

**Modèle in vitro d'infection urinaire sur cathéter à
Pseudomonas aeruginosa traitée par ciprofloxacine : rôle
prépondérant de la persistance sur la résistance**

A. Soares, E Fiaux, I Meouche, E. Bouffartigues, S. Chevalier, M.
Pestel-Caron, F. Caron, M. Etienne

► **To cite this version:**

A. Soares, E Fiaux, I Meouche, E. Bouffartigues, S. Chevalier, et al.. Modèle in vitro d'infection urinaire sur cathéter à Pseudomonas aeruginosa traitée par ciprofloxacine : rôle prépondérant de la persistance sur la résistance. 35ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI 2015), Dec 2015, Paris, France. hal-02268793

HAL Id: hal-02268793

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02268793>

Submitted on 21 Aug 2019

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

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

Modèle *in vitro* d'infection urinaire sur cathéter à *Pseudomonas aeruginosa* traitée par ciprofloxacine : rôle prépondérant de la persistance sur la résistance

A. Soares^{1,3}, E. Fiaux^{2,3}, I. El Meouche³, E. Bouffartigues⁴, S. Chevalier⁴, M. Pestel-Caron^{1,3}, F. Caron^{2,3}, M. Etienne^{2,3},
¹Laboratoire de Bactériologie, ²Service des Maladies Infectieuses, ³GRAM, EA 2656, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, ⁴LMSM, EA 4312, Evreux

Introduction

L'échec d'éradication des bactéries à la surface du matériel est lié à :

- l'organisation des bactéries en **biofilm** (BF),
- la présence de bactéries **persistantes** (P) :
 - **tolérantes** à des concentrations antibiotiques (ATB) très élevées
 - mais **sensibles** (S) en culture planctonique
 - dont le phénotype est **réversible, transitoire et non héréditaire**.

→ Les mécanismes liés à la P restent mal connus.

Objectifs

- ❖ **Développer un modèle de persistance *in vitro***
 - Modèle *in vitro* d'infection urinaire (IU) en BF sur cathéter (CU) à *Pseudomonas aeruginosa* (PA) traitée par ciprofloxacine (CIP).
- ❖ **Etudier l'adaptation transcriptionnelle sous l'effet d'un stress ATB**
 - par qRT-PCR.

Méthodes

- ❖ **Modèle *in vitro* d'IU sur CU à PA traitée par CIP**
 - 4 j de formation de BF à *P. aeruginosa* (PA14) sur CU
 - BF exposé pendant 1h, 6h ou 24h
 - Exposition à des concentrations croissantes de CIP [1 à 2048 x CMI]
 - **Dénombrement des bactéries S** sur MH2,
 - **Dénombrement des mutants résistants (R)** sur MH2+CIP (1 x CMI)
 - **Considérées comme P** : les bactéries restées S à l'ATB et survivantes après exposition à des concentrations ATB élevées permettant l'éradication des mutants R.

- ❖ **Analyse transcriptomique**
 - **Extraction d'ARN effectuée directement à partir des BF sur CU**
 - **Sur un mélange de bactéries R et P** : après 1h à 512 x CMI et à 768 x CMI de CIP
 - **Sur une population de bactéries P** : après 24h à 768 x CMI et 1h à 1024 x CMI
 - **Gènes cibles: *spoT*, *relA*, *lon*** (réponse stringente)
 - rpoS*, *rpoN* (facteurs sigma)
 - lasI* (quorum sensing)
 - **Gène de référence : 16S**
 - Expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) comparée à celle de CU non exposés à la CIP

Résultats

- ❖ **Impact du traitement antibiotique (Figures 1 et 2) :**
 - **Avant exposition à la CIP** : 9 log₁₀ UFC/ml dont 6,6 log₁₀ UFC/ml de bactéries R, Fréquence de mutation R = 5.10⁻³
 - **Après exposition à la CIP** : réduction bactérienne selon une courbe **biphasique** (Figure 1)
 1. [0 à 128 x CMI] (pendant 6h & 24h) ou [0 à 256 x CMI] (pendant 1h)
 - réduction bactérienne initiale importante (>2 log₁₀ UFC/ml)
 - **ratio S/R stable**
 2. [128 à 1024 x CMI] (pendant 6h & 24h) ou [256 à 1024 x CMI] (pendant 1h)
 - relative stabilité des concentrations bactériennes « **plateau** »
 - **Stérilisation des CU pour des [ATB] > 1024 x CMI** (après 1h, 6h et 24h d'exposition à la CIP)
 - **[ATB] inférieures pour éradiquer les bactéries R que P** [768 à 1024 x CMI vs 2048 x CMI]
 - **Pour des concentrations en CIP très élevées [768 à 2048xCMI] (6h & 24h), [1024 à 2048xCMI] (1h) (Figure 2) :**
 - **éradication des bactéries R**
 - **seules les bactéries S / tolérantes à la CIP survivent → bactéries P**

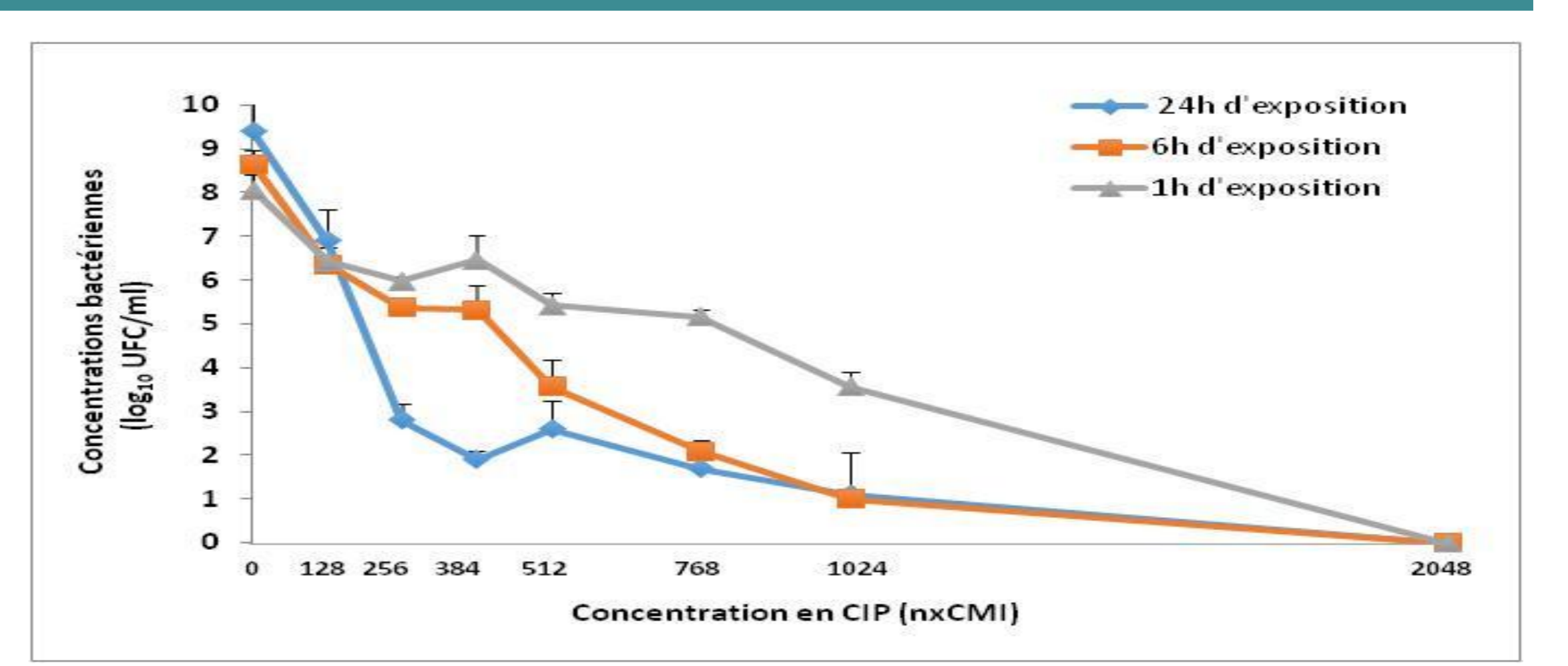


Figure 1 : Concentrations bactériennes après 1h, 6h et 24h d'exposition à des concentrations croissantes de CIP.

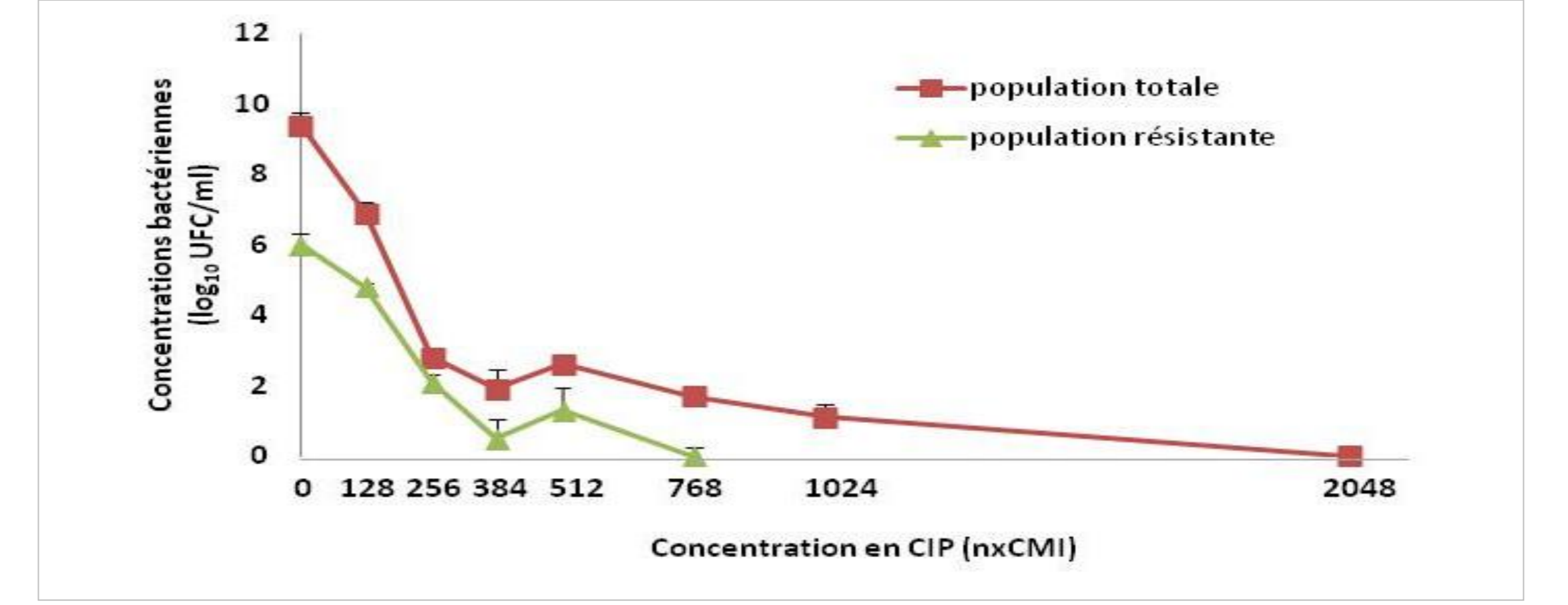


Figure 2 : Concentrations bactériennes de la population totale et de la population résistante après 24h d'exposition à des concentrations croissantes de CIP.

- ❖ **Analyse transcriptomique (Tableau 1) :**
 - Par comparaison à des CU non exposés aux ATB (expression = 1) :
 - **Pour des populations de bactéries R et P exposées à la CIP** :
 - aucune surexpression des gènes testés
 - **Pour les populations P, surexpression de *spoT*, *relA*, *rpoN* et *lasI*** :
 - **intense (x10 à x35)**
 - **précoce (dès 1h d'exposition à la CIP)**
 - **exponentielle : [CIP] x 1,3 (768 à 1024 x CMI) pendant 1h → expression x 85 de *relA* et *spoT*.**
 - **transitoire « Upregulation » qui décroît avec le temps (1h vs 24h)**

Réponse	Population résistante et persistante		Population persistante seule	
	512xCMI - 1h	768xCMI - 1h	768xCMI - 24h	1024xCMI - 1h
Stringente				
<i>spoT</i>	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,02	6,8 ± 1,8	34,2 ± 16,6
<i>relA</i>	0,6 ± 0,07	0,4 ± 0,02	3,2 ± 0,8	20,8 ± 10,4
<i>lon</i>	0,8 ± 0,1	ND	5,8 ± 1,8	ND
Facteurs sigma				
<i>rpoN</i>	ND	0,6 ± 0,07	2,8 ± 0,7	ND
<i>rpoS</i>	ND	0,4 ± 0,1	3,4 ± 1,2	9,9 ± 4,5
Quorum sensing				
<i>lasI</i>	ND	ND	3,2 ± 0,8	13,1 ± 6,4

ND : no data ; résultats exprimés en moyenne ± EC
Tableau 1 : Expression relative des gènes d'intérêt après une exposition variable à la CIP (moyenne ± écart-type).

Discussion

Malgré les faibles concentrations d'ARN extraites sous forte pression en CIP →

Activation intense, précoce et transitoire de :

- *lasI* (Quorum sensing) impliqué dans la consolidation du BF
- *relA* et *spoT* (réponse stringente) pour la tolérance à la CIP et la survie bactérienne
- Surexpression de *spoT* dont l'activité de synthase ou d'hydrolase reste à préciser

Conclusion

- **Modèle *in vitro* d'IU sur CU à PA de sélection de bactéries P**
- **Rôle prépondérant de la P sur la R dans l'échec des traitements ATB en BF**
- **Surexpression des gènes testés, en situation de P**

→ « Switch » transcriptomique et phénotypique vers la persistance sous antibiotiques *via* la réponse stringente ?