

Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Dans ce chapitre nous introduirons les concepts liés à la croissance d'organismes. Puis nous établirons que le domaine d'étude des actions des antibiotiques fait ressortir un paramètre expérimental très utilisé. Nous montrerons comment ce paramètre est déterminé. Ensuite nous établirons les origines possible de l'altération de ce paramètre de mesure par la densité de micro-organismes initialement présents. Enfin nous étudierons la dépendance du paramètre de mesure d'action des antibiotiques avec le nombre de cellules présentes.

1.1 Généralités

L'examen de la réaction bactérienne en présence d'antibiotique traite la réponse des bactéries à l'action d'une dose d'antibiotique. Avant toute étude impliquant les antibiotiques, il est nécessaire de connaître l'attitude des micro-organismes sans facteur de stress. Notamment par le comportement de la croissance, celle-ci étant l'indicateur de l'activité d'une population bactérienne. Les antibiotiques, étant fréquemment utilisés afin d'éliminer les agents infectieux, perturbent le développement cellulaire. La croissance est donc plus ou moins fortement altérée par la présence d'antibiotiques. L'action produite par les antibiotiques est déterminée en ciblant toute avarie portée sur la croissance bactérienne.

1.1.1 Croissance bactérienne

La croissance est définie par une augmentation des constituants cellulaires de micro-organismes. Elle peut se traduire par une augmentation de la taille des organismes et/ou du nombre d'organismes [77].

Mode de reproduction

La croissance se traduit par l'accumulation de constituants cellulaires au sein d'un organisme. Cela aboutit à un accroissement du nombre de cellules lorsque les

micro-organismes se multiplient par segmentation ou par bourgeonnement. Afin de

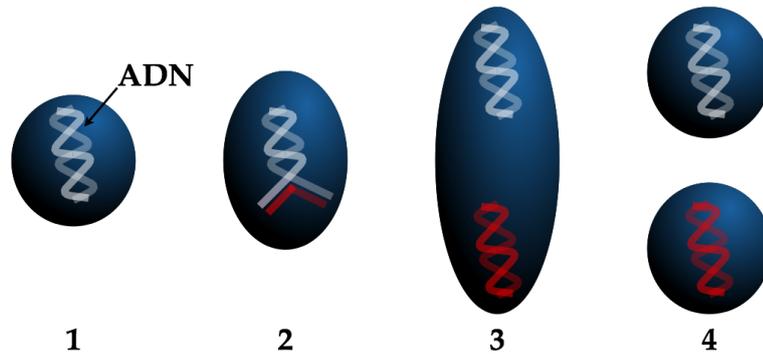


FIGURE 1.1 – Représentation simplifiée de la reproduction par segmentation.

se développer en nombre, une part importante des micro-organismes se multiplient de manière asexuée par division cellulaire. Le matériel génétique se réplique au sein de l'organisme, celui-ci voit sa membrane s'allonger. Une fois la duplication de l'ADN effectuée (2^{ème} étape de la figure 1.1 p.9), le double bagage génétique se sépare et les brins d'ADN migrent vers les extrémités opposées de la cellule (3^{ème} étape). Cet organisme finit par se scinder en deux au niveau de la zone équatoriale nommée septum (4^{ème} étape). De cette façon un organisme engendre une cellule fille et continue sa propre division, et les cellules filles en font de même.

Il n'est pas évident d'analyser la croissance et la division individuellement à cause de la petite taille des micro-organismes (ordre de grandeurs table 2.1 p.52). La croissance est donc principalement suivie par la détection de la variation du nombre de cellules.

Analyse de la croissance

Tout comme dans la nature, la culture *in vitro* de micro-organisme s'effectue fréquemment dans un système fermé, limité en nutriments [57, 75, 83]. La figure 1.2 (p.10) montre le comportement de la croissance d'une population se divisant

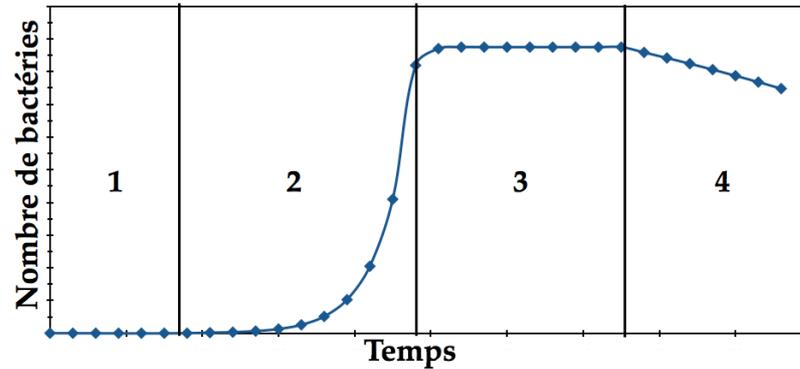


FIGURE 1.2 – Modèle de croissance et les quatre principales phases.

par segmentation. Cette représentation de l'évolution du nombre d'organismes en fonction de la période d'incubation révèle quatre phases distinctes lors de la croissance [73] :

1. La phase de la latence.

Lorsque les micro-organismes sont introduits dans un milieu de culture neuf, le nombre ou la masse cellulaire n'augmente pas instantanément. La période d'attente avant le début de la croissance est la phase de latence. Cette période est nécessaire à l'adaptation des organismes au nouveau milieu de culture. Le délai avant la croissance dépend de l'âge des bactéries, ainsi que de la similarité en composition du nouveau milieu de culture avec le milieu initial où ont été prélevés les organismes.

2. La phase exponentielle.

Lors de cette phase chaque micro-organisme procède à son développement par division à intervalle de temps constant, définissant τ comme le temps de division des organismes d'une population. Le temps de division reste constant tant que les paramètres de croissance restent stables (température, pH, pression osmotique...), et tant que l'organisme n'est pas soumis à un facteur de stress. L'inoculum, n_i , est le nombre initial de cellules introduites. La période, τ , durant laquelle une cellule mère se développe engendrant une cellule fille

est une génération, comme schématisé dans la figure 1.1 (p.9). Chaque organisme se divise selon ce mode de reproduction, les mères comme les filles, chacune de ces cellules se divisent sur n_G générations jusqu'à épuisement des nutriments (figure 1.3 p.11). Le milieu contient donc $n_i \cdot 2^{n_G}$ organismes à la

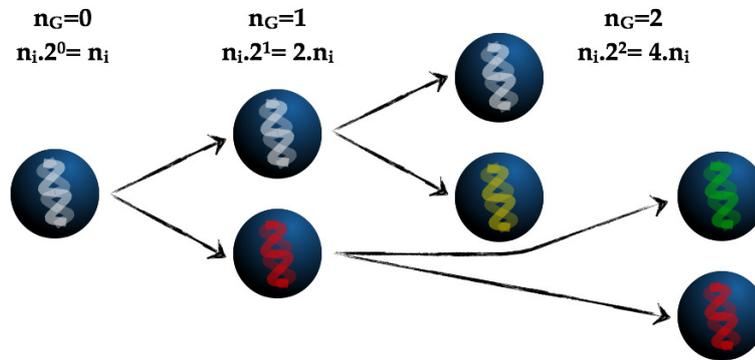


FIGURE 1.3 – Représentation de deux générations.

fin de la croissance. La période finale de croissance, t_F , dépend du nombre final de générations et du taux de croissance, τ :

$$t_F = \tau \cdot n_G$$

Ce qui permet de déduire à tout instant, t :

$$t = \tau \cdot n_t \Rightarrow n_t = t/\tau$$

n_t étant le nombre de générations accomplies à cet instant. De ce fait, le nombre de cellules présentes en fonction du temps, $N(t)$ est défini par :

$$N(t) = n_i \cdot 2^{t/\tau} \tag{1.1}$$

Ce modèle théorique de croissance explique la pente de la phase exponentielle et décrit la reproduction des cellules au cours du temps de croissance.

3. La phase stationnaire.

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

La carence en nutriments et/ou la réduction de substances essentielles, comme par exemples la limitation en dioxygène pour les organismes aérobies, ou l'accumulation de déchets toxiques pour les organismes anaérobies, termine la croissance et le nombre final d'organismes est ainsi atteint. Durant cette phase la taille de la population ne change pas, ceci peut résulter d'un équilibre entre division et mort cellulaire, ou bien la population peut cesser de se diviser et rester métaboliquement active.

4. La phase de mortalité.

La pénurie de nutriments et l'accumulation de déchets toxiques conduisent finalement à la diminution de cellules viables. La mort des organismes est définie comme la perte irréversible de la capacité de se diviser. Bien que les bactéries meurent de façon continue (et constante) le taux de mortalité peut diminuer après une réduction drastique de la population. Ceci est dû à la survie d'organismes particulièrement résistants.

Techniques de culture

La source en nutriment des organismes peut être préparée de deux façons. La composition ne change pas selon les méthodes, l'état du bouillon de culture est le seul qui diffère. Toutes les bactéries ont besoin d'eau, d'une source d'énergie (lumière ou oxydation de composés organiques ou inorganiques), d'une source de carbone, d'une source d'azote et d'éléments minéraux (principalement soufre et phosphore présents dans les acides aminés et nucléiques). Ces besoins élémentaires sont suffisants pour permettre la nutrition des bactéries qualifiées de prototrophes. Certaines bactéries qualifiées d'auxotrophes nécessitent, en plus des besoins élémentaires, la présence de facteurs de croissance (composé(s) chimique(s) dont un organisme ne peut assurer la synthèse).

Le mode de préparation le plus simple est la culture en volume liquide. Celle-ci se prépare par dilution des éléments nutritifs, listés précédemment, dans de

l'eau stérilisée. La seconde méthode consiste à produire le milieu de culture sous forme d'un gel durci. Pour la préparation il faut ajouter une certaine proportion de poudre d'Agar à une solution liquide du milieu de culture. Ensuite il faut homogénéiser la solution puis la stériliser à 120°C pendant environ trente minutes. Il faut ensuite faire couler le milieu de culture avec l'Agar dans des récipients (les plus communs sont les boîtes de Pétri) et laisser refroidir à température ambiante pendant plusieurs heures pour que la solution gélifie.

Méthodes de mesure

Pour établir la croissance bactérienne de nombreuses méthodes existent et permettent de mesurer la quantité d'organismes [72]. Ces méthodes de quantification établissent un suivi du nombre d'organismes par unité de temps ou de volume. Le recensement s'établit soit par mesure de l'activité cellulaire (comptage indirect), soit par comptage direct des micro-organismes.

Mesure de l'activité cellulaire Ces méthodes quantifient les changements que produisent les organismes pendant la croissance sur leur environnement. La croissance se traduit par la consommation d'un substrat (source de nutrition), dont la concentration peut être dosée. Il peut être également possible de mesurer la production de constituants cellulaires, principalement la quantité d'enzymes ou de déchets. Le suivi des variations des propriétés physico-chimique du milieu est aussi un procédé de quantification d'organismes : le pH, le potentiel d'oxydoréduction ou l'impédance du milieu, sont des paramètres changeants selon la densité cellulaire.

Mesure du nombre d'organismes Les méthodes de comptages sont diverses, en premier lieu de multiples méthodes permettent d'établir la concentration des organismes. Les hématimètres, par exemple, sont des lames creusées de petites chambres de comptage à l'oeil, quadrillées pour aider l'expérimentateur (de nombreuses versions existent : les cellules de Lemaire, Malassez, Nageotte, Neubauer,

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

Thoma). L'injection d'un petit volume contenant des organismes dans la lamelle donne accès au nombre d'organismes par carreaux, ce qui permet d'estimer la concentration d'organismes.

La numération par épifluorescence donne accès au nombre de bactéries par unité de volume par l'observation, en microscopie, de la fluorescence des organismes. Cette méthode a l'avantage de s'affranchir des cellules mortes. Cette technique est de plus en plus utilisée, surtout depuis 1994 et l'utilisation du marqueur GFP (Green Fluorescent Protein découvert en 1962) en tant que rapporteur de la présence bactérienne [27].

Il est également possible de dénombrer les cellules en surface, après étalements de différentes dilutions du milieu de culture sur différentes surfaces de gélose, ou par concentration d'une culture sur une membrane filtrante. Après dilution ou filtration les organismes se retrouvent isolés les uns des autres ou en très faible concentration. Ce qui fait que l'ensemencement permet aux organismes de se multiplier lors de l'incubation et former des "patches" en surface. Ces "patches" sont des colonies composées de nombreux organismes issues d'un individu. De cette façon le comptage de la totalité des colonies finalement formées (*cfu*) détermine le nombre d'organismes initialement présents.

D'autres méthodes établissent le nombre exact de cellules (au facteur de résolution de la méthode de mesure près). La détermination du poids sec (récolte d'organismes par centrifugation ou par filtration sur membrane) révèle la masse totale d'organismes. Par cytométrie, il est possible de compter les cellules dans un échantillon très dilué. Et finalement le procédé le plus utilisé : la turbidimétrie. Ce procédé mesure l'absorbance du milieu et l'application de la loi de Beer-Lambert révèle la concentration en organismes dans le milieu.

1.1.2 Action des antibiotiques

La reproduction sans contraintes des organismes est un mécanisme bien assimilé. La croissance de populations peut être altérée par divers paramètres ex-

tracellulaires, notamment par des agents chimiques naturels ou de synthèse : les antibiotiques (appelés aussi anti-microbiens, biocides ou anti-bactériens). Depuis leur découverte au 20^{ème} siècle, les anti-microbiens ont permis de détruire considérablement la menace de maladies infectieuses. L'utilisation de ces molécules dans la conception de "médicaments miracles" a engendré une baisse spectaculaire de la mortalité imputable à des maladies autrefois courantes et fréquemment mortelles. Ils ont contribué à la grande progression de l'espérance de vie observée dans la dernière partie du 20^{ème} siècle selon un rapport de l'OMS [76]. Les antibiotiques ont une grande efficacité car ils agissent à faible dose (de l'ordre du mg/L ou $\mu g/mL$).

Il existe deux grandes classes d'antibiotiques :

- Les bactériostatique : ce sont les biocides capables d'arrêter la croissance des bactéries. En empêchant la prolifération bactérienne, ils facilitent donc la destruction des germes par les défenses de l'hôte.
- Les bactéricides : ce sont les biocides qui éliminent les organismes.

Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. Les antibiotiques ont plusieurs modes d'actions pour inhiber et/ou détruire les bactéries (figure 1.4 p.16).

Destruction de la membrane des cellules Par ce mode d'action, les antibiotiques dissolvent la membrane extracellulaire des organismes libérant ainsi certains éléments cellulaires essentiels hors de l'organisme.

Action sur la paroi des cellules Par ce mode d'action, les antibiotiques agissent par affinité sur des cibles extracellulaires d'organismes actifs (se répliquant). Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi, la cellule engrange les constituants cellulaires et explose sous l'effet de la pression osmotique. Ce type de destruction est appelé lyse.

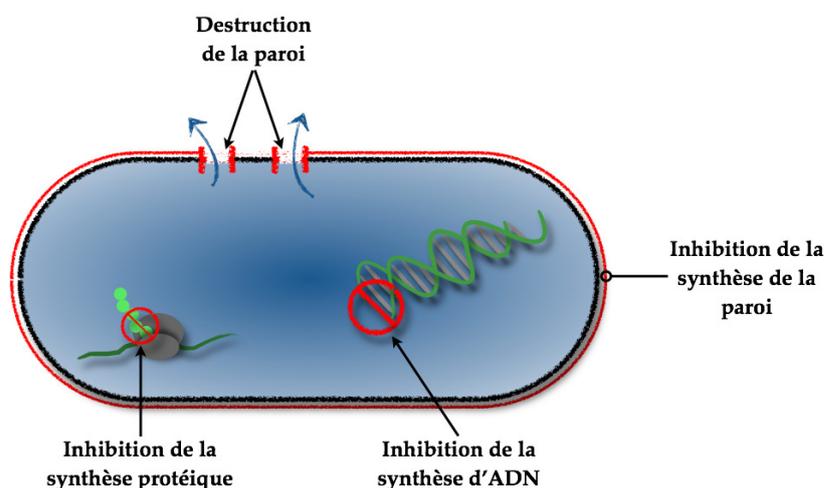


FIGURE 1.4 – Schématisation des modes d'action des antibiotiques.

Action sur l'ADN Par ce mode d'action, les antibiotiques empêchent la répllication de l'ADN et donc la croissance des bactéries.

Perturbation de la synthèse protéique Par ce mode d'action, les antibiotiques ont pour cible l'élément cellulaire responsable de la synthèse des protéines : le ribosome. Par cette action les cellules ne sont pas capable de synthétiser correctement des protéines et sont affectées dans leur organisation et développement.

Ainsi, quelque soit le type d'action que produit un antibiotique sur un organisme, il en modifie la croissance. Si les bactéries sont utilisées dans le domaine industriel, notamment dans la fermentation ou en tant qu'éléments de synthèse de certains antibiotiques, les bactéries sont souvent source d'infections. Et en terme de santé publique si un état pathologique n'est pas traité, cela accroît le risque de décès de l'hôte, et allonge également sa période de contagiosité [76].

Les études de l'action des antibiotiques sont menées principalement en pharmacologie. Elles s'exercent aussi dans le cadre de l'évolution, par l'étude de l'adaptation et la mutation d'organismes qui résistent aux anti-microbiens. Ces deux do-

maines sont liés, notamment par l'apparition et la propagation de germes résistants aux antibiotiques. L'évolution est le degré supérieur des études du comportement bactérien en présence d'antibiotique. En pharmacologie, le principal aspect des études est de tester l'action curative des antibiotiques en vue de déterminer leurs posologies.

1.1.3 La pharmacodynamie

La pharmacodynamie est un paramètre pharmacologique de l'étude de l'action des antibiotiques sur les organismes. Ce critère permet de déterminer, entre autres, l'efficacité et l'activité d'un antibiotique. L'objectif de la conception d'un médicament antibiotique est d'être actif sur les agents infectieux à des doses nécessaires et suffisantes à la désinfection. En effet le dosage thérapeutique ne dépend pas de la masse bactérienne à éliminer, il est basé sur la résistance des organismes à un sous dosage en biocide. Il est possible de déterminer par diverses techniques la concentration minimale en antibiotique qu'il faut pour inhiber le développement des organismes : la Concentration Minimale Inhibitrice (**CMI**). L'examen standard pour évaluer l'activité anti-bactérienne *in vitro* est donc de déterminer la CMI (MIC en anglais) [101].

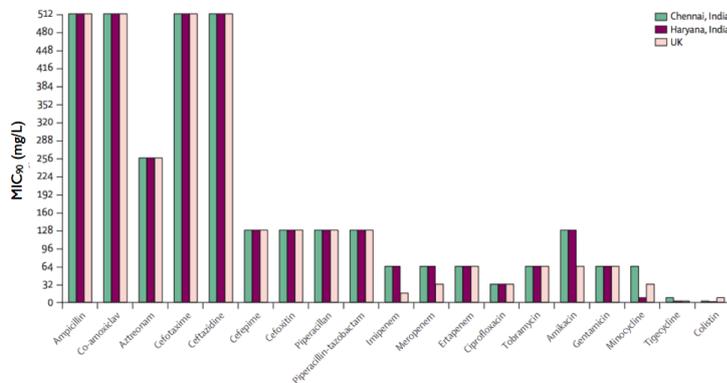


FIGURE 1.5 – Mesures des CMI de divers antibiotique sur la nouvelle bactérie "super-résistante" (NDM-1) [61].

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

La CMI d'un antibiotique contre un agent pathogène est généralement le principal paramètre déterminant le meilleur biocide pour remédier à une infection [79, 80]. La CMI est en tout cas le premier paramètre recherché lors de l'étude de traitement antibiotique. Pour exemple les études récentes portant sur l'émergence d'une souche de bactéries "super-résistantes" [8, 61] sont résumés par la détermination de la CMI d'antibiotiques sur cette souche (figure 1.5 p.17).

Par définition, la CMI est la concentration minimale en antibiotique nécessaire pour au moins inhiber la présence bactérienne de la majeure partie de la population. Il existe deux procédures pour évaluer la CMI (figure 1.6 p.19) :

- Par élimination. Par cette méthode des échantillons d'une très large population initiale de bactéries sont incubés en présence d'antibiotique. Le principe est d'observer le déclin de la masse bactérienne, ou non pour évaluer la CMI. Les travaux réalisés présentent la CMI nécessaire à éliminer $X\%$ de la population à une période donnée : CMI_X .
- Par inhibition de la croissance. Par cette méthode des échantillons d'une plus faible population initiale en bactéries sont incubés en présence d'antibiotique. Le principe est d'observer l'augmentation de la masse bactérienne, ou non pour évaluer la CMI.

Par extension la CMI est considérée dans la majorité des cas comme la concentration minimale nécessaire à perturber plus ou moins fortement la capacité de survie des organismes. La CMI est un paramètre dépendant fortement de la résolution des outils employés à sa mesure. Quelque soit le procédé (élimination ou inhibition) la quantité minimale de bactéries détectables par les outils de mesure influence la détermination de la CMI.

1.2 Mesure de la CMI

Il a été relevé précédemment que les méthodes de mesures classiques employées pour la détermination de la CMI altèrent la précision du résultat. Cette section pré-

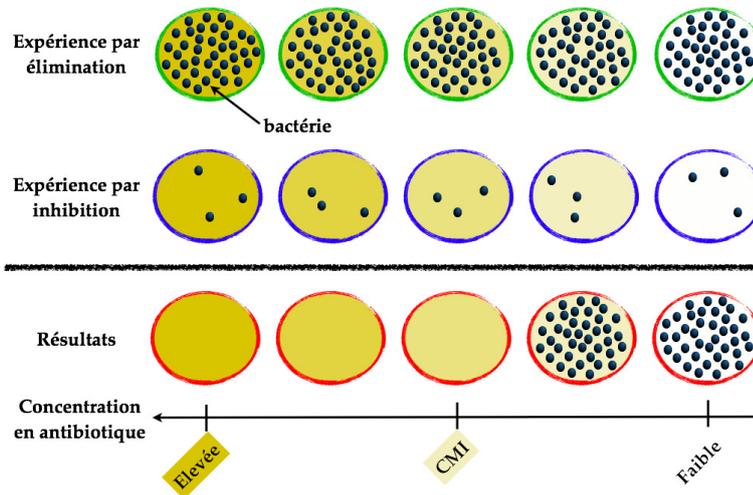


FIGURE 1.6 – Schématisation des deux procédures de mesure de la CMI.

sente les procédés courants de mesure de la CMI. Il existe deux principes pour les mesures, le premier basé sur la diffusion d'antibiotique(s) à la surface des échantillons de croissance. Le second se base sur la dilution d'anti-bactériens dans le milieu de croissance des organismes.

1.2.1 Méthodes par diffusion

Ces méthodes sont considérées comme les plus simple d'utilisation [22]. Elles reposent sur la diffusion d'un antibiotique à la surface d'un milieu de culture gélosé. Cette surface gélosé est la source en nutriments des organismes, ce sont des procédés bien connu en biologie, simples à réaliser mais nécessitant un temps de préparation assez long (plusieurs heures).

L'antibiogramme

L'antibiogramme est la méthode de détermination de la CMI d'un antibiotique la plus utilisée. Cette méthode consiste à ensemencer uniformément et complètement la surface de l'échantillon par la souche à étudier. Puis à y déposer des disques

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

de papiers buvard à une concentration en antibiotique donnée. Il est possible de disposer plusieurs disques sur la surface afin d'observer la reproductibilité de l'action d'une concentration en antibiotique, ou pour tester plusieurs antibiotiques en parallèle. Ces dispositifs sont commercialisés avec leur propres outils de calibration, la teneur d'un antibiotique est unique. La boîte de Pétri contenant le gel, les organismes et les disques d'antibiotique, sont ensuite incubés à une température et une période déterminées selon la souche. La diffusion de l'antibiotique sur la surface gélosée est graduelle et circulaire, elle révèle, après incubation, l'inhibition du développement des organismes à proximité des patchs par une zone vierge circulaire (figure 1.7 p.20). Autour de disques d'un antibiotique les résultats obtenus peuvent différer, ceci est dû à l'hétérogénéité des souches (section 1.3.3 p.35).

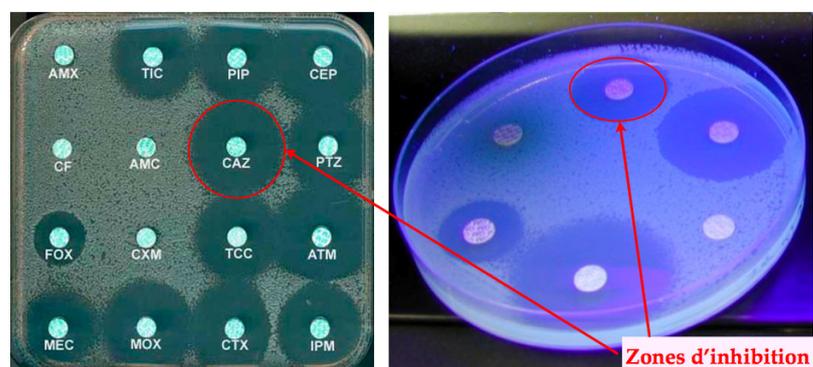


FIGURE 1.7 – Exemples illustrant des résultats d'antibiogrammes. A gauche, boîte carrée (16 tests au maximum) [105]. A droite, boîte ronde (6 tests au maximum) [104].

Le diamètre d'inhibition est relatif à la sensibilité des bactéries au gradient d'antibiotique diffusé dans la gélose. La croissance de la souche est inhibée au contact de la gélose contenant une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Les abaques (un des outils de calibration fournis avec les disques figure 1.8 p.21) déterminent la catégorie clinique des bactéries vis à vis de l'antibiotique utilisé. Ce sont également des instruments permettant d'estimer l'intervalle de concentration comprenant la CMI, par la corrélation avec le diamètre d'inhibition. Dans l'exemple présenté (figure 1.8 p.21) la CMI est donc comprise entre y mg/L et

1.2. Mesure de la CMI

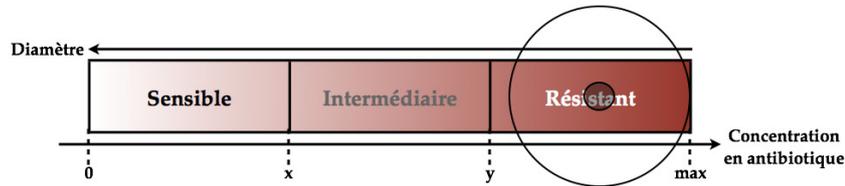


FIGURE 1.8 – Représentation d'un abaque.

la concentration maximale. Il existe une façon plus précise pour déterminer la CMI. Il est possible d'estimer la CMI de l'antibiotique en reportant le diamètre de la zone d'inhibition sur une courbe de concordance. Ces courbes sont préalablement établies, par la société commercialisant les disques, à partir d'une centaine de souche de sensibilités différentes. La mesure du diamètre reporté sur la courbe correspondant à l'antibiotique permet de connaître la CMI de l'antibiotique utilisé sur la souche (figure 1.9 p.21). Si on étudie un antibiotique *A* et que l'on mesure un

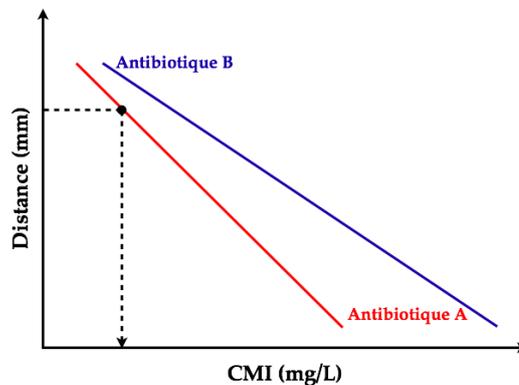


FIGURE 1.9 – Représentation d'une courbe de concordance de la CMI d'un antibiotique avec le diamètre de l'auréole.

certain diamètre, cette courbe permet d'évaluer la CMI du biocide sur la souche bactérienne.

Cette technique est simple et visuelle, mais elle emploie de nombreuses variables, ce qui augmente les erreurs possibles. De plus il faut disposer de la courbe de concordance pour avoir une estimation de la CMI, car l'estimation par les

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

abaques est très vague. Ces courbes de concordance sont produites à partir des mesures par dilution (détaillées en section 1.2.2 p.23). Il existe des machines capables de mesurer les diamètres d'inhibition, et possédant les courbes de calibration en base de données. Ces appareils délivrent directement l'estimation de la valeur de la CMI d'un antibiotique.

l'E-test

Cette méthode est basée sur les mêmes principes que les antibiogrammes par disques. Sur une surface de nutriments gélosée, une souche est ensemencée. Puis cette fois-ci c'est une bandelette qui est déposée sur la surface du gel. Cette bandelette est elle-même un gradient de concentrations d'antibiotique (figure 1.10 p.22). Après incubation l'action d'un antibiotique révèle une ellipse d'inhibition. Cette bande-

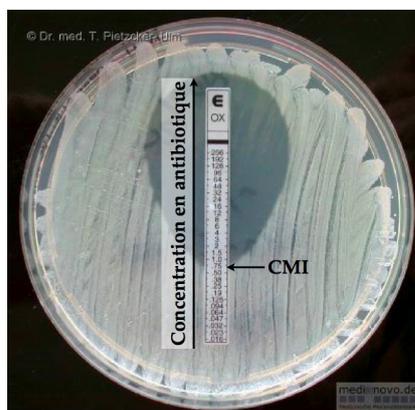


FIGURE 1.10 – Exemple standard d'un E-test [108].

lette indique directement la CMI sans prendre la peine d'employer de nombreuses variables. La valeur de la CMI est lue au niveau de l'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette. Cette méthode est plus précise que la mesure par antibiogramme, elle nécessite moins d'interprétations, mais elle est très onéreuse.

1.2.2 Méthodes par dilution

Ces méthodes déterminent la CMI de façon directe. Elles reposent sur la composition d'un gradient de concentrations d'un antibiotique dilué dans le milieu de culture. Ce procédé nécessite autant d'échantillons et de manipulations que de concentrations à tester (figure 1.11 p.23).

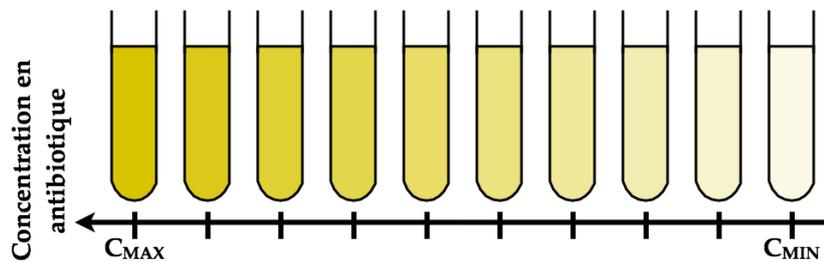


FIGURE 1.11 – Composition d'un gradient dans divers échantillons.

Dilution dans un gel d'Agar

Le principe de cette méthode est d'effectuer une série de dilution d'un antibiotique dans un milieu de culture (figure 1.11 p.23), puis d'en former un gel (d'Agar). La série de boîtes de Pétri ainsi préparées ont toutes une teneur différente en antibiotique. Ensuite l'échantillon est ensemencé en quelques points de la surface par la souche à étudier. C'est un protocole assez long et fastidieux, il existe une machine commercialisée permettant d'ensemencer les surfaces, mais toutes les autres étapes sont à effectuer manuellement. Une fois les échantillons préparés, ils sont incubés à température et période données. Dans l'exemple présenté (figure 1.12 p.24), l'appareil de Steers dispose des organismes sur la surface du gel par des pointes métalliques. Ces échantillons une fois incubés, révèle selon la concentration en antibiotique la résistance ou l'inhibition de la souche. Pour déterminer la CMI il faut préparer un certain nombre d'échantillons à différentes concentrations, et la boîte de Pétri inhibant la croissance correspond à une concentration en antibio-



FIGURE 1.12 – Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution dans un gel d'Agar. A gauche, l'appareil de steers, à droite, résultats obtenus [106].

tique qui est la CMI. Cette méthode est la moins pratique de toutes, et elle est très peu utilisée.

Technique de dilution et micro-dilution

Le principe de cette méthode est de réaliser un gradient de concentrations en antibiotique dans une série de tubes (technique de dilution) ou une série de puits d'une plaque à micro-titration (technique de micro-dilution) (figure 1.11 p.23). La technique est la même pour ces deux méthodes, seul le volume de l'échantillon testé diffère. Dans la série d'échantillons est introduite la même densité de cellules à étudiées. Après incubation à température et période fixées les échantillons révèlent l'action de l'antibiotique selon la turbidité des échantillons (figure 1.13 p.25). Lorsque que le biocide est en quantité suffisante elle inhibe la croissance bactérienne. Et au contraire en cas d'insuffisance la population peut se multiplier et le développement des cellules s'observe par un échantillon trouble. La CMI est donc fixée comme la concentration la moins élevée inhibant la croissance à la frontière croissance/inhibition (figure 1.13 p.25).

Ces méthodes sont également fastidieuses pour la préparation des échantillons, mais ce sont les seules permettant d'observer la dynamique de croissance en pré-

1.3. L'effet de l'inoculum

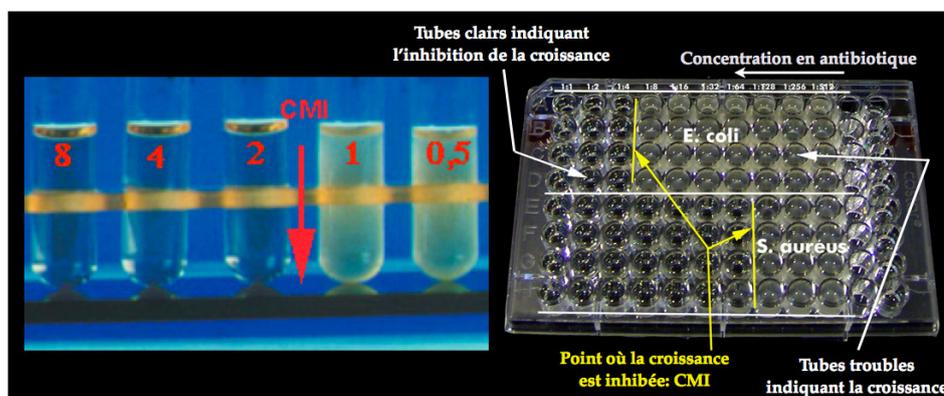


FIGURE 1.13 – Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution en volume. A gauche, test en volume macroscopique [107]. A droite, résultats obtenus en plaque à micro-titration photographie [103].

sence d'antibiotique (lorsque les bactéries peuvent se développer). De plus la micro-titration peut être effectuée par une machine, c'est pour tout cela que cette méthode est fréquemment utilisée.

Les bactéries sont des êtres vivants doués de propriétés diverses parmi lesquelles, la capacité d'élaborer des stratégies d'opposition à l'action des anti-bactériens, et notamment à un sous-dosage. C'est ce qui permet d'observer un point crucial aux études pharmacologiques : la CMI.

Mais la plupart des méthodes de détermination de la CMI sont fastidieuses et surtout de très faible précision. Les méthodes de détermination de la CMI présentées sont techniquement limitées, et limitent de ce fait la résolution des mesures. Ces considérations font état de la nécessité d'élaborer de nouvelles techniques de mesures, ou en tout cas d'améliorer celles existantes.

1.3 L'effet de l'inoculum

La CMI d'un antibiotique définit donc la concentration critique en dessous de laquelle le biocide utilisé n'est pas efficace pour l'inhibition ou l'élimination de

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

micro-organismes. Les nombreuses études de CMI d'antibiotiques sont réalisées sous contrôle constant de certains facteurs expérimentaux, parce qu'il est reconnu que la température et le pH, par exemples, influencent la valeur de la CMI. Et généralement les tests de CMI sont effectués en utilisant une grande densité de cellule, entre 10^6 et 10^8 *cellules/mL*. La taille de l'inoculum est un facteur expérimental pouvant influencer la valeur de la CMI. Cette influence est parfois controversée.

La dépendance de la CMI à la densité initiale de cellules présentes est avérée par la plupart des études. Dans certains cas l'effet sur la CMI lié à l'inoculum est considéré comme un artefact : "un phénomène *in vitro* de laboratoire" [95]. Ils remettent en cause le constat de dépendance entre CMI et taille de l'inoculum mettant en avant l'hypothèse du nul [9, 33]. Hypothèse supposant que la taille de l'inoculum n'a pas d'effet sur la CMI. Ce qui veut dire que peu importe la densité de cellules initialement stressées, la CMI est unique pour un couple inhibiteur/micro-organisme.

Les observations démontrant que la taille de l'inoculum n'a pas d'effet sur la valeur de la CMI de l'inhibiteur utilisé, estiment que le constat de dépendance entre la taille de l'inoculum et la CMI est lié à un facteur de limitation temporelle des expériences [9]. La figure 1.14 (p.27) expose pour chaque courbe l'influence de la densité des organismes sur la CMI. Et la figure révèle trois valeurs distinctes de CMI croissantes au cours du temps pour une seule taille d'inoculum. Ce qui est admis dans ce cas, c'est le fait que des conditions expérimentales néfastes n'affectent que le temps nécessaire à un organisme pour achever sa croissance. En d'autres termes, cela signifie que soumises à n'importe quelles conditions en deçà de la CMI, les cellules achèvent leur croissance après un certain temps d'incubation plus ou moins long selon leur densité initiale. Ceci les amène à penser que tous les inoculums convergent vers une seule CMI, et que la taille n'influence pas cette concentration seuil [9].

Le fait que l'inhibiteur ralentit le taux de croissance des organismes étaye cette théorie du nul [9, 33, 40, 89, 93, 99]. Leur idée est que les expérimentateurs obser-

1.3. L'effet de l'inoculum

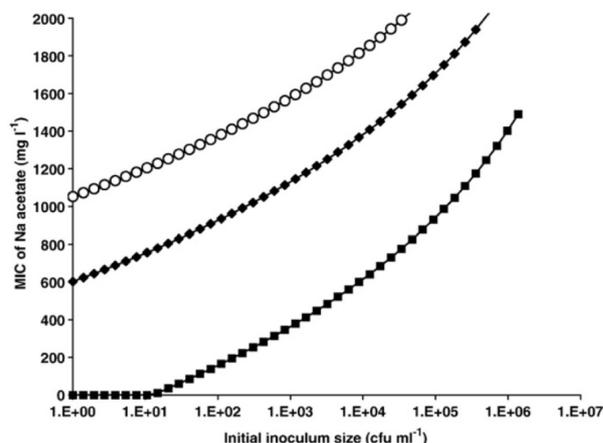


FIGURE 1.14 – Estimation par un modèle de la CMI en fonction de l'inoculum à différents temps d'incubation. Les carrés pleins, après 24h, les losanges pleins, après 48h et les ronds vides après 72h [9].

vant un effet de l'inoculum sur la CMI ne poussent pas leurs expériences jusqu'à leur dénouement. Car un taux de division faible rallonge la phase de croissance des organismes et la phase stationnaire est atteinte beaucoup plus tard. Ainsi, avec initialement peu de cellules en présence d'antibiotique, la saturation est atteinte beaucoup plus tard que lorsqu'initialement est introduit une forte densité de cellules.

Cependant la CMI du couple antibiotique/bactérie révoquant sa dépendance à la taille de l'inoculum n'est pas déterminée, c'est étonnant car cela aurait pu étayer l'hypothèse du nul par une quantification. De plus d'autres études agrément sur le fait que l'inhibiteur est à l'origine d'un taux de croissance faible [40, 89, 93, 99]. Mais ces études démontrent que la CMI est dépendante de l'inoculum. Une étude en particulier montre par la figure 1.15 (p.28) que l'effet de l'inoculum sur la CMI existe après trois semaines de période d'incubation [89]. Et l'étude récusant l'hypothèse du nul, utilise l'acide sorbique comme inhibiteur. Cet acide est un conservateur (E200) antifongique travaillant de concert avec ses sels (les sorbates - E201 E202 E203). L'étude affirmant l'hypothèse du nul utilise également un agent de conservation alimentaire comme inhibiteur, l'acide acétique (E260) et

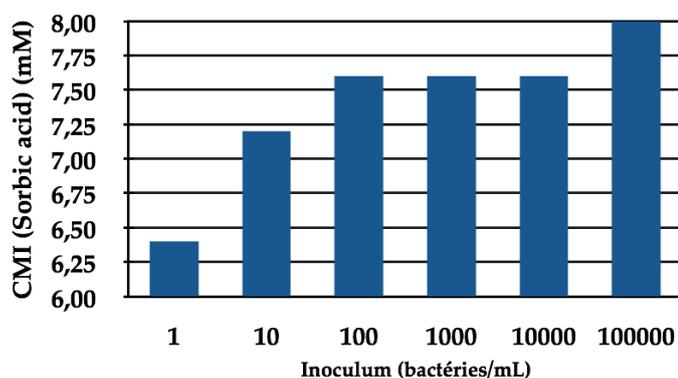


FIGURE 1.15 – Valeurs des CMI pour différents inoculum [89]. Résultats obtenus après trois semaines d'incubation.

plus particulièrement son sel, l'acétate de sodium (E262).

En réalité ces études utilisent les sels pour augmenter la pression osmotique du milieu. Le stress osmotique sur des organismes a pour effet d'inhiber leur croissance. Mais de nombreux organismes sont particulièrement bien dotés pour répondre à ce type d'inhibition et en particulier les souches *E.coli* utilisées pour soutenir l'hypothèse du nul [9]. L'adaptation des micro-organismes aux variations de pression osmotique du milieu environnant repose sur une accumulation de solutés compatibles dans le cytoplasme permettant leur croissance dans un milieu à forte concentration saline. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse ont été intensivement étudiés chez les entérobactéries dont fait partie *E.coli* [81]. Les levures sont plus sensibles au stress osmotique, ce qui amène à penser que les sels utilisés sur *Zygosaccharomyces* [89] sont plus efficace pour l'inhibition que sur *E.coli*. Et permet donc de mesurer une CMI dépendante de l'inoculum.

Ainsi les auteurs avançant l'hypothèse du nul [9] basent leur argumentation sur l'utilisation d'un couple biocide/bactérie, dont les bactéries sont connues pour s'adapter à l'environnement néfaste créé par le biocide. Il n'est pas étonnant de voir cet argument contredit par les résultats produit sous des conditions temporelles

1.3. L'effet de l'inoculum

similaires d'autres auteurs dont les organismes sont moins résistants à ce type de biocide [89]. Il existe donc peut-être des couples biocide(s)/organisme(s) qui ne montrent aucun effet lié à la taille de l'inoculum. Ce que nous apprend [9] c'est que pour valider une hypothèse, il faut mener à terme la croissance pour être certain de connaître le comportement des cellules en présence d'inhibiteur. Et les antibiotiques montrant une meilleure efficacité inhibitrice que les sels sont les composés à utiliser pour observer le comportement bactérien sous des conditions délétères.

En définitive, selon le nombre initial de bactéries, l'action d'antibiotique est subit différemment. L'accroissement de la densité cellulaire initiale augmente la valeur de la CMI d'un antibiotique [7, 65]. Cela signifie qu'il faut une dose minimale en antibiotique plus importante pour éliminer un plus grand nombre d'organismes. En d'autres termes, un groupe d'individus se défend mieux qu'un individu isolé face au stress antibiotique. C'est un comportement qui s'admet aisément. Il existe de nombreuses stratégies défensives permettant aux organismes de résister aux antibiotiques. Si elles sont dépendantes de la taille de la population, elles peuvent expliquer l'effet de l'inoculum sur la CMI.

1.3.1 Quorum-sensing

En premier lieu il est avéré que les bactéries communiquent les unes avec les autres par la production et la détection de signaux chimiques [21, 54, 30, 102]. Ce mode de communication est appelé quorum-sensing. Cela permet aux bactéries de surveiller l'environnement pour leur voisines afin de coordonner les comportements de coopération au niveau de la population. Les informations fournies par ces molécules sont cruciales pour la synchronisation des activités de grands groupes de cellules. A travers l'utilisation de la communication chimique, les bactéries peuvent réguler leur comportements relativement à la densité de la population [54]. En ce qui concerne les fortes densités de cellules, il est reconnu que le quorum-sensing active certains comportements, notamment l'amélioration de la résistance aux an-

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

tibiotiques [21].

Le processus de quorum-sensing est initié lorsque le milieu environnant les organismes atteint une concentration seuil en molécules de communication. Les cellules synthétisent ces composés chimiques nécessaires à la communication, ainsi la densité de cellules influence la quantité de ces molécules synthétisée. Le seuil est donc plus rapidement accessible pour de fortes densités d'organismes. C'est pourquoi le quorum-sensing est considéré comme improductif lorsqu'il est exercé par un individu agissant seul, et devient bénéfique lorsqu'il est effectué par un grand nombre de cellules.

De récents travaux démontrent par le confinement de cellules, que les organismes seuls sont capables d'initier le quorum-sensing [11]. Le confinement en goutte réduit le volume extracellulaire, mais n'influence pas la production de signaux chimiques, ce qui augmente la concentration produite par un faible nombre d'organismes et permet d'atteindre la concentration seuil, à l'échelle de la cellule unique, plus rapidement que lorsque l'expérimentation se déroule dans un puits. Car dans un puits le volume est beaucoup plus important (environ 10^4 fois plus) et cela dilue les composés chimiques produits. L'initiation du quorum-sensing reste tout de même très variable à cette échelle de population. La figure 1.16 (p.30) in-

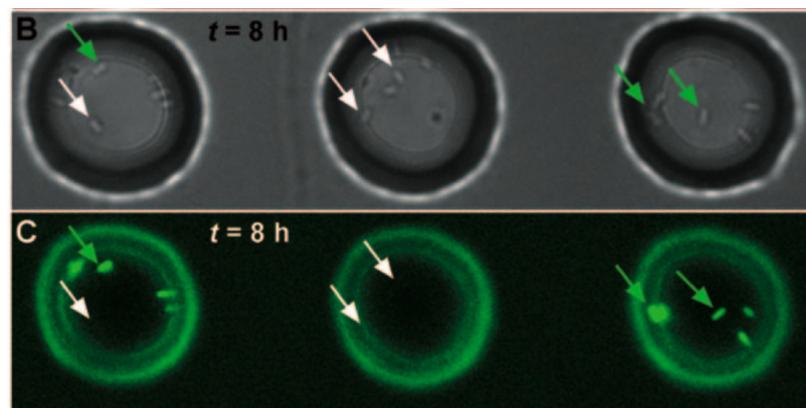


FIGURE 1.16 – Photographies sous lumière blanche (B) et par fluorescence (C) de trois gouttes adjacentes révélant la synthèse de molécules initiant le quorum-sensing [11].

1.3. L'effet de l'inoculum

dique par des flèches vertes les cellules initiant le quorum-sensing et par des flèches blanches celles qui sont inactives. La variabilité de l'expression de la communication chimique est un effet supplémentaire à l'improductivité du quorum-sensing à l'échelle de la cellule unique. Il est tout de même initié à cette échelle. Et, relativement au volume du milieu de culture, il faut pouvoir survivre à l'attaque des antibiotiques suffisamment longtemps pour pouvoir atteindre la concentration seuil.

En définitive, il est clairement défini que pour de fortes concentrations en organismes le quorum-sensing influence la résistance aux antibiotiques. La communication ne permet pas de résister aux antibiotiques, elle permet de coordonner l'action d'un groupe d'organismes. Si on imagine que les bactéries possèdent un mode de résistance, on peut envisager que le quorum-sensing coordonne la population bactérienne afin d'activer leur mode d'action de résistance aux anti-bactériens. Concernant les faibles densités de cellules, le quorum-sensing peut être initié si la concentration seuil en signaux chimiques est atteinte avant l'élimination. Ainsi, la résistance est plus ou moins efficace selon la densité d'organismes et selon la cinétique d'action d'un antibiotique. Quoiqu'il en soit, le quorum-sensing influence la résistance, donc peut faire varier la CMI selon la taille de l'inoculum.

1.3.2 Destruction du biocide

Les organismes ont différentes stratégies de défense contre l'attaque des antibiotiques (figure 1.17 p.32). Ils peuvent éjecter les antibiotiques ou bien synthétiser des enzymes capables d'effectuer différentes tâches. Les enzymes peuvent protéger la cible directement ou en synthétisant une cible non vulnérable. La défense des micro-organismes réside également dans leur capacité à attaquer les agents inhibiteurs. Ils sont effectivement capables de développer des mécanismes voués à la destruction des biocides. On peut donc supposer que plus les organismes se trouvent en nombre plus ils sont aptes à détruire les inhibiteurs. De ce fait si

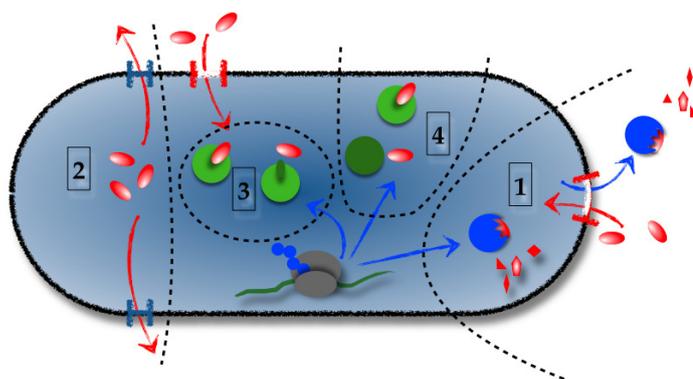


FIGURE 1.17 – Représentation des stratégies de défense d'un organisme. 1 : Destruction de l'antibiotique - 2 : Expulsion par les pompe Efflux - 3 : Protection de la cible - 4 : Substitution de la cible.

l'inoculum influence la destruction des biocides, il peut influencer par ce mode de défense la CMI d'un inhibiteur.

Tout d'abord une étude [89] propose d'incuber différents inoculum d'une levure en présence de la même concentration initiale en inhibiteur. Le dosage de l'acide sorbique après quatre semaines révèle la perte en inhibiteur (figure 1.18 p.32). Cette

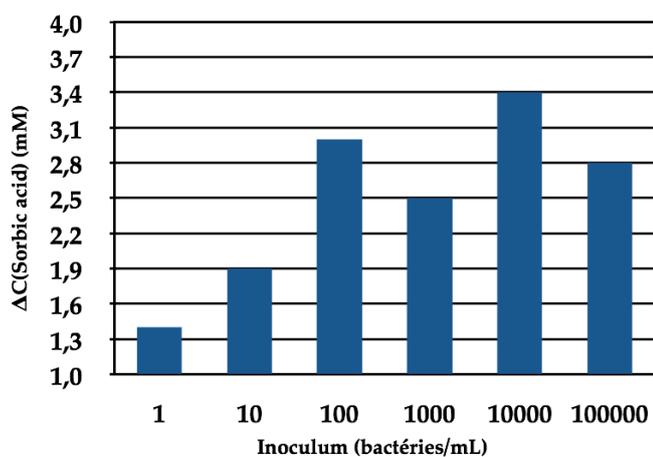


FIGURE 1.18 – Perte en inhibiteur après quatre semaines d'incubation. Report des valeurs de la table 1 de [89].

1.3. L'effet de l'inoculum

étude montre que plus l'inoculum est important, plus la perte en sel est élevée. Ainsi, il est démontré empiriquement qu'une forte densité initiale de cellules permet la destruction du biocide plus efficacement qu'un faible inoculum. La proportion de la perte en sel indique, en tout cas, que les cellules limitent le métabolisme du biocide, et cela relativement à leur nombre initial.

En ce qui concerne les traitements anti-bactériens, les bactéries sont aussi naturellement capables de se défendre en synthétisant, par exemple, des enzymes qui hydrolysent des antibiotiques [26, 78, 95]. Ces bactéries produisent comme enzyme la β -lactamase qui hydrolyse le cycle β -lactame suivant la figure 1.19 (p.33) désactivant ainsi la propriété antibiotique de la molécule.

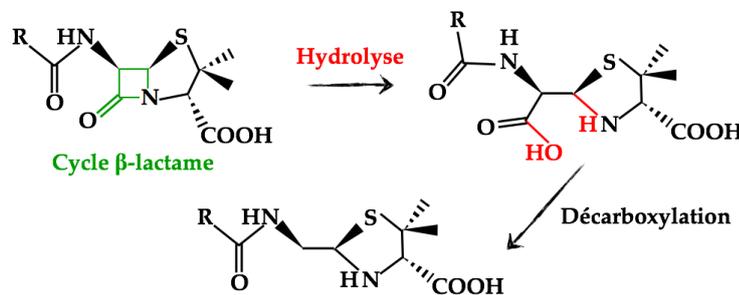


FIGURE 1.19 – Hydrolyse d'une molécule de pénicilline par des β -lactamases.

Les progrès techniques permettent d'élaborer des organismes mutants, auxquels il est donné la capacité de produire plus facilement de la β -lactamase, concevant ainsi des organismes très résistants aux antibiotiques β -lactames. Les mutations confèrent donc un haut degré de résistance des organismes aux biocides utilisés. Ainsi, ce type de souches résistantes contre un antibiotique sont des outils de mesure de l'effet de l'inoculum sur la CMI par l'hydrolyse des biocides (figure 1.20 p.34).

Tout d'abord les résultats (figure 1.20 p.34) démontrent l'effet de l'inoculum

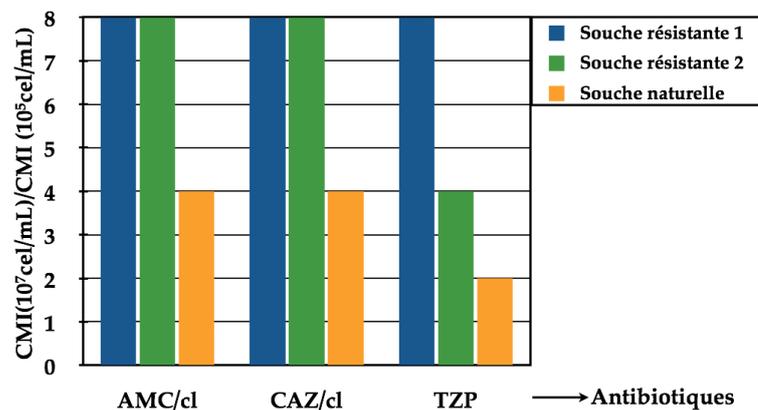


FIGURE 1.20 – Report des valeurs de table 2 et table 4 de [7]. Ratio des mesures de CMI de deux inoculums : $CMI_{10^7 \text{ cellules/mL}}/CMI_{10^5 \text{ cellules/mL}}$ en fonction de différents antibiotiques.

sur la CMI de différents antibiotiques. Effectivement, on a pour tous les cas :

$$CMI_{10^7 c/mL} > CMI_{10^5 c/mL}$$

Une forte densité initiale de cellules implique l'augmentation de la valeur de la CMI. Et la figure 1.20 (p.34) établit également que l'effet de l'inoculum sur la CMI est plus prononcé pour les organismes mutants que pour les cellules "naturelles" [7]. Ces résultats (figure 1.20 p.34) révèlent que :

$$\frac{CMI_{10^7 c/mL}^{\text{mutants}}}{CMI_{10^5 c/mL}^{\text{mutants}}} > 2 \cdot \frac{CMI_{10^7 c/mL}^{\text{naturels}}}{CMI_{10^5 c/mL}^{\text{naturels}}}$$

Ainsi l'effet de l'inoculum sur la CMI peut être attribué à l'hydrolyse des antibiotiques. En effet, si l'hydrolyse n'avait pas d'impact, on peut supposer que le seul effet des mutations serait d'augmenter la résistance des organismes et donc les

1.3. L'effet de l'inoculum

valeurs des CMI pour chaque inoculum, mais pas le ratio. On aurait donc :

$$\frac{CMI_{10^7 c/mL}^{mutants}}{CMI_{10^5 c/mL}^{mutants}} \simeq \frac{CMI_{10^7 c/mL}^{naturels}}{CMI_{10^5 c/mL}^{naturels}}$$

Même si l'effet de l'inoculum est observé pour tous les antibiotiques β -lactames testé, il existe un effet de classe des β -lactames [93]. Cela signifie que certains antibiotiques sont moins efficaces que d'autres car plus faciles à hydrolyser. Donc l'effet de l'inoculum par hydrolyse est un mécanisme complexe combinant la capacité des micro-organismes à libérer une enzyme [26] à la force de l'antibiotique.

Les analyses des données montrent que l'hydrolyse du biocide dépend fortement de la taille de l'inoculum, et de ce fait, influence la valeur de la CMI, car plus il y a de cellules en volume, plus l'hydrolyse sera importante. Les organismes mutants aident à amplifier ce mécanisme de résistance mais les organismes naturels possèdent également la capacité de se défendre par hydrolyse. Ainsi ce mode de défense des organismes peut expliquer la relation de dépendance entre la CMI et la densité initiale de cellules.

1.3.3 Variabilité phénotypique

L'exposition d'une population homogène à un traitement antibiotique fort est sensé éliminer la souche bactérienne soumise au stress. Pourtant il existe fréquemment une sous-fraction d'organismes résistants présents au sein d'une population. De cette manière, une souche bactérienne peut survivre à de fortes contraintes, tel qu'un traitement antibiotique. Ces organismes très résistants sont à l'origine du développement d'une population en présence après traitement antibiotique(s) [38]. Contrairement à des mutants résistants aux inhibiteurs, une grande partie de ces cellules restent sensibles à un traitement antibiotique après ré-incubation. Ce phénomène est appelé persistance [4, 69, 62] et est démontré dans la figure 1.21 (p.36). Des bactéries se développent dans un premier temps en milieu de culture. Après

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

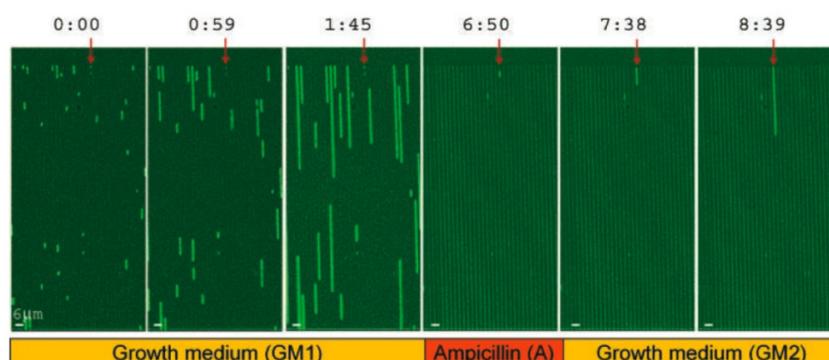


FIGURE 1.21 – Démonstration du phénomène de persistance [4] par une expérience d'élimination d'*E. coli* par l'ampicilline.

un certain temps d'incubation (6h50) elle sont soumise à un traitement antibiotique. Le biocide élimine pratiquement tous les micro-organismes, seules quelques bactéries survivent. On note d'ailleurs que pendant le phase de croissance de la majeure partie de la population, ces souches résistantes ne se développent pratiquement pas. L'analyse de l'histoire des survivantes révèle qu'elles ont un taux de croissance très faible par rapport aux taux de croissance de cellules "normales" [4, 69, 62]. Elles se développent normalement lorsqu'elles sont nourries à nouveau.

La persistance est donc liée à la pré-existence d'hétérogénéité au sein d'une population bactérienne. Ces bactéries n'acquièrent pas génétiquement une résistance à l'antibiotique, contrairement aux mutants. Elles se trouvent dans un état de dormance. Ce qui s'oppose, encore une fois, aux cellules résistantes mutantes, qui se développent même sous stress antibiotique (figure 1.22 p.37). L'état de dormance, est un état quasi-stationnaire développé par les micro-organismes comme garantie de survie de l'espèce en cas de soumission à un stress [62].

Les cellules persistantes sont continuellement générée pendant le développement cellulaire (figure 1.23 p.37). Ce phénomène peut expliquer l'effet de l'inoculum sur la CMI car le "stockage" d'assurances-survie se fait en coordination avec la croissance. La croissance étant un phénomène exponentiel, la part de cellules

1.3. L'effet de l'inoculum

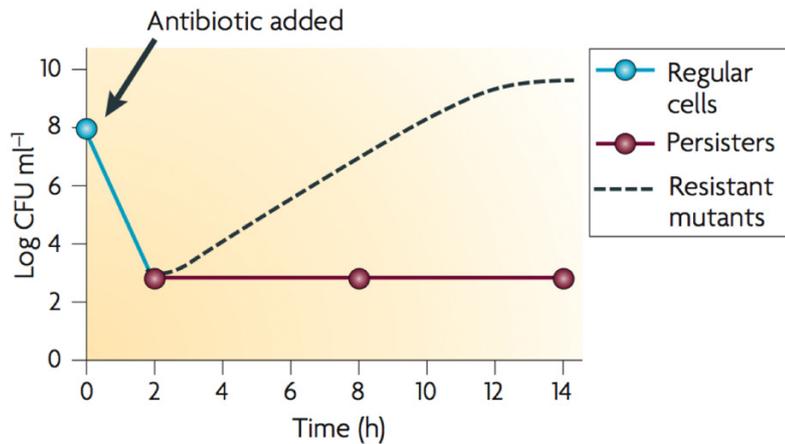


FIGURE 1.22 – Comparaison des différents comportements d'organismes "normaux" (regular cells), persistants (persisters) et mutants résistants lors d'une désinfection antibiotique [69].

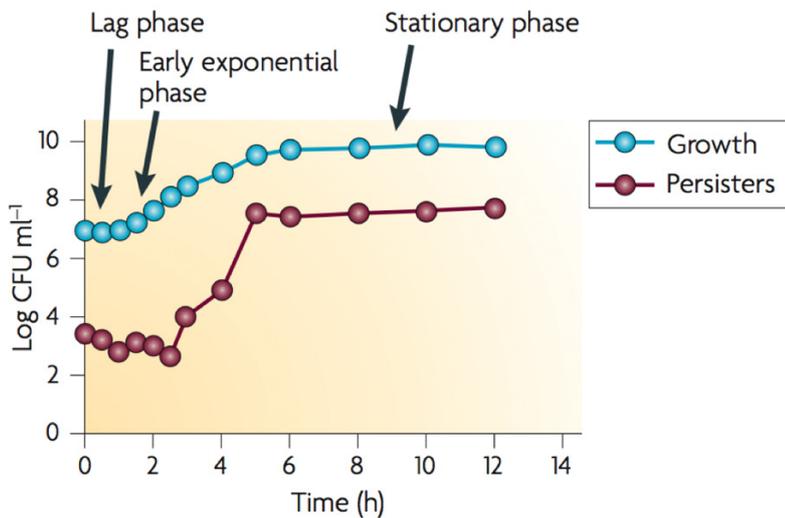


FIGURE 1.23 – "Stockage" de cellules persistantes pendant la croissance [69].

persistantes augmente de façon drastique en parallèle à la croissance de toute la population.

Ainsi les organismes persistants se développent tout au long de la croissance comme garantie de survie d'une population. Un inoculum étudié contient d'autant

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

moins de cellules persistantes qu'il est dilué. De cette façon la disparité initiale du nombre de persistants contribue à l'effet de l'augmentation de la CMI avec l'augmentation de la taille de l'inoculum.

1.3.4 L'altruisme bactérien

Lorsqu'un traitement antibiotique est inefficace sur une colonie on peut s'attendre à ce que les souches initialement résistantes survivent et constituent à terme majoritairement la colonie, alors que les autres souches plus faibles disparaissent. Les travaux effectués révèlent qu'en l'occurrence les souches résistantes ne profitent pas de la vulnérabilité des autres souches pour investir le milieu de culture [66]. En réalité, ces organismes résistants sécrètent de fortes quantités d'une molécule nommée indole, au dépend du bon déroulement de leur développement. Cette molécule, induisant la détoxification des cellules, est sécrétée afin d'aider la tolérance des organismes faibles aux stress.

Une population d'*E.coli* en l'absence de stress prospère et sécrète naturellement l'indole (figure 1.24.a p.39). Puis sous des conditions de stress antibiotique sévère les organismes morts ou sur le déclin ne produisent plus l'indole en quantité suffisante (figure 1.24.b p.39). La présence d'un organisme mutant résistant à l'antibiotique est capable de maintenir sa production d'indoles, permettant la résistance des organismes plus faibles à l'action de l'antibiotiques (figure 1.24.c p.39). Ce mécanisme n'est pas propre à un seul antibiotique.

Cette action démontre un mécanisme communautaire au dépend même des molécules assez fortes pour survivre. Ceci établit une forme de sélection de parentèle, théorie expliquant comment les comportements altruistes chez les animaux et micro-organismes favorisent le sacrifice de quelques uns pour la survie du groupe.

Par ailleurs, lors de ces expériences, il est exposé le fait que la CMI des individus ne permet pas de prédire la CMI du groupe (figure 1.25 p.39). En effet, au cours du temps, les mutants confèrent au groupe la possibilité de résister à des doses

1.3. L'effet de l'inoculum

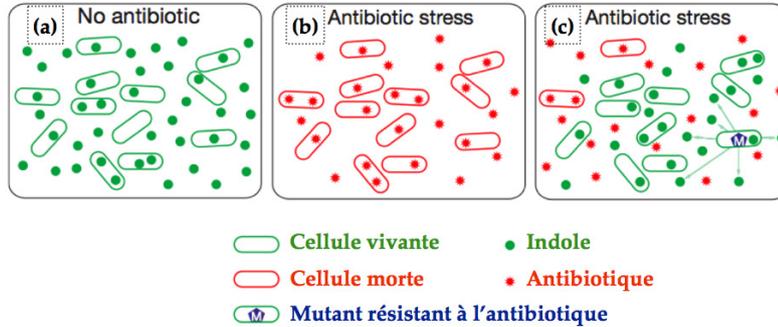


FIGURE 1.24 – Principes du mécanisme d'aide à la résistance [66].

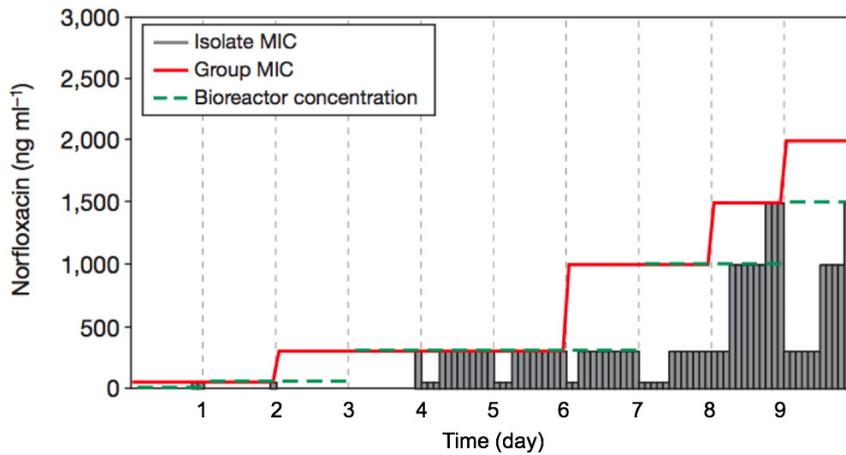


FIGURE 1.25 – Evaluation des CMI de groupes et d'individus au cours du temps [66].

croissantes d'antibiotiques. Et individuellement la majorité de la population est incapable de résister à ces doses d'antibiotiques. Par exemple, au bout du troisième jour, la CMI du groupe est autour de 250 ng/mL , alors qu'elle peine à atteindre 50 ng/mL pour les individus isolés.

Ce qui amène à conclure que l'effet de parentèle est également un facteur à l'origine de l'effet de l'inoculum sur la CMI. Car les individus altruistes sont en plus grande proportion dans des larges inoculums que dans les faibles. Donc un plus grand nombre d'individus est apte à aider ses congénères ce qui a pour effet probable d'augmenter la CMI avec la taille de l'inoculum.

1.3.5 Le biofilm protecteur

Un biofilm est une population de cellules poussant sur une surface et enfermée dans une matrice exopolymère extracellulaire [68, 69, 90] (figure 1.26 p.40). Au sein d'un biofilm les organismes poussent en amas [59]. La résistance aux biocides se distingue par des biofilms, qui sont la cause majeure d'infections. Ils sont certainement responsable de 65% de toutes les infections bactériennes recensées [13, 69]. Les bactéries au sein d'un biofilm sont très bien protégées des contraintes exté-

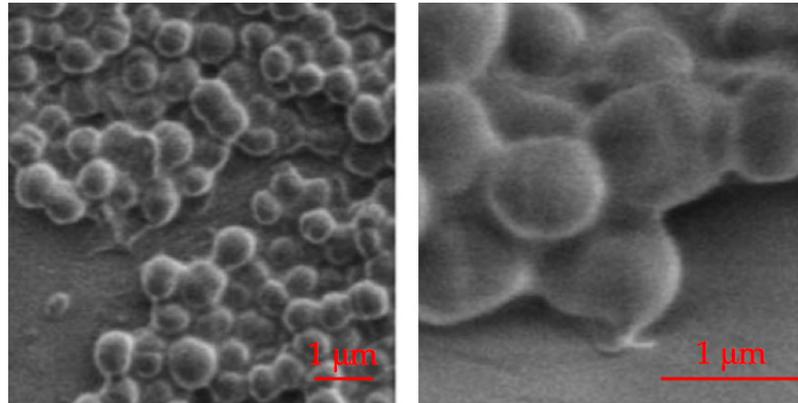


FIGURE 1.26 – Photographies MEB de biofilms de *S. epidermidis* à différentes échelles [67].

rieures. D'ailleurs c'est la fonction de base de la couche protectrice. La formation d'un biofilm résulte d'une organisation défensive en présence d'antibiotique [47]. Des tests ont démontré que les bactéries au sein d'un biofilm survivaient à une exposition en antibiotique de concentration de cent à mille fois la CMI des mêmes bactéries en suspension [90]. De plus, même soumis à un fort cisaillement ces biofilms sont capables de se développer sur des surfaces (figure 1.27 p.41). S'ajoute à cela le fait que les cellules libérées d'un biofilm vers le milieu de croissance sont considérablement plus résistantes que des cellules en suspension, mais deviennent néanmoins moins robustes que celles présentes dans le biofilm [13]. Tout ceci démontre le potentiel de protection des biofilms. Les raisons du fort potentiel à la résistance impliquent différents phénomènes combinés. Tout d'abord la "pénétra-

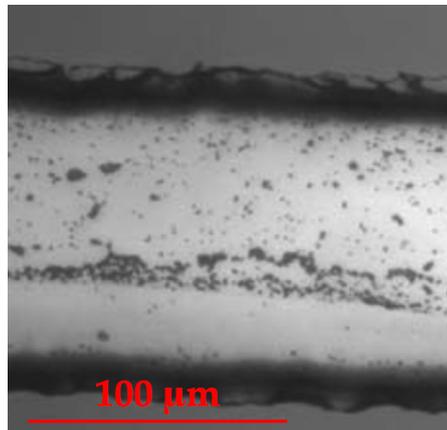


FIGURE 1.27 – Biofilms de *S. epidermidis* soumis à d'importants cisaillements [67].

bilité" de la couche polymère. Les biofilms sont formés d'une matrice qui peut limiter la diffusion de substances à travers elle, et de surcroît cette matrice est capable d'adsorber les antibiotiques. Mais la physico-chimie de cette matrice n'est qu'un premier rempart à franchir pour éliminer les bactéries. En effet associé à cette barrière efficace, les études révèlent d'autres obstacles rendant la désinfection difficile :

- Le quorum-sensing. Il est requis pour la formation de la matrice [13] et pour la coordination de la défense de la population.
- La destruction des antibiotiques par les bactéries. Elle est d'autant plus efficace avec la diffusion retardée des biocides à travers la membrane [13].
- La persistance. Les biofilms produisent plus de cellules persistantes que les organismes en suspension [47, 68, 69].

Ces phénomènes multiples combinés à la physico-chimie d'une membrane favorable à la défense, permettent de définir les biofilms comme facteurs de résistance aux antibiotiques. La taille de l'inoculum influence la densité des biofilms et peut avoir, de ce fait, une influence sur le comportement de la dépendance à la CMI.

1.3.6 Dépendance entre la CMI et l'inoculum

Il est reconnu que la taille de l'inoculum influence la CMI d'un antibiotique. Cette concentration est la définition un sous-dosage dont l'origine réside dans la capacité des organismes à élaborer des stratégies défensives. Tous ces comportements de défense envers les antibiotiques sont tributaires de la taille de l'inoculum sujet au stress.

D'autres examens permettent de décrire le comportement de dépendance entre l'inoculum et la CMI. En premier lieu, la description de l'augmentation de la valeur de la CMI rapporte qu'elle se fait de façon brutale lorsque la taille de l'inoculum augmente [99]. On observe sur la figure 1.28 (p.42) que l'augmentation de la CMI

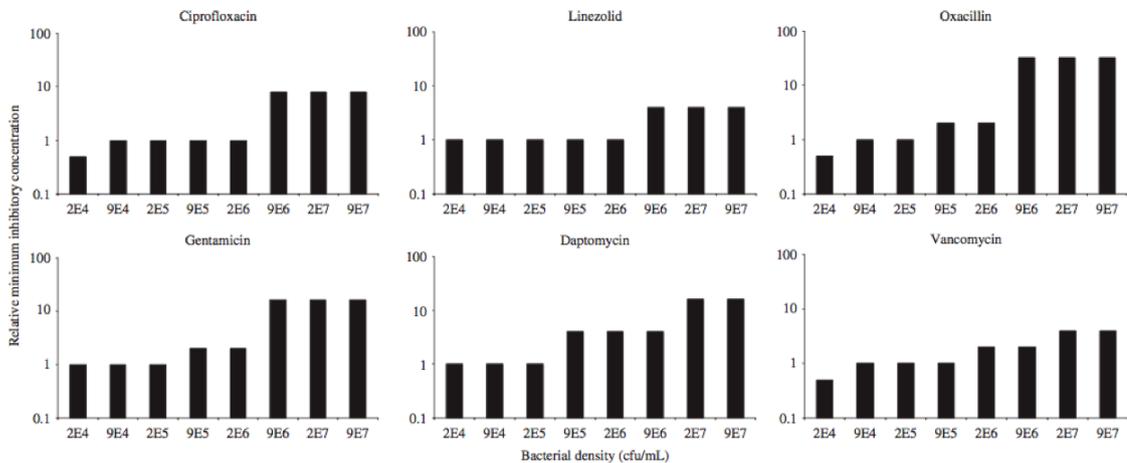


FIGURE 1.28 – Valeurs de CMI en fonction de l'inoculum pour différents antibiotiques [99].

en fonction de la taille de l'inoculum ne se fait pas de façon continue mais par palier (également observable figure 1.15 p.28). L'origine d'une telle réponse réside dans les techniques couramment employées, qui limitent la quantification précise d'une CMI par la résolution en concentration en antibiotique. La détermination de la CMI par ce type d'expérimentation laisse supposer qu'elle n'est pas forcément égale à la concentration en antibiotique réelle qui inhibe les organismes. Mais

qu'elle donne un ordre de grandeur.

Une méthode d'estimation précise de la CMI permet d'évaluer exactement l'influence de la densité de cellules initialement présentes. L'étude de la dynamique de croissance sous antibiotique et la modélisation des résultats par une courbe tendance permet d'estimer numériquement la CMI [64]. Cette méthode s'affranchit des faibles résolutions des instruments et permet de déterminer précisément la CMI. La dépendance de la taille de l'inoculum en fonction de la CMI est donc déterminée empiriquement. Et la discontinuité est infirmé par l'observation de l'action d'un antibiotique sur un organisme [63]. On constate que dans ce cas (figure 1.29 p.43) que la relation entre la taille de l'inoculum et la CMI est continue. Elle

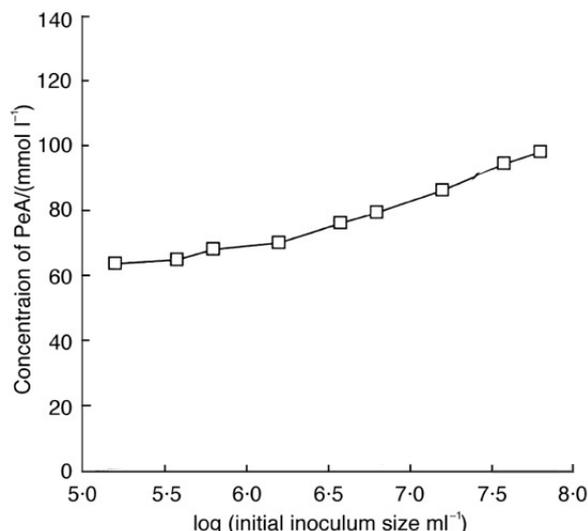


FIGURE 1.29 – Comportement de la CMI par l'alcool phenethyl (PeA) en fonction de la taille de l'inoculum de *Staph. aureus* [63].

semble même linéaire, par une relation logarithmique de la CMI en fonction de l'inoculum, n_i :

$$CMI \propto \log(n_i)$$

Spontanément on pourrait supposer que la dépendance entre la CMI et la den-

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

sité d'organismes se fait de manière linéaire : pour tuer dix fois plus d'organismes il faut dix fois plus d'antibiotiques. Mais ce n'est pas le cas, la modélisation des méthodes classiques de mesure permettent d'estimer une relation logarithmique entre la CMI et la taille de l'inoculum. Et ce comportement peut expliquer pourquoi la CMI est parfois décrite comme indépendante de l'inoculum. En représentant la

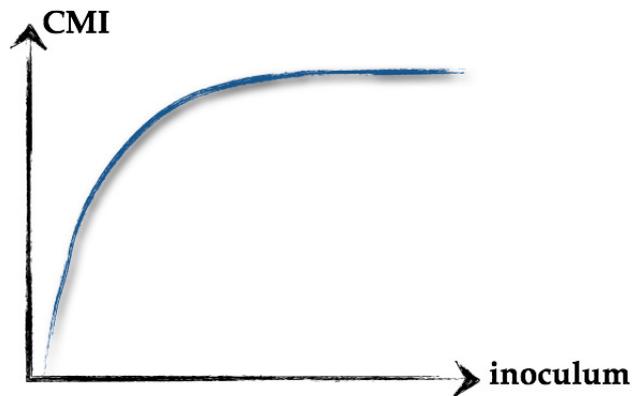


FIGURE 1.30 – Représentation de la dépendance de la CMI en fonction de l'inoculum.

CMI en fonction de l'inoculum par la relation logarithmique, on note la saturation de la CMI aux densités de population élevées (figure 1.30 p.44). Cette "saturation" explique pourquoi l'influence de l'inoculum sur la CMI est controversé. La plupart des études se faisant à hautes densités cellulaires, elles se trouvent certainement dans le plateau de la dépendance de la CMI en fonction de l'inoculum.

Conclusion

Sans contraintes, les micro-organismes commencent leur développement après s'être adaptés à leur nouveau milieu. La croissance est réalisée par division cellulaire à intervalle constant. Après épuisement des ressources nutritives la croissance s'arrête et les organismes se trouvent dans un état stationnaire. Ce modèle théorique de la croissance est perturbé dès l'application d'une contrainte extracellulaire.

Les antibiotiques ont un effet plus que perturbateur de la croissance. Ils sont capables de l'inhiber, ou de l'annihiler. Cette propriété des antibiotiques a ouvert un champ d'investigation : les études pharmacodynamiques. Elles testent *in vitro* l'action des antibiotiques dans le but de concevoir des traitements curatifs contre des agents pathogènes. Les micro-organismes sont testés afin de connaître leurs propriétés défensives et les limites de ces défenses. La CMI est le premier paramètre permettant de définir l'efficacité *in vitro* d'un antibiotique. Elle définit la concentration nécessaire et suffisante traitant une infection bactérienne. Cependant, les méthodes existantes la mesurant sont très faiblement résolues.

Cependant, les travaux réalisés découvrent, pour la plupart, que la valeur de la CMI d'un antibiotique agissant sur une population bactérienne dépend de la taille initiale de cette population. Ils révèlent tous que l'action du biocide réduit le taux de croissance des organismes. Il faut noter que les méthodes de mesures employées ne révèlent pas forcément un effet considérable liant la taille de l'inoculum et la CMI.

La dépendance de la CMI à la taille de l'inoculum est due à trois phénomènes :

- La destruction des antibiotiques par les organismes.
- La persistance des organismes.
- La sélection de parentèle des organismes.

Ils sont suppléés par la formation de biofilms "super-protecteurs", le tout coordonné par la communication inter-cellules : le quorum-sensing. Tous ces facteurs

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques

sont à l'origine du comportement de dépendance observé. En effet, toutes ces actions, souvent considérées agissant au mieux par couple, semblent être déclenchées par les organismes pour survivre à l'éradication. En premier lieu le quorum-sensing permettant la coordination des actions, notamment la formation de la matrice exopolymère, à l'intérieure de laquelle les organismes sont bien protégés. Puis la synthèse chimique détruisant les antibiotiques, ainsi que sur le stockage de cellules persistantes assurant la pérennité de la population. Sans oublier les cellules altruistes, qui actionnent la production de composé chimique permettant la défense communautaire.

Quoiqu'il en soit, ces modes de défenses sont considérés comme étant tous influencés par la densité de micro-organismes. De ce fait la combinaison de tous influence la concentration en biocide nécessaire à l'élimination d'une infection bactérienne. L'importance thérapeutique et industrielle de la quantité nécessaire et suffisante d'un biocide pour éliminer une infection, contribue à étudier la façon dont la CMI et la taille de l'inoculum dépendent l'un de l'autre. Le fait de pouvoir connaître cette dépendance éviterait lors de la médication le sur-dosage d'antibiotiques. Et ainsi pourrait limiter l'émergence de bactéries "super-résistantes".

Les premières analyses révèlent que la CMI ne dépend pas linéairement de la taille de l'inoculum. L'étude de la corrélation entre la CMI et la taille de l'inoculum semble être difficile à mettre en place par les méthodes de détermination de la CMI existantes. En effet, les méthodes sont toutes fastidieuses à mettre en place. Celles par diffusion, et en particulier les antibiogrammes, se révèlent être très peu précises. Les méthodes par dilution s'avèrent plus adaptées, hormis les dilutions dans un gel d'Agar, cette dernière est la plus fastidieuse et la moins précise de toutes les méthodes.

Ces considérations permettent de définir le cadre dans lequel s'inscrivent les travaux développés durant cette thèse. La tâche consistera à étudier l'effet de

1.3. L'effet de l'inoculum

l'inoculum sur la CMI, en commençant par l'élaboration d'un nouvel outil de mesure de la CMI d'un antibiotique sur un organismes.

Chapitre 1. Comportement bactérien en présence d'antibiotiques