcline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	8
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	S	<=2
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	16	Colistine	S	2*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



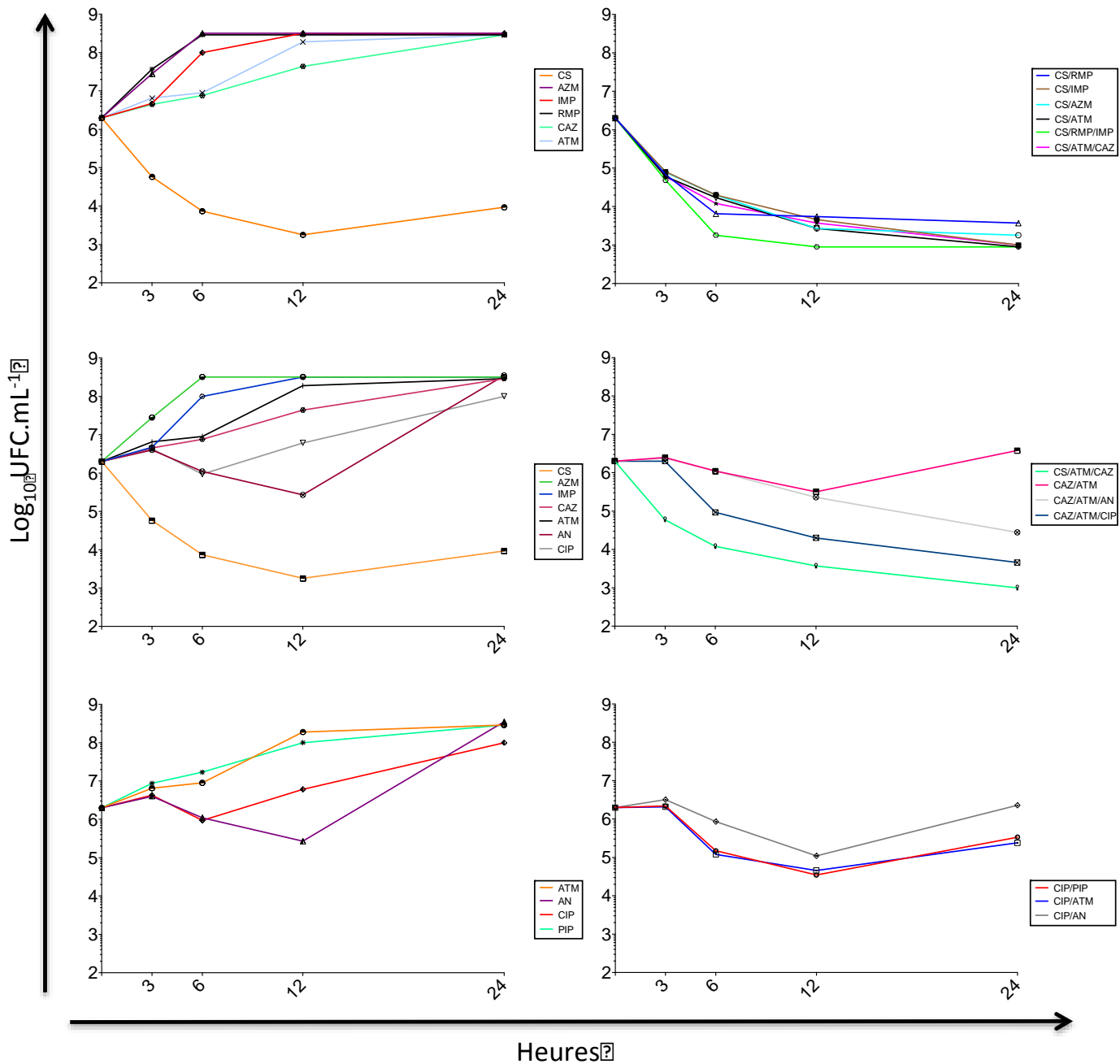
Patient DEM : *P. aeruginosa* isolé sur un prélèvement trachéal

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcline	R	>=128	Aztréonam	I	16
Ticarcline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	S	2
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	I	16
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	16	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	16	Colistine	S	2*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 7

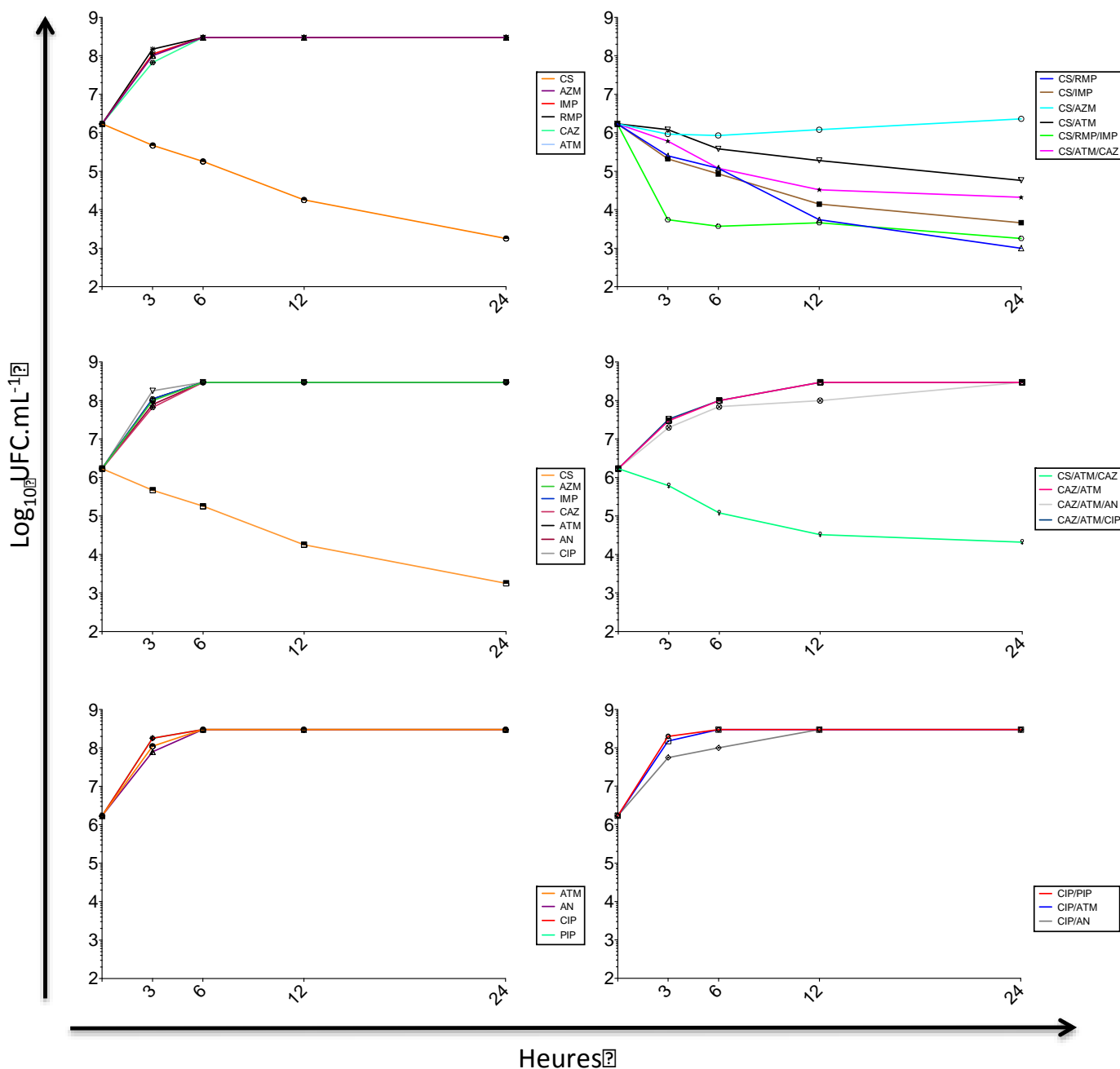
Patient DIB : *P. aeruginosa* isolé sur un prélèvement anal

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcline	R	>=128	Aztréonam	R	>=64
Ticarcline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	>=16
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	R	>=64
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	>=64	Colistine	S	2*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 8

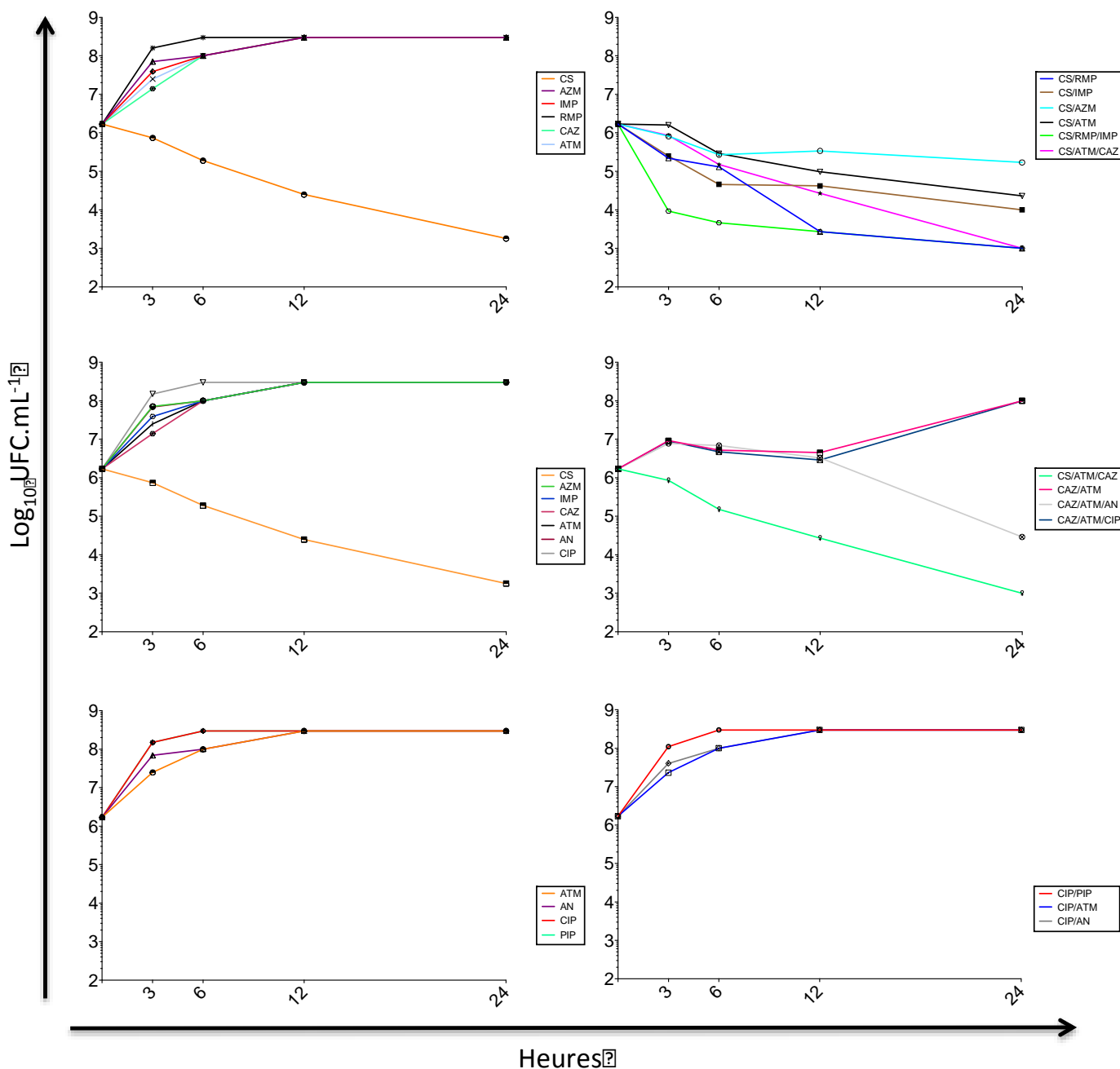
Patient DEL : *P. aeruginosa* isolé sur un prélèvement trachéal

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcilline	R	>=128	Aztréonam	R	32
Ticarcilline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	>=16
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	R	>=64
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	>=64	Colistine	S	2*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 9

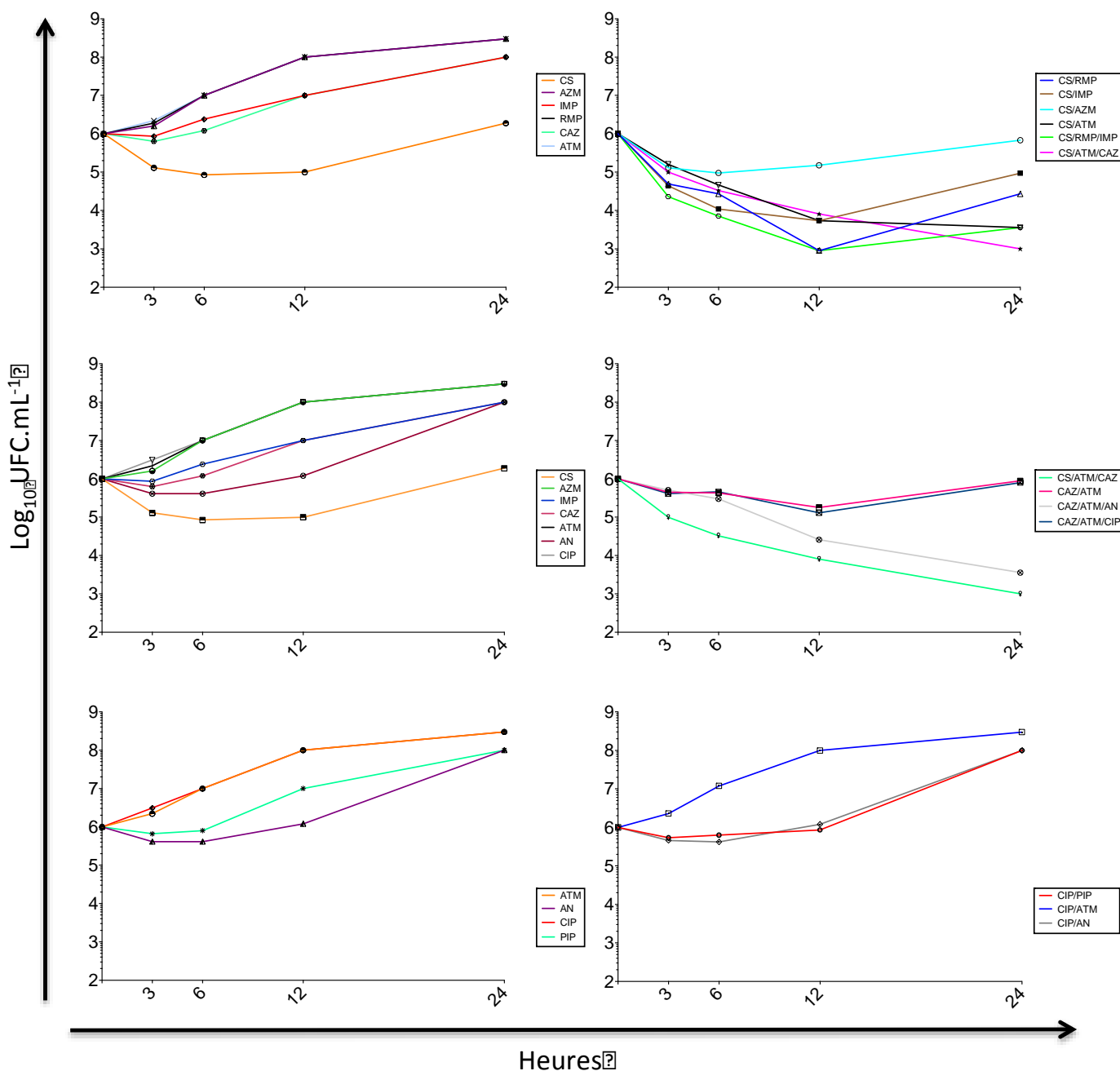
Patient BOD : *P. aeruginosa* isolé sur une d'hémoculture

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcline	R	>=128	Aztréonam	R	64
Ticarcline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	R	>=16
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	S	4
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	>=16
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	R	>=4
Céfépime	R	32	Colistine	I	3*
Imipénème	I	8			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



ANNEXE 2 : Fiche patient 10

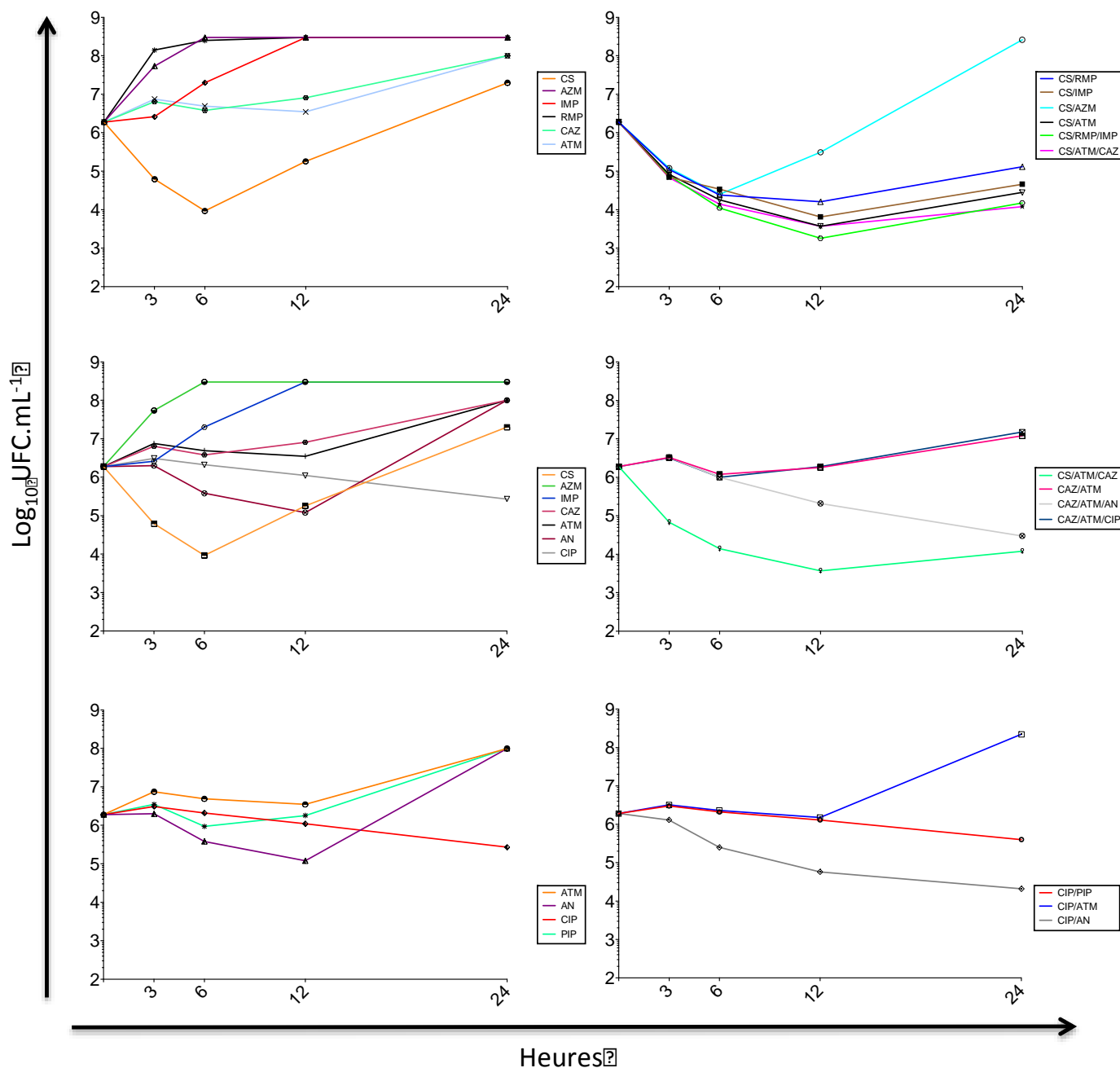
Patient CHE : *P. aeruginosa* isolé sur un prélèvement trachéal

Antibiogramme rendu par l'automate Vitek2

Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI	Antibiotiques	Résultats	Valeurs CMI
Ticarcline	R	>=128	Aztréonam	R	>=64
Ticarcline/Acide clavulanique	R	>=128	Tobramycine	S	<=1
Pipéracilline	R	>=128	Amikacine	I	16
Pipéracilline/Tazocilline	R	>=128	Gentamicine	R	8
Ceftazidime	R	>=64	Ciprofloxacine	S	<=0,25
Céfépime	R	>=64	Colistine	I	3*
Imipénème	R	>=16			

*Valeur rendue avec E-test®

Résultats des associations d'antibiotiques rendus par l'UF-1000i



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aeschlimann, J. R., and M. J. Rybak.** 1998. Pharmacodynamic analysis of the activity of quinupristin-dalfopristin against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with differing MBCs via time-kill-curve and postantibiotic effect methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2188-2192.
2. **Allaouchiche, B., and E. Boselli.** Comment améliorer l'administration des antibiotiques au cours du choc septique?
3. **Aubert, G., and A. Carricajo.** 2004. [Monitoring of antibiotic treatment of patient with a severe bacterial infection]. *Ann Fr Anesth Reanim* **23**:704-713.
4. **Blaser, J., and C. König.** 1995. Once-daily dosing of aminoglycosides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:1029-1038.
5. **Blaser, J., B. B. Stone, M. C. Groner, and S. H. Zinner.** 1987. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:1054-1060.
6. **Blondeau, J. M., G. Hansen, K. Metzler, and P. Hedlin.** 2004. The role of PK/PD parameters to avoid selection and increase of resistance: mutant prevention concentration. *J Chemother* **16 Suppl 3**:1-19.
7. **Boselli, E., D. Breilh, M. Cannesson, F. Xuereb, T. Rimmelé, D. Chassard, M.-C. Saux, and B. Allaouchiche.** 2004. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of piperacillin/tazobactam 4 g/0.5 g administered to critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med* **30**:976-979.
8. **Boselli, E., D. Breilh, M.-C. Saux, J.-B. Gordien, and B. Allaouchiche.** 2006. Pharmacokinetics and lung concentrations of ertapenem in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* **32**:2059-2062.
9. **Bratu, S., P. Tolaney, U. Karumudi, J. Quale, M. Mooty, S. Nichani, and D. Landman.** 2005. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:128-132.
10. **Broeren, M. A., Y. Maas, E. Retera, and N. L. Arents.** 2012. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*
11. **Courvalin, P., and R. Leclercq.** 2006. *Antibiogramme.* Editions Eska.
12. **Craig, W. A.** 1996. Antimicrobial resistance issues of the future. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:213-217.

13. **Craig, W. A.** 2003. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **17**:479-501.
14. **Craig, W. A.** 1998. Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamics. *Ear Nose Throat J* **77**:7-11; discussion 11-12.
15. **Craig, W. A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1-10; quiz 11-12.
16. **Craig, W. A., and D. Andes.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**:255-259.
17. **Craig, W. A., and S. C. Ebert.** 1990. Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. *Scand J Infect Dis Suppl* **74**:63-70.
18. **Craig, W. A., J. Redington, and S. C. Ebert.** 1991. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **27 Suppl C**:29-40.
19. **Derendorf, H., and B. Meibohm.** 1999. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. *Pharm. Res.* **16**:176-185.
20. **DiPiro, J. T., C. E. Edmiston, Jr., and J. M. Bohnen.** 1996. Pharmacodynamics of antimicrobial therapy in surgery. *Am. J. Surg.* **171**:615-622.
21. **Drlica, K.** 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:11-17.
22. **Drusano, G. L.** 2004. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:289-300.
23. **Eagle, H., and A. D. Musselman.** 1949. The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Bacteriol.* **58**:475-490.
24. **Firsov, A. A., V. M. Chernykh, and S. M. Navashin.** 1990. Quantitative analysis of antimicrobial effect kinetics in an in vitro dynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1312-1317.
25. **Firsov, A. A., S. N. Vostrov, A. A. Shevchenko, and G. Cornaglia.** 1997. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an in vitro dynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1281-1287.
26. **Forrest, A., D. E. Nix, C. H. Ballow, T. F. Goss, M. C. Birmingham, and J. J. Schentag.** 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1073-1081.
27. **Fuentes, F., M. M. Martín, J. Izquierdo, M. L. Gomez-Lus, and J. Prieto.** 1996. Pharmacodynamic effects of ciprofloxacin, fleroxacin and lomefloxacin in vivo and in vitro. *Chemotherapy* **42**:354-362.

28. **Gengo, F. M., T. W. Mannion, C. H. Nightingale, and J. J. Schentag.** 1984. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of methicillin in curative treatment of experimental endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* **14**:619-631.
29. **Gillespie, E. L., J. L. Kuti, and D. P. Nicolau.** 2005. Pharmacodynamics of antimicrobials: treatment optimisation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**:351-361.
30. **Gonçalves-Pereira, J., and P. Póvoa.** 2011. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of β -lactams. *Crit Care* **15**.
31. **Hewitt, C. J., G. Nebe-Von Caron, A. W. Nienow, and C. M. McFarlane.** 1999. The use of multi-parameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *Journal of Biotechnology* **75**:251-264.
32. **Hoffman, A., and D. Stepensky.** 1999. Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **16**:571-639.
33. **Hyatt, J. M., D. E. Nix, and J. J. Schentag.** 1994. Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2730-2737.
34. **Joukhadar, C., M. Frossard, B. X. Mayer, M. Brunner, N. Klein, P. Siostrzonek, H. G. Eichler, and M. Müller.** 2001. Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* **29**:385-391.
35. **Li, R. C.** 2000. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**:229-235.
36. **Lorian, V.** 1977. [Subinhibitory concentrations of antibiotics. Effects on morphology and growth (author's transl)]. *Pathol. Biol.* **25**:291-298.
37. **Lorian, V., and B. Atkinson.** 1975. Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am. J. Clin. Pathol.* **64**:678-688.
38. **Marik, P. E.** 1993. Aminoglycoside volume of distribution and illness severity in critically ill septic patients. *Anaesth Intensive Care* **21**:172-173.
39. **McDonald, P. J., W. A. Craig, and C. M. Kunin.** 1977. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* **135**:217-223.
40. **McDonald, P. J., B. L. Wetherall, and H. Pruul.** 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* **3**:38-44.

41. **Meibohm, B., and H. Derendorf.** 1997. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int J Clin Pharmacol Ther* **35**:401-413.
42. **Métézeau, P., R. Migliarina, and M.-H. Ratinaud.** 1994. La cytométrie en flux : guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules.
43. **Moore, R. D., P. S. Lietman, and C. R. Smith.** 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J. Infect. Dis.* **155**:93-99.
44. **Mouton, J. W., P. G. Ambrose, R. Canton, G. L. Drusano, S. Harbarth, A. MacGowan, U. Theuretzbacher, and J. Turnidge.** 2011. Conserving antibiotics for the future: new ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Drug Resist. Updat.* **14**:107-117.
45. **Mouton, J. W., M. N. Dudley, O. Cars, H. Derendorf, and G. L. Drusano.** 2005. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:601-607.
46. **Mueller, M., A. de la Peña, and H. Derendorf.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:369-377.
47. **Nightingale, C.** 1980. Pharmacokinetics of the oral cephalosporins in adults. *J. Int. Med. Res.* **8**:2-8.
48. **Nolting, A., T. Dalla Costa, K. H. Rand, and H. Derendorf.** 1996. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin in vitro. *Pharm. Res.* **13**:91-96.
49. **Odenholt-Tornqvist, I., E. Löwdin, and O. Cars.** 1992. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1852-1858.
50. **Oie, S., Y. Fukui, M. Yamamoto, Y. Masuda, and A. Kamiya.** 2009. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect. Dis.* **9**.
51. **Oie, S., T. Uematsu, A. Sawa, H. Mizuno, M. Tomita, S. Ishida, Y. Okano, and A. Kamiya.** 2003. In vitro effects of combinations of antipseudomonal agents against seven strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:911-914.
52. **Scaglione, F., J. W. Mouton, R. Mattina, and F. Fraschini.** 2003. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin in a murine pneumonia model: peak concentration/MIC versus area under the curve/MIC ratios. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2749-2755.
53. **Sinnollareddy, M. G., M. S. Roberts, J. Lipman, and J. A. Roberts.** 2012. β -Lactam pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients and

strategies for dose optimization: a structured review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39**:489-496.

54. **Steen, H. B., E. Boye, K. Skarstad, B. Bloom, T. Godal, and S. Mustafa.** 1982. Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry* **2**:249-257.
55. **Stratton, C. W., M. P. Weinstein, and L. B. Reller.** 1982. Correlation of serum bactericidal activity with antimicrobial agent level and minimal bactericidal concentration. *J. Infect. Dis.* **145**:160-168.
56. **Troussellier, M., C. Courties, P. Lebaron, and P. Servais.** 1999. Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiology Ecology* **29**:319-330.
57. **Turnidge, J. D.** 1998. The pharmacodynamics of β -lactams. *Clinical infectious diseases* **27**:10-22.
58. **Van Bambeke, F., D. Tyteca, Y. Ouadhiri, and P. M. Tulkens.** 1999. Optimisation des traitements antibactériens sur base des propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *Louvain Med* **118**.
59. **Vogelman, B., and W. A. Craig.** 1986. Kinetics of antimicrobial activity. *J. Pediatr.* **108**:835-840.
60. **Zhanel, G. G., and W. A. Craig.** 1994. Pharmacokinetic contributions to postantibiotic effects. Focus on aminoglycosides. *Clin Pharmacokinet* **27**:377-392.
61. **Zhi, J. G., C. H. Nightingale, and R. Quintiliani.** 1988. Microbial pharmacodynamics of piperacillin in neutropenic mice of systematic infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pharmacokinet Biopharm* **16**:355-375.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2011/2012

Nom : BELMILOUDI
Prénom : SOUFIE

Titre du mémoire / thèse : Evaluation du potentiel de l'UF-1000i® à mesurer l'action antibactérienne des antibiotiques en milieu liquide. Application à des isolats cliniques multi-résistants de *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots-clés : Relation pharmacocinétique-pharmacodynamie, courbes de bactéricidie, cytofluorométrie, UF-1000i®.

Résumé : Sur le plan pharmacodynamique, le clinicien ne dispose en pratique clinique que de la CMI. Cependant dans un certain nombre de service clinique, une augmentation de fréquence des infections graves à bactéries multi-résistantes est observée, souvent sur des terrains débilisés, justifiant le recours à des associations d'antibiotiques pour espérer améliorer l'efficacité des molécules. Dans ce contexte, il est décrit *in vitro* à l'aide de courbes de bactéricidie en milieu liquide dans des modèles dynamiques une capacité de certains antibiotiques rendus individuellement résistants sur l'antibiogramme à réduire tout de même l'inoculum lorsqu'ils sont associés. Mais, l'étude de ces associations en modèle dynamique est lourde sur le plan technique et indisponible au quotidien.

Nous avons donc évalué, dans ce travail, si l'automate UF-1000i® basé sur une technologie de fluorocytométrie en flux peut être utiliser pour effectuer des courbes de bactéricidie et évalué son application à l'étude de souches infectantes de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistantes.

Les résultats obtenus soulèvent le problème de détection de viabilité bactérienne mais pour les associations testées sont en accord avec les résultats retrouvés dans la littérature avec un temps de réponse rapide.

Des travaux complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur L. DUBREUIL
Assesseur(s) : Monsieur le Professeur R. COURCOL
Monsieur le Docteur E. KIPNIS

Monsieur le Docteur R. DESSEIN