ACTES DE LA 24^E JOURNÉE DES SCIENCES ET SAVOIRS

ACFAS-Sudbury présente
Recherche et communauté...

24^{ème} journée des
Sciences et Savoirs
Vendredi 07 avril 2017
8 h 30 à 17 h 30
Pavillon Alphonse Raymond
Université Laurentienne

Conférencier principal invité :
Professeur Simon Laflamme
Département de sociologie, Université Laurentienne, Sudbury, Canada

Recherche et communauté: quelles relations ?

Vendredi 07 avril 2017
12 h 00 à 13 h 00
Auditorium Alphonse Raymond
Université Laurentienne

Prix des doyens pour les meilleures communications
orales étudiantes

Bourse ACFAS

Bourse CNFS en recherche

Renseignements :
acfas-sudbury@laurentienne.ca
<http://www.acfas-sudbury.ca>

Soutien logistique et financier : Bureau des affaires francophones (BAF), Dcéanata, Université Laurentienne, ACFAS-National, Montréal.

Sous la direction de
Renée Corbeil, Amélie Hien
et Yvon Gauthier

Table des matières

Recherche et communauté : quelles relations ? Conférence principale	3
<i>Simon Laflamme</i>	
Morphosyntaxe et sémantique de quelques locutions contenant le mot « tête » dans les canadianismes.....	19
<i>Valérie Gauthier, Amélie Hien et Ali Reguigui</i>	
Évaluation de l'activité antimicrobienne du Phénylalanine-arginine β -naphthylamide en combinaison avec des aminoglycosides et des macrolides sur des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées de patients atteints de la Fibrose kystique	41
<i>Douweh Leyla Gbian et Abdelwahab Omri</i>	
Pour une mesure des échanges interactifs et langagiers éducatrices-enfants en services de garde éducatifs.....	57
<i>Léanne Génier-Bédard</i>	
Analyse de contenu d'un programme d'intervention en français visant le développement de la conscience phonologique : une étude pilote.....	72
<i>Marika Robillard et Pascal Lefebvre</i>	

Évaluation de l'activité antimicrobienne du Phénylalanine-arginine β -naphthylamide en combinaison avec des aminoglycosides et des macrolides sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients atteints de la Fibrose kystique

Douweh Leyla Gbian et Abdelwahab Omri
Département de chimie et de biochimie
Université Laurentienne

Introduction

Les infections pulmonaires chroniques causées par *P. aeruginosa* représentent les principales causes de décès chez les patients atteints de Fibrose kystique (FK) (Rukholm et collab., 2006, p. 247). Un des principaux problèmes relatifs au traitement de ces infections est l'utilisation de plusieurs mécanismes par la bactérie pour résister aux antibiotiques (Rice, 2006). Cette résistance est principalement due à la faible perméabilité de la membrane externe de la bactérie et à son génome hautement adaptable (Nikaido, 1998 ; Pu, Ke et Bai, 2017 ; Qin, 2016 ; Vaara, 1992).

L'expression élevée de diverses pompes à efflux et la production d'enzymes inhibant les antibiotiques sont également des facteurs majeurs contribuant à la résistance aux antibiotiques chez cette bactérie (Li et collab., 2016, p. 37). Les pompes à efflux sont des systèmes cellulaires trouvés chez les bactéries Gram-positif et Gram-négatif et qui sont impliqués dans l'exportation d'antibiotiques, de colorants ou de solvants organiques vers l'extérieur de la cellule bactérienne (Chatterjee et collab., 2016, p. 50). Les pompes à efflux multi-drogue de la famille RND (*Resistance-nodulation-cell division*) jouent un rôle crucial dans la résistance aux antibiotiques de diverses bactéries (Cortez-Cordova et Kumar, 2011). En exportant continuellement les antibiotiques à l'extérieur des cellules, les pompes à efflux réduisent les concentrations intracellulaires de médicaments à des niveaux qui ne sont plus cytotoxiques (Willers et collab., 2017). L'augmentation de l'expression de ces pompes peut élever les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques à des niveaux impressionnants (Pu, Ke et Bai, 2017). Les principales pompes RND de *P. aeruginosa* sont MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OprM. Ces pompes ont différents substrats et elles semblent toutes régulées par les produits des gènes régulateurs des bactéries (De Kievit et collab., 2001). La régulation de la pompe MexXY-OprM est fréquente dans les souches cliniques de bactéries retrouvées chez les patients atteints de FK et a été liée à une résistance

accrue aux aminoglycosides (Lomovskaya et Watkins, 2001). Cette pompe multi-spécifique protège contre un large éventail d'antibiotiques, y compris les céphalosporines, les macrolides (érythromycine), les fluoroquinolones et les tétracyclines (Guénard et collab., 2014). Il a été également constaté que l'inactivation de la pompe MexAB-OprM rend *P. aeruginosa* plus sensible aux β -lactames, aux tétracyclines et aux macrolides (Nikaido, 1996). Compte tenu du fait que la majorité des agents pathogènes résistants aux antibiotiques expriment des pompes à efflux responsables de l'extrusion d'antibiotiques des cellules, des inhibiteurs de pompes à efflux (EPI) ont été développés pour potentialiser l'activité des antibiotiques (Askoura et collab., 2011). L'utilisation d'EPI avec des antibiotiques a été démontrée efficace pour abaisser la CMI d'antibiotiques contre les bactéries (Fankam, Kuate et Kuete, 2014 ; Fankam, Kuate et Kuete, 2015 ; Gholami et collab., 2015 ; Talebi-Taher et collab., 2016) et peut potentiellement restaurer l'activité des agents antimicrobiens contre des souches bactériennes résistantes (Willers et collab., 2017 ; Hirakata et collab., 2009). L'un des EPI les plus étudiés est le Phénylalanine arginine- β - naphthylamide (PABN), un composé peptidomimétique. Ce composé inhibe les pompes à efflux à travers un mécanisme d'inhibition compétitif en se liant à la poche hydrophobe de la pompe, entravant ainsi la liaison simultanée d'un autre substrat. Il est ensuite pompé par le groupe AcrB/MexB des pompes, permettant ainsi aux antibiotiques de rester à l'intérieur de la cellule et d'atteindre les niveaux toxiques nécessaires pour tuer le pathogène (Kinana et collab., 2016).

L'objectif de notre recherche était d'étudier les effets du Phénylalanine-arginine β -naphthylamide (PABN), seul ou en association avec des aminoglycosides et des macrolides sur des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de Fibrose kystique (FK). Pour cela, nous avons comparé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) obtenues en milieu liquide (bouillon de Mueller-Hinton) du PABN, seul ou en association avec des antibiotiques. Même si PABN est un inhibiteur de la pompe à efflux hautement efficace *in-vitro*, son niveau élevé d'accumulation dans les organes, en particulier les reins, peut-être toxique (Watkins et collab., 2003, p. 4242). Étant donné que les aminoglycosides sont des substrats de pompes à efflux, l'inhibition de l'efflux devrait augmenter la puissance de ces médicaments contre *P. aeruginosa*. Nous avons constaté que PABN a augmenté l'activité des aminoglycosides et macrolides contre *P. aeruginosa*. Cependant, il n'a eu aucun effet sur la souche K2733, qui ne comportait aucune des quatre principales pompes retrouvées chez *P. aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OprM). En outre, les bactéries traitées avec le PABN ont été plus sensibles à l'érythromycine, un antibiotique auquel *P. aeruginosa* est intrinsèquement résistante (Morita, Tomida et Kawamura, 2013).

Méthodologie

Réactifs chimiques et antibiotiques

La gentamicine et l'érythromycine ont été obtenus auprès de Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Le Phénylalanine-Arginine- β -Naphthylamide (PABN) a été acheté chez Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada) et le bouillon Mueller-Hinton (MH) a été obtenu chez Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, États-Unis).

Espèces bactériennes

Pour cette étude neuf isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisés. Il s'agit de PA 01, PA 1, PA 3, PA 5, PA 7, PA 8, PA 11, PA 48912-1 et K 2733. La souche PA 01 a été généreusement donnée par le Dr R.E.W Hancock (Université de la Colombie-Britannique). PA 3, PA 5, PA 7, PA 8 et PA 11 ont été fournis par PML Microbiologicals (Mississauga, ON, Canada). PA 48912-1 a été isolée des expectorations de patients atteints d'infections pulmonaires à l'hôpital Memorial (Sudbury, ON, Canada). La souche K 2733 déficiente en pompe à efflux, utilisée comme souche de référence, a été fournie généreusement par le Dr Keith Poole (Queen's University). Les bactéries ont été cultivées dans du bouillon MH et ont été gardées à -80 °C dans du bouillon MH contenant du glycérol à une concentration de 10% (v/v) jusqu'à utilisation.

Test de sensibilité aux antibiotiques

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été déterminés par une technique de micro dilution au bouillon, tel que recommandé par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016). Un millilitre de culture bactérienne a été cultivé dans 25 mL de bouillon de MH et a été incubé dans un incubateur Innova 4000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) pendant dix-huit heures à une vitesse de 200 tour/min à 37 °C. Après la période d'incubation, la bactérie a été placée dans une centrifugeuse Multi RF (Thermo Electron Corporation) à 4 °C, 12 000 tour/min pendant vingt minutes. Le surnageant a été jeté et le culot a été remis en suspension dans 5 mL de bouillon frais. Pour les bactéries traitées avec PABN, un échantillon de 100 μ L a été cultivé avec 5 mL de bouillon Mueller-Hinton contenant du PABN à des concentrations de 10, 25 ou 50 mg/L et les échantillons ont été incubés dans un Innova 4000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) à 37 °C, 200 tours/min pendant dix-huit heures. Les cultures ont été standardisées à un standard de 0,5 McFarland. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations bactéricides minimales (CMB) ont été déterminées respectivement comme la concentration minimale d'antibiotiques nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne et la

concentration minimale d'antibiotiques nécessaire pour tuer les bactéries. Toutes les CMI et les CMB ont été déterminées en triplicata.

Études de synergie

Le tableau de damier a été utilisé pour déterminer l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FIC) afin d'étudier les effets de différentes combinaisons d'antibiotiques. Les combinaisons testées étaient la gentamicine avec l'érythromycine et la gentamicine, l'érythromycine avec PABN (utilisé à une concentration fixe de 10 mg/L). Les valeurs modales des CMI ont été utilisées pour déterminer les concentrations de chaque antibiotique pour le test. La concentration de départ de chaque antibiotique en combinaison était deux fois la CMI préalablement déterminée. Pour évaluer les effets des combinaisons, le FIC a été calculé en utilisant l'équation: $FIC_I = FIC_A + FIC_B = (\frac{C_A}{CMI_A}) + (\frac{C_B}{CMI_B})$. Où C_A et C_B représentent respectivement la concentration de gentamicine et d'érythromycine dans la cuvette, CMI_A et CMI_B représentent la CMI des deux antibiotiques seuls. Nous avons déterminé l'indice FIC comme étant le plus petit pour chaque combinaison. La synergie a été indiquée si $FIC_i \leq 0,5$; Il y avait antagonisme si $FIC_i > 4$ et enfin il y avait indifférence si $0,5 < FIC_i < 4$.

Étude cinétique

Une étude cinétique a été effectuée afin de déterminer si l'effet des antibiotiques seul ou en combinaison dans le temps était bactériostatique ou bactéricide. Les combinaisons testées étaient la gentamicine avec l'érythromycine (GEN + ERY) et la gentamicine, l'érythromycine avec une concentration fixe de 10 mg/L de PABN (GEN + ERY + PABN). Parce que la gentamicine était l'agent le plus actif dans cette étude, nous avons également effectué une étude avec la gentamicine seule et la gentamicine avec 10mg/L de PABN (GEN + PABN). Les bactéries ont été inoculées à 6 et 8 unités de formation de colonies logarithmiques (CFU)/mL dans le bouillon de MH et ont été cultivées pendant 24 heures à 37 °C, 200 tours/min dans un Innova 4000 en l'absence ou présence d'antibiotiques à FIC 1X, FIC 2X et FIC 4X de gentamicine et d'érythromycine (comme spécifié dans les légendes des figures). Pour les échantillons contenant uniquement de la gentamicine, les concentrations étaient de 2, 4 et 8 mg/L. Les contrôles ont été préparés sans antibiotiques. À plusieurs moments (0, 2, 4, 6 et 24 heures), des échantillons de bactéries ont été prélevés, dilués en série et placés sur des plaques d'agar MH pour la détermination du nombre de colonies après dix-huit heures. Le Log CFU/mL a été tracé en fonction du temps afin d'obtenir les courbes de l'étude cinétique. Toutes les expériences ont été effectuées trois fois à différentes occasions.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 7.0). Un test ANOVA à sens unique a été utilisé pour l'étude cinétique. Une valeur P de 0,05 a été considérée comme significative.

Résultats

PABN a augmenté les susceptibilités bactériennes à la gentamicine et à l'érythromycine

Pour déterminer si PABN a potentialisé l'activité de la gentamicine et de l'érythromycine, les activités antimicrobiennes des deux antibiotiques ont été déterminées avec et sans PABN, contre huit souches cliniques de *P. aeruginosa* et dans K 2733, une souche dépourvue des quatre principales pompes à efflux retrouvées dans *P. aeruginosa* (Tableau 1). Les valeurs les plus faibles de CMI de gentamicine et d'érythromycine ont été observées dans la souche de contrôle, K 2733 et étaient respectivement de 4 mg/L et de 16 mg/L (Tableau 1). La CMI des deux antibiotiques dans la souche contrôle est restée la même après le traitement avec PABN, ce qui suggère que les pompes à efflux augmentent considérablement la résistance des bactéries.

Toutes les 8 souches cliniques avaient des CMI supérieures à 16 mg/L pour la gentamicine en l'absence de PABN. La valeur médiane de la gentamicine pour ces souches était de 32 mg/L (16-1024 mg/L). À 50 mg/L, PABN a réduit ces valeurs à 6 mg/L (0,5-64 mg/L) (Tableau 1). La valeur médiane de la CMI pour l'érythromycine en l'absence de PABN était de 768 mg/L (256-2048 mg/L). Cette valeur a été réduite à 384 mg/L (16-512 mg/L) après addition de 50 mg/L de PABN (Tableau 1). La plus grande réduction de la CMI a été observée dans la souche PA 48912-1 qui présentait une CMI de 32 mg/L pour la gentamicine sans PABN contre 0,5 mg/L en présence de PABN (Tableau 1). Dans la même souche, la CMI de l'érythromycine est passée de 512 mg/L à 16 mg/L après traitement avec 50 mg/L de PABN. D'autre part, aucune différence significative n'a été observée entre les CMI et les CMB de chaque souche testée pour les deux antibiotiques utilisés ($p > 0.05$).

Tableau 1
Susceptibilités (CMI et CMB) des souches de *P. aeruginosa* à la gentamicine et à l'érythromycine.
Les concentrations minimales bactéricides (CMB) sont indiquées entre parenthèses.

	Gentamicine				Érythromycine			
	PABN (mg/L)				PABN (mg/L)			
Souches	0	10	25	50	0	10	25	50
PA 01	16 (16)	16 (16)	8 (8)	8 (16)	512 (1024)	512 (1024)	512 (1024)	512 (1024)
PA 1	32 (64)	8 (8)	16 (16)	16 (16)	256 (512)	256 (512)	256 (256)	256 (512)
PA 3	32 (64)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	1024 (2048)	512 (1024)	512 (1024)	512 (1024)
PA 5	32 (64)	4 (8)	8 (16)	4 (8)	1024 (1024)	128 (256)	256 (256)	128 (256)
PA 7	32 (64)	4 (8)	4 (8)	4 (8)	512 (1024)	512 (1024)	512 (1024)	512 (1024)
PA 8	16 (32)	8 (16)	8 (16)	4 (4)	2048 (2048)	256 (512)	256 (512)	128 (256)
PA 11	1024 (2048)	64 (64)	64 (64)	64 (64)	2048 (4096)	512 (1024)	512 (1024)	512 (1024)
PA 48912-1	32 (64)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	512 (1024)	32 (64)	32 (64)	16 (32)
K 2733	4 (4)	4 (4)	4 (4)	4(8)	16 (32)	16 (32)	16 (32)	16 (32)

Des dilutions en série de deux fois ont été effectuées pour chaque antibiotique afin d'obtenir les CMI et les CMB. Les contrôles positifs ont été préparés avec le 0,5 McFarland standard et le bouillon MH tandis que les contrôles négatifs ont été préparés avec du bouillon MH uniquement.

Étude de synergie

Les interactions *in vitro* entre la gentamicine et l'érythromycine sur chaque souche ont été déterminées avec le tableau de damier en présence et en l'absence de PABN à une concentration de 10 mg/L. Aucune relation antagoniste n'a été trouvée au cours de cette étude. Il n'y avait aucune interaction entre les deux antibiotiques dans toutes les souches en l'absence de PABN. Cependant, en présence de 10 mg/L de PABN, on a observé une synergie dans PA 5, PA 48912-1, PA 7 et une indifférence dans les autres souches (Tableau 2). Les CMI ont été considérablement réduites une fois que les antibiotiques ont été combinés (Tableau 2). Ces concentrations ont été réduites davantage en présence de PABN. La réduction la plus importante des concentrations, une fois que GEN et ERY ont été combinés, a été observée dans PA 48912-1 en présence de PABN, où les concentrations requises pour inhiber la croissance bactérienne sont passées de 512 mg/L à 4 mg/L pour l'érythromycine et à partir de 32 mg/L à 0,031 mg/L pour la gentamicine (Tableau 2).

Tableau 2
Détermination des indices FIC de chaque souche testée pour la combinaison d'ERY et de GEN avec et sans 10 mg/L de PABN

Souches	Érythromycine + Gentamicine					
	0 mg/L PABN			10 mg/L PABN		
	FIC ERY+GEN (mg/L)	FICI	Indications	FIC ERY+GEN (mg/L)	FICI	Indications
PA 01	32 + 16	1.06	I	32 + 16	1.06	I
PA 1	128 + 32	1.5	I	128 + 0.5	0.56	I
PA 3	64 + 32	1.06	I	512 + 0.5	1.06	I
PA 5	64 + 32	1.06	I	16 + 0.5	0.12	S
PA 7	1024 + 2	2.06	I	128 + 0.25	0.31	S
PA 8	2048 + 2	1.12	I	128 + 4	1	I
PA 11	4096 + 64	2.06	I	256 + 4	0.56	I
PA 48912-1	256 + 2	0.56	I	4 + 0.031	0.12	S
K 2733	1 + 4	1.06	I	8 + 0.25	0.56	I

S = Synergisme I = Indifférence

Le FIC a été testé en utilisant les valeurs de MIC trouvées pour la gentamicine et l'érythromycine dans chaque souche en présence et en l'absence de PABN. Les contrôles positifs et négatifs ont également été préparés.

Étude cinétique

Les études cinétiques ont été effectuées sur une période de 24 heures avec PA 48912-1, car c'était la souche la plus sensible à la gentamicine (GEN) et à l'érythromycine (ERY) avant et après le traitement par PABN. Les contrôles positifs n'ont été exposés à aucun antibiotique. Leurs colonies bactériennes ont donc augmenté de façon exponentielle après 24 heures. GEN a eu un effet bactéricide contre *P. aeruginosa* au fil du temps. GEN (1X) à 2 mg/L a donné une réduction bactérienne de 1,97 Log après 24 heures. GEN à 4mg/L (2X) a complètement éradiqué les bactéries après 24 heures, tandis que GEN à 8 mg/L (4X) a montré une éradication complète après seulement 4 heures (Figure 1). Cette activité a été augmentée par PABN qui a réduit les temps d'éradication de GEN (1X), GEN (2X) et GEN (4X) à 24 heures, 6 heures et 4 heures respectivement (Figure 1). Les différences dans les Log CFU/mL étaient

statistiquement significatives entre le contrôle, GEN (4X), PABN + GEN (2X) et PABN + GEN (4X) avec des valeurs P de 0,0089, 0,0375 et 0,0082 respectivement. GEN à 2 mg/L et ERY à 256 mg/L (1X FIC) ont réduit les colonies de 1,79 Log après 6 heures. Cette réduction a été suivie d'une re-croissance de 0,22 Log à 24 heures (Figure 2). GEN à 4 mg/L et ERY à 512 mg/L (2X FIC) a permis une réduction bactérienne de 2.1 Log après 24 heures pendant que GEN à 8 mg/L et ERY à 1024 mg/L (4X FIC) a eu une réduction bactérienne de 2,61 Log après 24 heures. Les combinaisons de GEN et d'ERY ont eu un effet bactériostatique contre *P. aeruginosa* car elles n'ont pas complètement éradiqué les bactéries pendant la période d'étude. Cependant, le nombre de colonies (Log CFU/mL) des bactéries est resté relativement constant au cours des 24 heures et aucune repousse bactérienne n'a été observée. En outre, il n'y avait pas de différence significative entre les échantillons contenant GEN et ERY traités avec PABN et ceux qui étaient sans PABN ($P > 0,05$). Avec 10 mg/L de PABN, GEN et ERY à FIC 1X ont réduit les colonies bactériennes de 1,97 Log après 6 heures. Ceci a été suivi d'une modeste croissance de 0.12 Log à 24 heures (Figure 2). GEN et ERY à 2X FIC ont réduit les colonies de 2.3 Log après 6 heures. Ceci a été suivi d'une petite croissance de 0.13 Log à 24 heures en présence de PABN. Enfin, GEN et ERY à 4X FIC ont réduit les colonies de 2,5 Log après 24 heures avec PABN. Dans l'ensemble, GEN seul ou avec PABN a offert une éradication bactérienne complète

Figure 1
Courbe d'étude cinétique de P48912-1 exposée à 2, 4 et 8 mg/L de gentamicine en présence et en l'absence de 10 mg/L de PABN.

Les symboles représentent les moyennes et les barres d'erreur sont des écarts types (SD) de trois expériences indépendantes.

Figure 2

Courbe d'étude cinétique montrant la viabilité de PA 48912-1, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée des poumons de patients atteints de FK exposée à 1, 2 et 4 fois les concentrations de gentamicine et d'érythromycine requises pour l'indice d'inhibition fractionnaire (FIC) avec et sans 10 mg/L de PABN.

Les symboles représentent les moyennes et les barres sont des écarts types (SD).

Discussion

P. aeruginosa est responsable de la majorité des infections pulmonaires observées chez les patients atteints de Fibrose kystique (FK). Ces bactéries expriment presque tous les mécanismes de résistance, y compris l'efflux actif d'antibiotiques (Sonnet, Izard et Mullie, 2012, p. 78). Le blocage des pompes à efflux avec les inhibiteurs de pompes à efflux (EPI) pourrait augmenter la disponibilité cellulaire des antibiotiques ainsi que leur activité (Zhang et collab., 2010). Le but de ce travail était d'étudier les effets d'un inhibiteur de pompes à efflux, le Phénylalanine-arginine β -naphthylamide (PABN), seul ou en association avec des aminoglycosides et des macrolides sur des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de FK. À notre connaissance, très peu de recherches ont étudié les effets de PABN sur les activités des aminoglycosides et des macrolides, bien que ces composés soient reconnus comme des substrats de pompes à efflux (Westbrock-Wadman et collab., 1999). Plusieurs classes d'EPI ont été identifiées ainsi que leurs mécanismes d'action. Des recherches antérieures ont montré que PABN agit en entrant en compétition avec les antibiotiques pour leur extrusion et en perméabilisant la membrane externe des bactéries (Bohnert et collab., 2010). PABN a potentialisé l'activité des deux antibiotiques utilisés contre la majorité des souches testées. En effet, il a réduit les CMI et les CMB de la gentamicine et de l'érythromycine respectivement dans 77,78% et 44,44% des souches. Les

concentrations de gentamicine ont néanmoins été réduites dans une plus grande mesure que celles de l'érythromycine. Cela était en désaccord avec une étude antérieure qui a montré que PABN n'était pas effectif lorsqu'il s'agissait de réduire la CMI de la gentamicine (Lomovskaya et collab., 2001).

Comme prévu, PABN n'a pas réduit les CMI de K 2733, la souche déficiente en pompe à efflux. Cela semble confirmer que l'inhibition des pompes à efflux est le mécanisme par lequel PABN a potentialisé l'activité de la gentamicine et de l'érythromycine. PA 48912-1 était la souche la plus sensible au traitement avec PABN. En effet la CMI avec PABN était de 64 fois plus petite que la CMI sans PABN pour la gentamicine et pour l'érythromycine la CMI avec PABN était 16 fois plus petite que la CMI sans PABN. Il est probable que l'utilisation de pompes à efflux soit le principal mécanisme de résistance dans cette souche.

Des études antérieures ont démontré que PABN a augmenté les susceptibilités d'*Acinetobacter baumannii* et de *P. aeruginosa* et a réduit leurs CMI à d'autres antibiotiques tels que les lincosamides, les fluoroquinolones (Cortez-Cordova et Kumar, 2011 ; Sonnet, Izard et Mullie, 2012 ; Lamers, Cavallari et Burrows, 2013). Maleki et collab. (2014) ont constaté que la CMI de la ciprofloxacine dans les isolats d'*A. baumannii* avec une forte résistance à la ciprofloxacine a été réduite de 2 à 4 fois en présence de PABN (Maleki et collab., 2014, p. 165). Les résultats de Tohidpour et collab. (2009, p. 354) indiquent que la résistance de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones a diminuée de manière significative en présence de PABN. En outre, une autre étude a observé une réduction de 4 à 8 fois des CMI de Meropenem chez *Acinetobacter baumannii* en utilisant PABN (Lee et collab., 2010). Morita et collab. (2012) ont essayé d'identifier la cause de la résistance élevée aux aminoglycosides dans la souche PA 7 et ils ont constaté que MexXY-OprA et MexAB-OprM semblaient être les principales pompes à efflux présentes dans PA 7, comme dans PA 01 (Morita, Tomida et Kawamura, 2012). La CMI de la gentamicine contre PA 7 dans leur étude était de 1024 mg/L, 32 fois plus élevée que la valeur que nous avons trouvée. Leur utilisation d'un bouillon ajusté aux cations divalent pour l'expérience pourrait être la cause de cette disparité. En fait, les cations divalents (Ex. Mg^{2+}) augmentent l'activité des pompes à efflux, ce qui peut considérablement augmenter les valeurs des CMI (Mao et collab., 2001). Nous avons également constaté que PABN avait un effet antibactérien à des concentrations élevées. Selon Lamers et collab. (2013), cela s'explique probablement par le fait que PABN perméabilise la membrane de la bactérie à des concentrations élevées, provoquant ainsi une rupture de la cellule bactérienne (Lamers, Cavallari et Burrows, 2013). Nos résultats indiquent que la gentamicine est plus efficace que l'érythromycine contre nos souches bactériennes et que

l'activité de PABN dépend non seulement de l'espèce sur laquelle il est utilisé, mais aussi de l'antibiotique qui lui est associé.

Les combinaisons de gentamicine et d'érythromycine n'ont montré aucune interaction dans toutes les souches sans traitement avec PABN. Après l'ajout de PABN, une synergie n'a été observée que dans PA 7, PA 5 et PA 48912-1. Cependant, les concentrations de gentamicine et d'érythromycine nécessaires pour arrêter la croissance bactérienne ont été réduites une fois qu'elles ont été combinées. Ces concentrations ont été plus réduites après l'addition de PABN.

Dans les études cinétiques, la gentamicine était plus efficace pour tuer les bactéries lorsqu'elle était utilisée seule. En général, PABN a amélioré les temps de destruction des échantillons avec la gentamicine. Par exemple, à 2 mg/L la gentamicine seule n'a pas pu éradiquer les bactéries jusqu'à 24 heures, mais après l'ajout de PABN, son temps d'éradication était de 24 heures. De même, la gentamicine à 4 mg/L seule a eu un temps d'éradication de 24 heures qui a été réduit à 6 heures dans l'échantillon traité avec PABN. Nos résultats ont montré que, lorsqu'elle était utilisée seule, la gentamicine avait une activité bactéricide, alors que lorsqu'elle était combinée à l'érythromycine, ils avaient tous les deux une activité bactériostatique. Étant donné que l'érythromycine est un agent bactériostatique, il inhibe la croissance et la reproduction bactérienne. D'autre part, la gentamicine, un agent bactéricide, a besoin que les bactéries se divisent ou se reproduisent activement pour exercer son effet. Il est possible que, parce que la croissance bactérienne était bloquée par l'érythromycine, la gentamicine ne put tuer les bactéries. Les différences d'activités entre la gentamicine et l'érythromycine sont probablement les raisons pour lesquelles leurs combinaisons n'ont montré aucune interaction pendant l'étude du damier et cela pourrait aussi expliquer pourquoi la gentamicine était plus active seule.

Conclusion

En conclusion, les valeurs de CMI et CMB décrites ci-dessus ont confirmé que PABN a augmenté l'activité de la gentamicine et de l'érythromycine contre *P. aeruginosa*. L'inhibition des pompes à efflux semble être le mécanisme par lequel PABN a potentialisé l'activité de ces antibiotiques. D'autres études sont nécessaires pour répliquer l'étude du damier sur la gentamicine et l'érythromycine à la fois avec et sans PABN avec plus de souches cliniques afin de confirmer les interactions entre les deux antibiotiques. Des études génotypiques de toutes les souches utilisées sont également nécessaires pour confirmer que PABN a potentialisé l'activité des deux antibiotiques par l'inhibition des pompes à efflux et non pas par un autre mode d'action. En outre, étant donné que des interactions synergiques entre les β - lactames et les aminoglycosides ont été observées dans de nombreuses études (Farzana et Shamsuzzaman, 2015, p. 4),

leurs combinaisons pourraient être étudiées pour leurs effets bactéricides en présence de PABN contre les souches de *P. aeruginosa*. Sur la base de nos résultats, l'utilisation de PABN en association avec la gentamicine semble être une approche thérapeutique intéressante contre les infections pulmonaires causées par *P. aeruginosa*.

Références

Askoura, Momen, Walid Mottawea, Turki Abujamel, et Ibrahim Taher (2011). «Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*», *Libyan Journal of Medicine*, n° 6, p. 1-8.

Bohnert, Jürgen A., Brian Karamian, et Hiroshi Nikaido (2010). «Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates», *Antimicrobial agents and chemotherapy*, n° 54(9), p. 3770-3775.

Chatterjee, Maitrayee, C.P. Anju, L. Biswas, Kumar V. Anil, Mohan C. Gopi et R. Biswas (2016). «Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options», *International Journal of Medical Microbiology*, n° 306(1), p. 48-58.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2016). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 26^e édition, Wayne, PA. p. 251.

Cortez-Cordova, Jenny et Ayush Kumar. (2011). «Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*», *International Journal of Antimicrobial Agents*, n° 37(5), p. 420-424.

De Kievit, Teresa R., M.D. Pakins, R.J. Gillis, R. Srikumar H. Ceri, K. Poole, B. H. Iglewski et D.G. Storey (2001). «Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in

Pseudomonas aeruginosa biofilms», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n° 45(6), 2001, p. 1761-1770.

Fankam, Aimé, Jules R. Kuiate, et Victor Kuete (2014). «Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes», *BMC Complementary and Alternative Medicine*, n° 14, p. 241-250.

Fankam, Aimé, Jules R. Kuiate, et Victor Kuete (2015). «Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartianus* against Gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes», *BMC Complementary and Alternative Medicine*, n° 15(1), p. 206-218.

Farzana, Aleya et S. Shamsuzzaman (2015). «In vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains», *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, n° 9(1), p. 3-8.

Gholami, Mehrdad, Ali Hashemi, Mojdeh Hakemi-Vala, Hossein Goudarzi et Masoumeh Hallajzadeh (2015). «Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine B- naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran», *Jundishapur journal of microbiology*, n° 8 (10), p. e19048.

Guénard, Sophie, Cédric Muller, Kaura Monlezun, Philippe Benas, Isabelle Broutin, Katy Jeannot et Patrick Plésiat (2014). «Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n° 58(1), p. 221-228.

Hirakata, Yiochi, Kondo Akira, Yano Kazuki, Arai Kazuaki, Hirotsu Ayako, Kunishima Hiroyuki, Yamamoto Natsuo, Hatta, Masumitsu, Kitagawa Miho, Kohno Shigeru et Kaku Mitsuo (2009). «Efflux pump inhibitors reduce the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*», *International Journal of Antimicrobial Agents*, n° 34(4), p. 343-346.

Kinana, Alfred D., A.V. Vargiu, T. May et H. Nikaido (2016). «Aminoacyl beta-naphthylamides as substrates and modulators of AcrB multidrug efflux pump», *Proc Natl Acad Sci USA*, n° 113(5), p. 1405-1410.

Lamers, Ryan P., Joseph F. Cavallari, et Lori L. Burrows (2013). «The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PABN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria», *PLoS One*, n° 8(3), p. e60666.

Lee, Yangsoon, J.H. Yum, C.K. Kim, D. Yong, E.H. Jeon, J.Y. Ahn, et K. Leek (2010). «Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene», *Annals of Clinical & Laboratory Science*, n° 40(1), p. 43-48.

Li, Jun, Zou Mingxiang, Dou Qingya, Hu Yongmei, Wang HAichen, Yan Qun et Liu Wen'en (2016). «Characterization of clinical extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Hunan province of China», *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, n° 15(1), p. 35-42.

Lomovskaya, Olga et Will Watkins (2001). «Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria», *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, n° 3(2), p. 225-236.

Lomovskaya, Olga, M.S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Léger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, et V.J. Lee (2001). «Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n° 45(1), p. 105-116.

Maleki, Mohammad-Hossein, Farid Azizi Jalilian, Hatef Khayat, Maryam Mohammadi, Fazel Pourahmad, Khairollah Asadollahi, Iraj Pakzad, Nourkhoda Sadeghifard, Setareh Soroush, Mohammad Emaneini et Morovat Taherikalani (2014). «Detection of highly ciprofloxacin resistance *Acinetobacter baumannii*

isolated from patients with burn wound infections in presence and absence of efflux pump inhibitor», *Maedica-a Journal of Clinical Medicine*, n° 9(2), p. 162-167.

Mao, Weimin, Mark S. Warren, Angela Lee, Anita Mistry et Olga Lomovskaya (2001). «MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n° b(7), p. 2001-2007.

Morita, Yuji, Junko Tomida, et Yoshiaki Kawamura (2012). «Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7», *Microbiology*, n° 158(4), p. 1071-1083.

Morita, Yuji, Junko Tomida, et Yoshiaki Kawamura (2013). «Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials», *Frontiers in microbiology*, n° 4, p. 1-8.

Nikaido, Hirochi (1996). «Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria», *Journal of Bacteriology*, n° 178(20): p. 5853-5859.

Nikaido, Hirochi (1998). «Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps», *Clinical Infectious Diseases*, n° 27 (Supplement 1), p. S32-S41.

Pu, Yingying, Yuehua Ke et Fan Bai (2017). «Active efflux in dormant bacterial cells–New insights into antibiotic persistence», *Drug Resistance Updates*, n° 30, p. 7-14.

Qin, Xuan (2016). «Chronic pulmonary pseudomonal infection in patients with cystic fibrosis: a model for early phase symbiotic evolution », *Critical Reviews in Microbiology*, n° 42(1), p. 144-157.

Rice, Louis B (2006). «Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*», *Clinical Infectious Diseases*, n° 43(Supplement 2), p. S100-S105.

Rukholm, Gavin, Clement Mugabe, Ali O. Azghani et Abdelwahab Omri (2006). «Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time–kill study», *International Journal of Antimicrobial Agents*, n° 27(3), p. 247-252.

Sonnet, Pascal, Daniel Izard, et Catherine Mullie (2012). «Prevalence of efflux-mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)- piperazine and phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide», *International Journal of Antimicrobial Agents*, n° 39(1), p. 77-80.

Talebi-Taher, Mahshid (2016). «Role of efflux pump inhibitor in decreasing antibiotic cross-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a burn hospital in Iran», *The Journal of Infection in Developing Countries*, n° 10(06), 2016, p. 600-604.

Tohidpour, Abolghasem, Sahim Najar Peerayeh, J.F. Mehrabadi et Yazdi H. Rezaei (2009). «Determination of the efflux pump-mediated resistance prevalence in *Pseudomonas aeruginosa*, using an efflux pump inhibitor», *Current Microbiology*, n° 59(3), p. 352-355.

Vaara, Martti (1992). «Agents that increase the permeability of the outer membrane», *Microbiological Reviews*, n° 56(3), 1992, p.395-411.

Watkins, William J., Y. Landaverry, R. Léger, R. Litman, T.E. Renau, N. Willians, R. Yen, S. Chamberland, D. Madsen, D. Griffith, V. Tembe, K. Hule et M.N. Dudley (2003). «The relationship between physicochemical properties, in vitro activity and pharmacokinetic profiles of analogues of diamine-containing efflux pump inhibitors», *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n° 13(23), p. 4241- 4244.

Westbrock-Wadman, Shannon, David R. Sherman, Mark J. Hickey, Silvija N. Coulter, Ya Qi Zhu, Paul Warrener, Lisa Y. Nguyen, Ribhi M. Shawar, Kim R. Folger et C. Kendall Stover (1999). «Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability», *Antimicrobial agents and chemotherapy*, n° 43(12), p. 2975-2983.

Willers, Clarissa, Johannes Frerick Wentzel, Lissinda Hester du Plessis Chrisna Gouws et Josias Hendrik Hanman (2017). «Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinical relevant microorganisms: the role of efflux inhibitors», *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, n° 21(1), p. 23-36.

Zhang, Zhan, Zhi-Qiang Liu, Peng-Yuan Zheng, Fu-Ai Tang et Ping-Chang Yang (2010). «Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*», *World Journal of Gastroenterology: WJG*, n° 16(10), p. 1279.