

**Analyse comparative en culture planctonique et en
biofilm de traitements par ciprofloxacine et/ou
amikacine vis-à-vis de souches de *Pseudomonas
aeruginosa* surexprimant un efflux**

A Soares, K. Alexandre, F. Lamoureux, L. Lemée, F. Caron, M. Pestel-Caron,
M. Etienne

► **To cite this version:**

A Soares, K. Alexandre, F. Lamoureux, L. Lemée, F. Caron, et al.. Analyse comparative en culture planctonique et en biofilm de traitements par ciprofloxacine et/ou amikacine vis-à-vis de souches de *Pseudomonas aeruginosa* surexprimant un efflux. RICAI, Dec 2018, Paris, France. hal-02270988

HAL Id: hal-02270988

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02270988>

Submitted on 26 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.

Analyse comparative en culture planctonique et en biofilm de traitements par ciprofloxacine et/ou amikacine vis-à-vis de souches de *Pseudomonas aeruginosa* surexprimant un efflux.

 A. Soares^{1,2}, K. Alexandre^{1,3}, F. Lamoureux⁴, L. Lemée^{1,2}, F. Caron^{1,3}, M. Pestel-Caron^{1,2}, M. Etienne^{1,3}
¹GRAM EA2656, Université de Rouen Normandie, Rouen ; ²Laboratoire de Bactériologie, CHU de Rouen ; ³Service de Maladies infectieuses et tropicales, CHU de Rouen ; ⁴Service de Pharmacologie Toxicologie, CHU de Rouen

Introduction

Les bithérapies, souvent prescrites dans l'objectif de prévenir la sélection de mutants résistants (R), ont été peu évaluées comme modalité d'optimisation du traitement des infections en biofilm. **L'objectif de ce travail a été de tester l'efficacité, en condition planctonique et en biofilm, des monothérapies de ciprofloxacine (CIP) et d'amikacine (AMIK) et d'une bithérapie CIP + AMIK, vis-à-vis de souches de *P. aeruginosa* sensibles ou de sensibilité diminuée par surexpression d'efflux.**

Méthodes

- 5 souches de *P. aeruginosa* : PAO1 et 4 isolats cliniques : sauvage (WT), efflux MexAB-OprM (AB), MexXY-OprM (XY) et MexCD-OprJ (CD)
- Cultures planctoniques en phase exponentielle, exposition antibiotique (ATB) 24h
- Biofilm de 48h en plaque 6 puits, exposition ATB 72h
- Antibiotiques : 4 mg/L de CIP (pour une AUC/CMI > 125) / et/ou 40 mg/L d'AMIK (Cmax/CMI > 10, et = 2,5 pour XY)
- Dénombrement de la population totale
- Recherche des mutants R sur milieu additionné de CIP ou AMIK à 4 x CMI, caractérisation des mutants R
- Recherche de faibles variations de CMI en biofilm par mesure des « CMI de population » à 0, 1 et 72h,
- Quantification des niveaux d'expression des systèmes d'efflux par qRT-PCR

Tableau 1 : Caractéristiques des souches de *P. aeruginosa* étudiées

Souche	TCC (S≤16 -R>16)	CMI (mg/L)			Fréquence de mutation (300 mg/L RIF)	Niveau d'expression		
		CIP (S≤0.5 -R>0.5)	LVX (S≤1 -R>1)	AMIK (S≤8 -R>16)		mexB	mexY	mexD
PAO1	16	0,125	0,25	2	1,8 x 10 ⁻⁸	1,0	1,0	1,0
WT	16	0,06	0,25	2	3,4 x 10 ⁻⁹	1,7	1,1	0,3
AB	>256	0,06	1	2	8,1 x 10 ⁻⁹	3,6	5,3	0,7
CD*	4	0,5	4	0,5	3,5 x 10 ⁻⁸	1,3	1,7	14,6
XY	32	0,125	1	16	2,9 x 10 ⁻⁹	1,3	10,1	4,1

* Absence de mutations dans le QRDR ;
 • TCC : ticarcilline-clavulanate ; LVX : lévofloxacine ; RIF : rifampicine

Résultats

En culture planctonique :

A partir de cultures planctoniques ($7,7 \pm 0,4 \log_{10}$ ufc/mL) réduction après 1h de mono ou bithérapie $\geq 3,9 \log_{10}$ ufc/mL

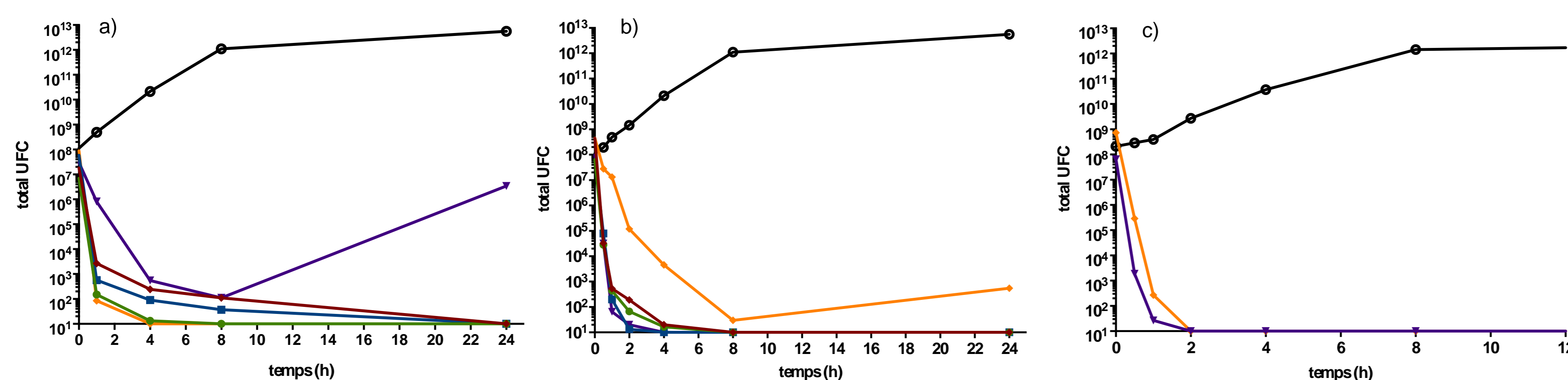


Figure 1 : Courbes de réduction bactérienne en culture planctonique après traitement par ciprofloxacine (a), amikacine (b), ciprofloxacine + amikacine (c)
 TC : témoin de croissance

- Sensibilité diminuée à la CIP ou AMIK par hyper-expression d'efflux, favorisant l'émergence de mutants R
- Sélection de mutants R prévenues par l'association CIP + AMIK

Pour la souche CD (CMI CIP = 0,5 mg/L) :

→ Après 8h de traitement par CIP :

- reprise d'une croissance bactérienne
- résistance à la CIP ; CMI > 32 mg/L
- mutations dans le QRDR (GyrA Thr-83-Ile + ParC Ser-80-Leu)
- et expression x4 de MexCD-OprJ après exposition ATB

Pour la souche XY (CMI AMIK = 16 mg/L) :

→ Après 8h de traitement par AMIK :

- reprise d'un croissance bactérienne
- résistance à l'AMIK ; CMI > 256 mg/L
- expression stable (X1) de MexXY-OprM après exposition ATB

Pour les souches PAO1, WT, AB :

- Éradication en 24h, sans sélection de mutants résistants

En biofilm :

A partir de biofilm ($8,2 \pm 0,5 \log_{10}$ ufc/mL), réduction bactérienne biphasique : $\geq 1,9 \log_{10}$ ufc/mL après 1h de mono ou bithérapie

concentrations bactériennes stables entre 8h et 72h ($4 \pm 0,7 \log_{10}$ ufc/mL)

→ Absence d'éradication bactérienne en 72h

Sans différence significative ($p > 0,05$) :

- selon les souches
- selon l'exposition à CIP, AMIK ou à l'association

Concentrations d'antibiotique stables après 72h d'exposition ATB
 (ciprofloxacine : $6,5 \pm 1,3$ mg/L ; amikacine : $49,8 \pm 3,6$ mg/L)

→ Population survivante après 72h d'exposition ATB < 1% de la population initiale

- Composée très majoritairement de cellules sensibles (>99,9%)
- Isolement erratique de mutants R après mono- et bithérapie :
 - CMI CIP allant de 0,5 à 2 mg/L → expression x 5 à 180 de MexCD-OprJ, absence de mutation dans le QRDR
 - CMI AMIK de 2 à >256 mg/L → expression stable de MexXY-OprM
 - sans re-croissance à 72h
- CMI « de population » CIP et AMIK inchangées → Pas de glissement des CMI CIP/AMIK en biofilm après 72h d'exposition ATB

Inefficacité des traitements en biofilm par tolérance/persistence adaptative

Absence d'amélioration par une association d'ATB

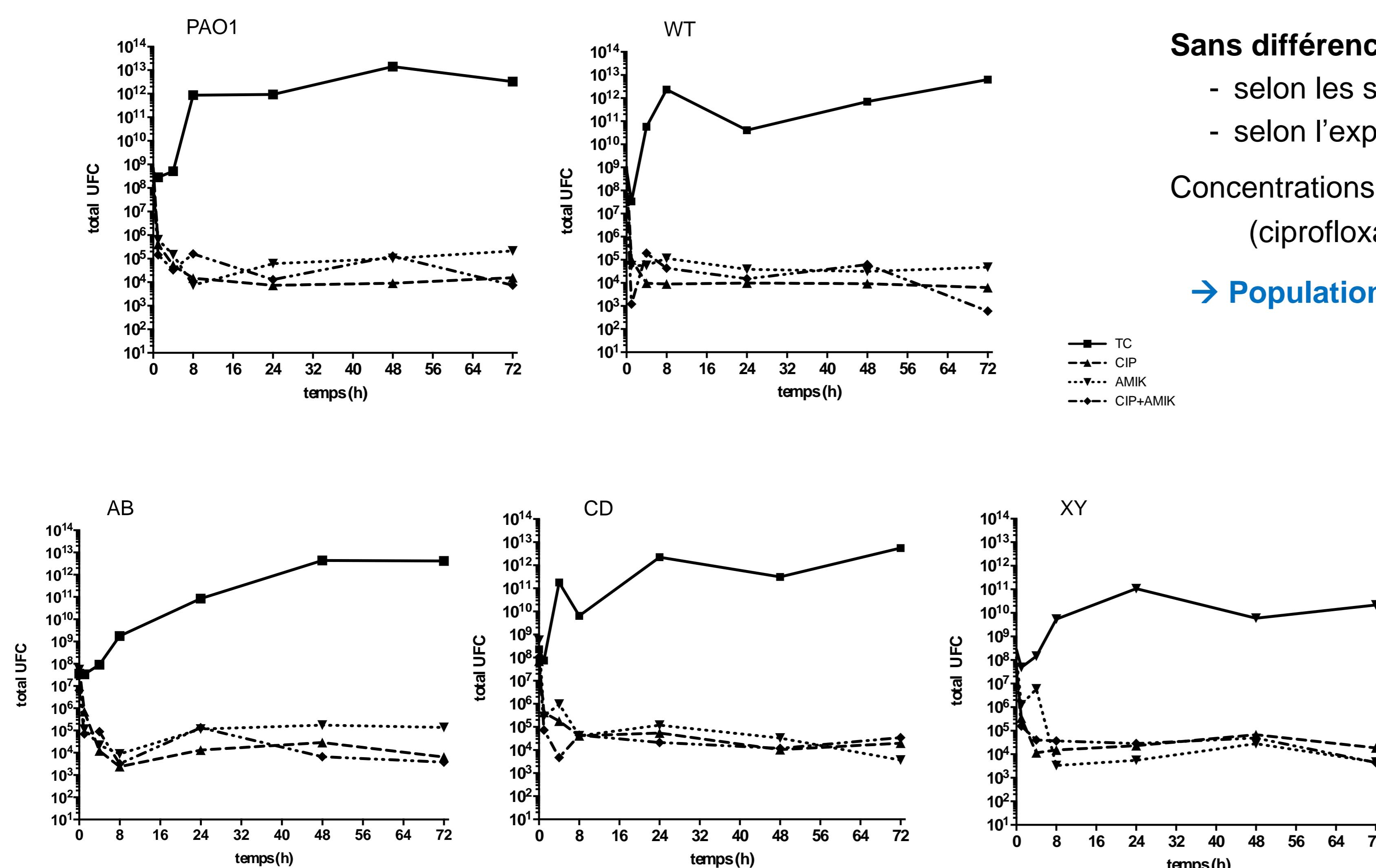


Figure 2 : Courbes de réduction bactérienne en biofilm après traitement par ciprofloxacine, amikacine, ciprofloxacine + amikacine par souche.
 TC : témoin de croissance

Conclusion

L'intérêt d'une association d'antibiotique semble confirmé dans un modèle d'infection planctonique, permettant de prévenir la sélection de mutants résistants, favorisée par des systèmes d'efflux aux antibiotiques. En biofilm, l'échec du traitement est du à une population de bactéries persistantes, tolérantes aux antibiotiques, sans émergence de mutants résistants, y compris pour des souches exprimant des efflux et au cours de monothérapies. L'association d'antibiotiques ne démontre pas dans ce modèle d'intérêt pour le traitement des infections en biofilm.