

Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 06 septembre 2024

Par Manon GUIBBERT

Née le 23 janvier 1996 à Carcassonne (11)

ANTIBIOGRAMME RAPIDE ET FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX - FORCE DE SEDIMENTATION (SDFFF) : PANEL URINAIRE ET PREUVE DE CONCEPT A PARTIR D'ECHANTILLONS D'URINES

Thèse dirigée par le Pr Olivier Barraud

Examineurs :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY, PU-PH, Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

M. le Professeur Olivier BARRAUD, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

M. le Professeur Sébastien HANTZ, PU-PH, Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie-Pharmacovigilance du CHU de Limoges



Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 06 septembre 2024

Par Manon GUIBBERT

Née le 23 janvier 1996 à Carcassonne (11)

ANTIBIOGRAMME RAPIDE ET FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX - FORCE DE SEDIMENTATION (SDFFF) : PANEL URINAIRE ET PREUVE DE CONCEPT A PARTIR D'ECHANTILLONS D'URINES

Thèse dirigée par le Pr Olivier Barraud

Examineurs :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY, PU-PH, Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

M. le Professeur Olivier BARRAUD, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

M. le Professeur Sébastien HANTZ, PU-PH, Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie-Pharmacovigilance du CHU de Limoges



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} janvier 2024

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIÈRE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie

Mme POUGET Christelle Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. TROUILLAS Patrick Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Élise (*) Pharmacologie

M. JOST Jérémy Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Émilie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle (*) Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David (*) Biochimie et biologie moléculaire

Mme MARRE-FOURNIER Françoise Biochimie et biologie moléculaire

M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Édouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	---

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Élodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. HAMION Guillaume	Pharmacognosie, Botanique et Mycologie
Mme SONDA Amar	Chimie analytique et bromatologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Aux membres de ce jury,

A Monsieur le Professeur Olivier BARRAUD, directeur de ce travail de thèse, je suis honorée de la confiance que tu m'as accordée en me remettant ce travail. Je te remercie pour ton encadrement, ta disponibilité et ton expertise. Ta rigueur m'a motivé à donner le meilleur de moi-même dans ce travail de thèse. Sois assuré de ma sincère gratitude.

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, je tiens à vous remercier de me faire l'honneur de juger mon travail et de présider ce jury. Cela signifie énormément pour moi d'autant plus que vous avez été présente durant toutes mes études supérieures, depuis les bancs de la faculté jusqu'au jour de ma thèse. Je vous remercie également d'avoir pris le temps de me conseiller de nombreuses heures dans votre bureau. Vous m'avez transmis à travers vos cours et vos enseignements la passion de la microbiologie. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et toute ma gratitude.

A Madame le Professeur Marie Cécile PLOY, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Vos conseils aussi bien personnels que professionnels ont été d'une aide précieuse pour moi. Merci pour votre bienveillance et pour toutes les connaissances que vous nous transmettez au travers des nombreux TD antibiogrammes que vous prenez le temps d'assurer malgré votre emploi du temps chargé. Vous êtes un exemple pour bon nombre d'internes. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ, je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également d'avoir dirigé mon TRE et de m'avoir transmis le goût de la recherche, toujours avec bienveillance et humour. Je tiens à t'exprimer mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Franck SAINT MARCOUX, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je tenais également à vous remercier d'avoir su nous transmettre votre savoir toujours dans la bonne humeur et avec le sourire. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A toutes les personnes ayant participé au projet,

Au **Docteur Gaëlle Bégaud** et au **Professeur Serge Battu**, je vous remercie pour vos compétences en SdFFF ainsi que les réparations effectuées sur les machines sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu être mené à terme.

Au Docteur Linda Tlili, je te remercie pour ton implication dans ce travail de thèse. Merci d'être restée avec moi à la fac jusqu'à plus de 21 heures pour injecter le maximum d'échantillons dans les moments de rush, de m'avoir montré comment faire de belles ROC après tes journées de travail et d'avoir toujours répondu présente lorsque j'avais besoin de toi. Je te remercie également d'être si humaine et bienveillante et de m'avoir soutenue et rassurée dans les moments difficiles. Merci pour ton implication.

A Carole et Delphine, merci pour votre aide dans ce travail ainsi que pour votre disponibilité.

Aux services de Bactériologie-Virologie-Hygiène et Parasitologie-Mycologie de Limoges, je tiens à tous vous remercier pour votre bonne humeur et votre humour, j'ai passé de superbes moments à vos côtés et ces souvenirs resteront gravés dans ma mémoire.

Je remercie tous les biologistes (**Hélène, Sophie, Aurélie, Marine, Nadia, Fabien, Marie-Fleur, Etienne, Elodie, Nathalie**) pour leur sympathie et leur implication dans la formation des internes, merci de nous transmettre vos connaissances.

Un grand merci également aux secrétaires ainsi qu'à **toute l'équipe technique**. Merci pour ces heures de paillasse, pour votre patience et pour tout le temps que vous prenez pour nous former. Un big up à **Emilie Faucher** pour avoir essayé de réparer le Densicheck à de multiples reprises ainsi qu'une mention spéciale à **Marie Gourcerol**, merci pour ta gentillesse, ton empathie et ta pédagogie. Les internes de Limoges ont de la chance de t'avoir.

Au service de microbiologie de Nîmes, aux secrétaires, aux techniciens, aux biologistes, je vous remercie de m'avoir si bien accueillie et accordée du temps pour ce travail de thèse. Je tiens à remercier le **Professeur Jean Philippe Lavigne** de m'avoir permis d'intégrer son service et accordée sa confiance. Un remerciement tout particulier au **Docteur Alix Pantel** pour sa bienveillance, son soutien et sa disponibilité. Merci pour toute la bibliographie que tu m'as envoyée et les nombreux conseils dont tu m'as fait part. Je tiens également à remercier le **Docteur Adeline Dubois** pour son humanité, sa gentillesse et sa bonne humeur, merci d'avoir été là quand j'en ai eu besoin.

A ma famille,

A mes parents, aucun mot n'est suffisamment fort pour vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour nous, pour les valeurs que nous avez transmises et les sacrifices consentis pour que je puisse faire ces belles études. A mon **papa**, je te remercie d'avoir toujours cru en moi même quand moi-même je n'y croyais pas. Tu as, au fil des coups de téléphone journaliers, suivi toutes mes études, dans les moindres détails, de l'UE3 tant redoutée à cette thèse. Je te remercie d'être la personne que tu es, mon confident, la personne à qui je peux tout raconter et sur qui je peux toujours compter. Merci pour toutes les valeurs que tu m'as inculquées, tu es un exemple de droiture et de bienveillance. Ces quelques mots ne suffiront jamais à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi ni à te témoigner l'amour sans fin que je te porte. A ma **maman**, merci pour ton amour inconditionnel et ton soutien. Je te remercie également pour les bons petits plats que tu me préparais les dimanches soir avant que je reparte à Limoges pour m'éviter de cuisiner (et peut être m'intoxiquer haha) ainsi que pour tout l'administratif que tu as géré (je n'aurai probablement jamais été inscrite à la fac sans toi). Merci pour ton soutien et ta présence dans les moments de doute ou de célébration. Je vous aime à l'infini.

A **ma mamie fanfan**, merci pour les heures à refaire le monde sur ton canapé, pour tous les repas du dimanche, pour l'amour sans limites que tu nous portes à tous. Ta patience et ta dévotion sont un exemple pour moi. Je te remercie d'être la personne que tu es et je souhaite à chacun une grand-mère comme toi.

A **mon papi**, merci pour ta joie de vivre inébranlable et ton immense générosité. Tu es un véritable soleil (qui brille toujours dans mon cœur), toujours prêt à te déguiser dans des costumes improbables à la fête de la chasse ou bien en père Noël à la fête du village pour distribuer des cadeaux aux enfants. Tu me manques chaque jour mais je suis sûre que tu me regardes de là-haut et j'espère te rendre fier.

A **mon frère**, je te remercie de toujours être là pour me faire rire avec tes innombrables lubies : de la dé-tapisserie de ta chambre à ton nouveau kit de DJ (tqt je suis sûre que tu vas bientôt mixer au Rex). Les batailles de guillis et les cabanes dans les moellons resteront gravées à vie dans mon cœur. Je serai toujours là pour toi, merci pour tout.

Enfin, à mes oncles et tantes (**tatie Nathalie, tété, et tonton Laurent²**) merci pour votre soutien. Mes cousines, **Axelle, Eloïse, Fanny et Lorette**, vous êtes comme des sœurs pour moi et je vous remercie d'être toujours prêtes à lancer un time's up à n'importe quelle heure chez mamie (le QG) ou autour de la piscine.

A mes amis de longue date,

A ma **Chanel**, merci d'être présente chaque jour depuis maintenant plus de 15 ans, dans chaque moment de ma vie, les bons comme les mauvais. Bien plus qu'une simple meilleure amie, avec toi l'expression « quand les amis deviennent la famille » prend tout son sens. Merci pour les innombrables heures au téléphone et messages quotidiens pour parler de tout et de rien. C'est grâce à toi que j'ai débuté ces études, tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours poussé à être la meilleure version de moi-même. Merci pour ta bonté de cœur à toute épreuve, j'ai de la chance de t'avoir à mes côtés. Sans toi je n'en serai pas là aujourd'hui alors merci pour tout ce que tu as fait et fait encore pour moi.

A **Justine** et **Anaïs**, qui ont commencé l'aventure limougeaude avec moi il y a maintenant plus de 10 ans, je vous remercie d'avoir embellit ces années d'études. C'est grâce à vous finalement que je suis arrivée dans cette ville que je ne pensais pas tant aimer.

A **Manon** et **Elise**, du collège ou des cours de danse à aujourd'hui, quel chemin parcouru depuis toutes ces années. Merci d'être dans ma vie et de me partager votre bonne humeur.

A **Sonia**, qui aurait cru qu'une si belle amitié naitrait dans une salle de sport ? Merci d'être toujours présente malgré les kilomètres qui nous séparent.

A mes plus belles rencontres sur les bancs de la faculté,

A **Charlène**, je te remercie pour tes qualités humaines, ton empathie et ta générosité. Merci pour nos discussions interminables en mangeant des roses des sables et à refaire le monde dans mon petit studio. Merci également d'avoir été là pour m'encourager lorsque j'en avais le plus besoin. Malgré ton départ il y a maintenant bien longtemps à Paris, rien n'a changé, j'ai trouvé en toi une véritable amie. Aucun doute que nous serons très bientôt sur la route 66 en Californie.

A **Sarah**, merci pour ton humour (parfois douteux il faut bien le dire haha), pour ta spontanéité et ton rire communicatif. Je te remercie pour toutes ces soirées passées à manger ensemble après la salle de sport, en réalité on était presque coloc ! Mon mini (1,51) soleil, merci d'avoir toujours été à mes côtés.

A **Anna**, merci pour tous les moments vécus ensemble, pour ces pauses du midi infinies le samedi jusqu'à 16 heures (voir jusqu'à 18 heures la fermeture de la BU haha). Ma partenaire d'internat et de concours, merci d'avoir partagé avec moi cette minuscule chambre à Rungis, d'avoir travaillé tous les jours chez moi à manger des ficellos pendant le confinement et posé des questions sur des petits bouts de papier pour me faire réviser. Je pense que je n'y serai jamais arrivé sans toi. Merci d'être une si belle personne et une si bonne amie.

A **Igor**, mon âme frère comme nous avons l'habitude de le dire, tellement différents et tellement similaires à la fois. Merci pour toutes ces heures à la BU et ces cafés un peu trop longs. Je te remercie pour toutes ces soirées, ces heures de cours et ces visio avec Luce qui dureraient la journée à juste se regarder travailler, ça m'a étonnement beaucoup aidé. Merci d'être dans ma vie et d'avoir rendu mes années de fac (et celles à venir j'en suis sûre) si joyeuses.

A **Fanny**, merci pour tous ces moments passés ensemble depuis notre rencontre improbable à cette soirée où nous étions les deux seules pharmas. Je te remercie également pour tous ces petits repas remplis de rires, malheureusement moins fréquents depuis ton expatriation à Paris. Je te remercie pour ta joie de vivre.

A **Lucie**, ma petite luz, ce surnom te va si bien, un véritable petit soleil. Je suis heureuse de t'avoir rencontré il y a maintenant 3 ans à la BU. Merci d'avoir égayé nos pauses de tes rires.

Aux **plaquettes en amas**, jamais très loin les unes des autres,

A **Sarah**, notre reporter sans frontière de stage, tu as dans ton téléphone l'équivalent d'une bombe nucléaire pour ma dignité, merci de m'avoir fait découvrir la fameuse crème de pistache. Les moments entre plaquettes passés à l'océan resteront gravés dans ma mémoire.

A **Sarirah**, chef et sœur de Birk, sans toi il est certain que les fous rires auraient été bien moins nombreux, merci d'avoir égayé ce stage d'hématologie avec tes expressions toutes plus loufoques les unes que les autres.

A **Nisrine** (Nisrin pour les intimes), je suis heureuse d'avoir découvert en toi une véritable amie, ta folie et ton rire communicatif ont égayé les stages que nous avons partagés. Merci d'être présente pour moi quand j'en ai eu besoin et merci d'être allé chercher cette thèse je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi. Je suis heureuse d'avoir pu partager des moments si précieux avec toi, de ton enterrement de vie de jeune fille à l'achat de votre maison avec Arnus, et je suis sûre bien d'autres à venir.

Enfin, à **Tom**, (aka Mot ou Merguez), mi plaquette mi bactérie tout comme moi. Après ces trois années d'internats dont 5 stages partagés (j'ai survécu apparemment), tu es toujours là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de m'avoir tenu compagnie en SdFFF jusqu'à parfois plus de 21 heures pour injecter mes petites bactéries au lieu de rentrer jouer à POE. Je te remercie également pour le soutien sans faille que tu m'as apporté ces derniers mois, ça compte beaucoup pour moi. J'ai trouvé en toi un véritable ami et surtout un excellent partenaire de babyfoot et j'espère pouvoir te mettre de nombreuses gamelles le semestre à venir malgré ton émigration à Guéret.

A mes amis de la team microbio,

A **Ines** (le Z), ma co-VP tuto, tout droit débarqué du cercle polaire, merci de m'avoir fait rire avec tes expressions toutes plus étranges les unes que les autres. Merci de ta positivité constante et ta joie de vivre. J'ai hâte de te voir dévaler les pistes noires tout schuss !

A **Marie Sarah**, en qui j'ai découvert une véritable amie, je te remercie pour ta douceur et ta motivation constante pour aller boire un verre ou organiser avec moi une soirée jeux (désolé de t'éliminer chaque fois à undercover 😊). Au plaisir de partager un nouveau semestre avec toi et bien entendu de nombreux week-ends (de la capitale Brive-la-Gaillarde aux pistes du Massif central).

A **Alix**, merci d'avoir partagé avec moi ce semestre de parasito-myco (ta passion pour toute ces bêtes me fascinera toujours), merci également pour ces nombreuses parties de babyfoot et pour tes mémorables roulettes. Aucun doute qu'un jour notre team gagnera !

A mes co-interne et amis limougeaude, Je tiens à vous remercier profondément d'avoir été de véritables rayons de soleil dans la grisaille limousine que j'ai appris à aimer grâce à vous. **Chieu-An**, ma petite parisienne pleine de folie et d'humour, merci d'avoir égayé notre semestre de microbio et d'être là pour moi. **Sami**, avec qui les trajets jusqu'à Toulouse passaient si vite, merci pour tes encouragements et tes petits mots le soir quand tu voyais toujours mes affaires à 21 heures dans le BDI. **Gus**, mon second petit frère, merci de me faire toujours autant rire avec tes expressions de jeuns, je serai toujours là si tu as besoin. **Dorine**, merci d'avoir été ma fervente supportrice dans les parties de baby. **Julie**, merci pour ta bonne humeur contagieuse. **Franck**, merci d'accepter tes nombreuses défaites sans rager (ou pas). **Chloé**, merci pour ta douceur et bienveillance. **Charlotte**, merci de me faire mourir de rire à chaque fois que tu ouvres la bouche. **Lucas**, merci pour ces repas chez toi pleins de jeux en tout genre, promis je vais venir à l'escalade. **Solène**, merci pour tes punchlines. Merci également à tous ceux avec qui je n'ai pas eu la chance de partager un semestre, **Séléna**, **Solène**, **Maxime**, **Intissar**, **Amélie** on s'est bien rattrapé à l'extérieur du labo.

A mes co-internes et amis Nîmois, merci de m'avoir encouragé et jamais jugé (ou peut être que si haha) dans mes moments de folie post écriture. **Iona**, mon apprentie microbiologiste, je te remercie d'avoir si souvent pris le poste des urines et gardé le téléphone de l'enfer afin que je puisse travailler ma thèse (au détriment de ton étude pour n'oubliez pas les paroles, mais tqd tu vas finir maestro). **Rym**, ma chevrette du Sahara, « wallah » tes folles histoires de fête du pois chiche m'ont bien aidé à me changer les idées, nul doute que nous nous retrouverons en Guadeloupe à l'ombre d'un cocotier. **Massi**, le vrai Pr campylo, je te remercie de m'avoir conseillé et d'avoir relu ma discussion pendant mes grands moments de doute. **Marie**, collègue de thèse, merci pour l'entraide mutuelle et promis on fêtera ta réussite dans quelques mois.

Enfin, à mon **Emiliano**, mon pilier, mon clown, merci de me faire tellement rire que j'en pleure, merci de me soutenir dans chacun de mes projets et surtout merci d'être venu me demander si tu pouvais t'asseoir à coté de moi à la BU il y a maintenant plus de 4 ans. Ton humour, ta joie de vivre et ton amour son devenus indispensables à ma vie. Je te remercie également d'avoir relu ma thèse (de trop nombreuses fois), d'avoir passé des heures à m'écouter parler de techniques d'antibiogrammes et de SdFFF et de m'avoir si souvent conseillé. Il est fort probable que si tu ne m'avais pas confisqué mon téléphone pour que je travaille le concours ou pour que je me concentre sur cette thèse je n'en sois pas là. Enfin, merci de me faire penser à tout, d'être mon cerveau, mon confident, mon meilleur ami et de rendre ma vie plus lumineuse.

Enfin à **Pascale**, **Dominique**, **Aurélien** et **Miléna**, je vous remercie pour tous ces repas partagés au décours desquels j'ai eu la chance (ou pas haha) de goûter le fameux miget, pour les rires autour des jeux de société de l'après-midi et les crêpes du soir. Merci de m'avoir accueilli comme un membre à part entière de votre famille.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

AUC : Aire Sous la Courbe

BGN : Bacille à Gram Négatif

BLSE : Bêta Lactamase à Spectre Etendu

BMD : Broth MicroDilution

BP : Break Point

C3G : Céphalosporines de 3ème Génération

CA : Accord de Catégorie

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPias : Centres d'appui pour la Prévention des Infections Associées Aux Soins

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

DO : Densité Optique

ECBU : Examen CytoBactériologique des Urines

EGM : Élément Génétique Mobile

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FFF : Fractionnement par couplage Flux et Foc

FDA : Food and Drug Administration

GPIP : Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique

Groupe HACCEK : *Haemophilus* sp, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella* sp

HAS : Haute Autorité de Santé

ITU : Infection du Tractus Urinaire

MALDI-TOF : Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

ME : Major Error : erreur majeure

MH : Mueller Hinton

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OMSA : Organisation Mondiale de la Santé Animale

PBS : Phosphate-Buffered Saline : tampon phosphate salin

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

RAM : Résistance aux antimicrobiens

RAST : Test Rapide de Sensibilité aux Antimicrobiens

SdFFF : Fractionnement par couplage Flux et Force de Sédimentation

Se : Sensibilité

SFP : Sensible à Forte Posologie

Sp : Spécificité

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

UFC : Unité Formant Colonie

VME : Very Major Error : erreur très majeure

ZIT : Zone d'Incertitude Technique

Table des matières

Avant-propos.....	24
I. Introduction	25
I.1. Les antibiotiques.....	25
I.1.1. Histoire des antibiotiques.....	25
I.1.2. Mécanismes d'actions des antibiotiques utilisés dans ce travail	26
I.1.2.1. Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne	27
I.1.2.1.1. Les bêta-lactamines	28
I.1.2.1.2. Les acides phosphoniques	30
I.1.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse de l'ADN bactérien.....	31
I.1.2.2.1. Les Quinolones.....	31
I.1.2.2.2. Les sulfamides et les 2,4-diaminopyridines.....	32
I.1.2.3. Les nitrofuranes	32
I.2. La résistance aux antibactériens.....	33
I.2.1. Causes de l'antibiorésistance	34
I.2.2. Epidémiologie.....	36
I.2.3. Résistance innée ou acquise.....	38
I.2.3.1. La résistance innée	38
I.2.3.2. La résistance acquise	38
I.2.4. Mécanismes de résistance aux antibactériens.....	40
I.2.4.1. Inactivation enzymatique des antibiotiques	41
I.2.4.2. Diminution de la concentration d'antibiotique au niveau de la cible	43
I.2.4.2.1. Diminution de la perméabilité membranaire.....	43
I.2.4.2.2. Pompes d'efflux.....	44
I.2.4.3. Modification de la cible d'action.....	44
I.2.4.4. Protection de la cible.....	44
I.2.5. Plans d'action	45
I.3. <i>Escherichia coli</i>	47
I.3.1. La bactérie	47
I.3.2. Implications en médecine humaine.....	47
I.3.3. Résistances d' <i>E. coli</i>	48
I.3.3.1. Résistances naturelles	48
I.3.3.2. Résistances acquises	49
I.4. Infections du tractus urinaire et ECBU	51
I.4.1. L'infection du tractus urinaire : ITU	51
I.4.2. L'examen cyto bactériologique des urines : ECBU	52
I.4.3. Antibiogrammes ciblés et choix des molécules étudiées.....	53
I.4.4. Le traitement des ITU	55
I.4.4.1. Les cystites	55
I.4.4.2. Les pyélonéphrites	56
I.4.4.3. Les prostatites.....	56
I.5. Détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques	57
I.5.1. Tests phénotypiques	57
I.5.1.1. Tests en milieu liquide.....	57
I.5.1.1.1. Macrodilution en milieu liquide.....	57
I.5.1.1.2. Microdilution en milieu liquide	59

1.5.1.2. Tests en milieu solide ou gélosé	60
1.5.1.2.1. Méthode des disques.....	60
1.5.1.2.2. Méthode du gradient de diffusion.....	61
1.5.1.3. Interprétation des résultats de l'antibiogramme phénotypique	61
1.5.2. Tests génotypiques	62
1.5.3. Délai de rendu de l'antibiogramme d'un <i>Escherichia coli</i> isolé d'une urine	63
I.6. Les antibiogrammes phénotypiques rapides	65
1.6.1. Méthode RAST par diffusion gélosé	65
1.6.2. Méthodes innovantes commercialisées ou en cours de commercialisation.....	65
1.6.3. Méthodes innovantes en développement	67
I.7. Le fractionnement par couplage flux force (FFF).....	69
1.7.1. Principe	71
1.7.2. Mode d'élution	72
1.7.3. Applications actuelles	74
1.7.4. SdFFF et RAST	75
II. Objectifs de l'étude	77
III. Matériels et méthodes	78
III.1. Antibiotiques testés.....	78
III.1.1. Antibiotiques testés dans ce travail.....	78
III.1.2. Préparation des antibiotiques	78
III.1.2.1. Provenance et stockage des antibiotiques	78
III.1.2.2. Choix de la concentration finale des antibiotiques	79
III.2. Choix des souches bactériennes	80
III.2.1. Les souches d' <i>E. coli</i> composants le panel urinaire.....	80
III.2.2. Les souches sélectionnées pour la mise au point du test de sensibilité vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique via SdFFF.....	81
III.3. Tests conventionnels de sensibilité aux antibiotiques.....	81
III.3.1. Antibiogramme par dilution en milieu liquide : méthode de référence	81
III.3.2. Antibiogramme par gradient de diffusion en milieu gélosé : E-test.....	82
III.4. Tests de sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques par SdFFF	83
III.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien.....	83
III.4.2. Préparation des échantillons pour la SdFFF	84
III.4.3. Injection des bactéries dans la machine de SdFFF.....	86
III.4.3.1. Nettoyage de la machine.....	86
III.4.3.2. Paramètres d'élution	86
III.4.3.3. Injection des échantillons	87
III.4.3.4. Détection des bactéries et analyse du signal.....	90
III.4.4. Analyses statistiques (courbes ROC, seuils)	93
III.4.5. Evaluation des performances de la SdFFF selon la norme ISO 20776-2.....	94
III.5. Mise au point d'un protocole d'antibiogramme rapide par SdFFF directement à partir d'urines	95
III.5.1. Mise en place d'une collection d'urines.....	95
III.5.2. Injection des échantillons urinaires	95
III.5.2.1. Tests préliminaires	95
III.5.2.2. Test des conditions pré-analytiques	96
III.5.2.3. Injection d'urines non additionnées d'antibiotiques.....	97
III.5.2.4. Injection des premières urines additionnées d'antibiotiques	98

IV. Résultats.....	99
IV.1. Profil de résistance des souches étudiées	99
IV.2. Profils d'élutions des souches non traitées	100
IV.3. Antibiogrammes réalisés à partir de souches bactériennes par la méthode SdFFF comparés à la méthode de référence.....	100
IV.3.1. Construction des courbes ROC.....	100
IV.3.2. Construction des algorithmes décisionnels.....	102
IV.3.3. Résultats obtenus à partir des algorithmes.....	103
IV.4. Résultats obtenus pour l'amoxicilline-acide clavulanique.....	107
IV.4.1. Stratégie de sélection de souches appliquée dans ce travail pour la validation de la concentration d'acide clavulanique	107
IV.4.2. Construction de la courbe ROC de l'amoxicilline-acide clavulanique.....	107
IV.5. Performances globales de la méthode de SdFFF	109
IV.6. Zoom sur les erreurs de catégorisation clinique.....	110
IV.7. Antibiogramme rapide à partir d'échantillons d'urines : preuve de concept.....	112
IV.7.1. Tests préliminaires avec des suspensions de <i>E. coli</i>	112
IV.7.2. Test des conditions pré-analytiques : impact du borate	112
IV.7.3. Injection d'urines non traitées.....	114
IV.7.4. Injection d'urines additionnées d'antibiotiques.....	116
IV.7.4.1. Test de l'amoxicilline.....	116
IV.7.4.2. Test d'amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ciprofloxacine et triméthoprim- sulfaméthoxazole	118
V. Discussion	120
Conclusion	126
Références bibliographiques	127
Annexes	134
Serment De Galien.....	146

Table des illustrations

Figure 1 : Dates de mise sur le marché des différents antibiotiques (3).....	26
Figure 2 : Mécanismes d'actions des différents antibiotiques (en rouge ceux utilisés dans ce travail)	27
Figure 3 : Paroi des bactéries à Gram positif (gauche) ou négatif (droite) (4)	27
Figure 4 : Les 4 sous familles de bêta-lactamines	29
Figure 5 : Schématisation du mécanisme d'action des fluoroquinolones (14)	32
Figure 6 : Date d'apparition des résistances aux antibiotiques (19)	34
Figure 7 : Emergence de résistances par pression de sélection antibiotique	34
Figure 8 : Représentation de la transmission de la RAM entre les animaux, les humains et l'environnement	35
Figure 9 : Détail des décès reliés à une infection (21)	36
Figure 10 : Nombre de décès associés et attribuables à l'antibiorésistance dans le monde en 2019 (22).....	37
Figure 11 : Représentation schématique de la résistance innée et acquise	38
Figure 12 : Représentation d'une transformation bactérienne.....	39
Figure 13 : Représentation d'une conjugaison bactérienne	40
Figure 14 : Représentation de la transduction	40
Figure 15 : Représentation des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	41
Figure 16 : Classification des bêta lactamases selon Ambler	43
Figure 17 : Fondation du concept " One Health ", " une seule santé "(30)	46
Figure 18 : Représentation de la localisation des différents antigènes d' <i>E. coli</i>	47
Figure 19 : Différents sous types pathologiques de <i>E. coli</i> (35)	48
Figure 20 : Action des enzymes modifiant la fosfomycine. GSH : glutathion ; L-CySH : L-cystéine (36).....	50
Figure 21 : Pourcentages de souches de <i>E. coli</i> résistants aux antibiotiques en ville et à l'hôpital (38) (39)	50
Figure 22 : Photo de gélose non sélective électrolyte déficient (à gauche) et chromogène (à droite) contenant de l' <i>E. coli</i>	52
Figure 23 : Principe de la macrodilution en milieu liquide	58
Figure 24 : Schéma d'une plaque de microdilution en milieu liquide	59
Figure 25 : Principe d'automatisation de la microdilution en milieu liquide (carte Vitek 2)	60
Figure 26 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode des disques	60
Figure 27 : Principe de détermination de la CMI par la méthode du gradient de diffusion.....	61

Figure 28 : Principe de catégorisation "sensible" à la nitrofurantoïne selon la CMI de cette souche	62
Figure 29 : Principe de la catégorisation "sensible" à la fosfomycine selon le diamètre d'inhibition de la souche	62
Figure 30 : Prise en charge classique d'un ECBU au laboratoire.....	64
Figure 31 : Représentation schématique d'une plateforme FFF.....	69
Figure 32 : Schématisation des différents types de champ de séparation utilisés en FFF (67)	70
Figure 33 : Représentation schématique d'un canal séparateur de FFF	71
Figure 34 : Exemple de fractogramme d'une souche de <i>E. coli</i> non additionnée d'antibiotique	72
Figure 35 : Représentation schématique d'un mode d'élution normal en FFF.....	73
Figure 36 : Représentation schématique d'un mode d'élution inversé en FFF	73
Figure 37 : Représentation schématique d'un mode d'élution "hyperlayer" en FFF	74
Figure 38 : Principe de la méthode de SdFFF (67).....	75
Figure 39 : Gamme de taille des analytes pris en charge par modes de FFF et modes d'élution associés (67).....	76
Figure 40 : Extrait des recommandations du CA-SFM 2023 permettant l'interprétation de la CMI de la nitrofurantoïne	79
Figure 41 : Extrait des recommandations du CA-SFM 2023 et introduction des zones de « sensibilité à forte posologie »	79
Figure 42 : Schématisation de la réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide (BMD)....	82
Figure 43 : Schéma du processus de réalisation d'un antibiogramme par la méthode du gradient de diffusion en milieu gélosé.....	83
Figure 44 : Schématisation du repiquage des souches bactériennes	83
Figure 45 : Schématisation de la réalisation de la suspension bactérienne pour la SdFFF ...	84
Figure 46 : Préparation des échantillons pour la SdFFF	84
Figure 47 : Suite de la préparation des échantillons pour la SdFFF.....	85
Figure 48 : Schématisation de la machine de SdFFF paramètres classiques	87
Figure 49 : Fractogramme de l'injection de benzoate de sodium (t_0).....	88
Figure 50 : SdFFF en mode "injection" et tracé du chemin de l'analyte jusqu'au canal de séparation (vert)	88
Figure 51 : SdFFF en mode "stop flow" et tracé du chemin de l'analyte vers la poubelle (vert)	89
Figure 52 : Schématisation de la séparation bactérienne au sein du canal.....	90
Figure 53 : Fractogramme "contrôle" d'une souche de <i>E. coli</i>	91

Figure 54 : Fractogramme de la souche DAM-EC003 sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique avec la courbe de la souche contrôle (orange) et la courbe de la souche additionnée d'antibiotique (bleu) qui présente un PΔR à 15,50% et un PΔAUC à 81,48%	92
Figure 55 : Fractogramme de la souche DAM-EC055 résistante à l'amoxicilline-acide clavulanique avec la courbe de la souche contrôle (orange) et la courbe de la souche additionnée d'antibiotique (bleu) qui présente un PΔR à 0% et un PΔAUC à 5,71%	93
Figure 56 : Représentation d'une courbe ROC associée à un test non prédictif (gauche) et une courbe ROC associée à un test idéal (droite)	93
Figure 57 : Détermination de la densité optique en 2h, 4h et 6h selon la concentration bactérienne	96
Figure 58 : Test des conditions pré-analytiques.....	97
Figure 59 : Protocole de test des urines non traitées	98
Figure 60 : Pourcentage de souches de <i>E. coli</i> résistantes dans notre étude comparé à la prévalence des résistances observée via les missions SPARES et PRIMO	99
Figure 61 : Dispersion des temps de rétention en minutes des échantillons non traités.....	100
Figure 62 : courbe ROC du mécillinam, de la témocilline, du céfixime, de la nitrofurantoïne et de la fosfomycine (dans l'ordre).....	101
Figure 63 : Algorithmes décisionnels vis-à-vis des différents antibiotiques testés.....	103
Figure 64 : Répartition des CMI en fonction des antibiogrammes obtenus par SdFFF et de la méthode de référence	106
Figure 65 : Fractogramme de la souche DAM-EC026 sensible au céfixime avec la courbe de la souche contrôle (orange) présentant deux pics et la souche additionnée de céfixime (bleu)	106
Figure 66 : Courbe ROC pour l'association amoxicilline-acide clavulanique	108
Figure 67 : Algorithme décisionnel concernant l'amoxicilline-acide clavulanique	108
Figure 68 : Répartition des CMI amoxicilline-acide clavulanique des 68 souches de <i>E. coli</i> en fonction des antibiogrammes obtenus par SdFFF	109
Figure 69 : Fractogramme de la souche DAM-EC005 avec la courbe de la souche contrôle (orange) et la courbe de la souche additionnée de fosfomycine (en bleu)	110
Figure 70 : Fractogramme de la souche DAM-EC081 avec la courbe de la souche non additionnée d'antibiotique (orange) et la courbe de la souche additionnée d'amoxicilline-acide clavulanique (bleu).....	111
Figure 71 : Fractogramme de l'urine 4.....	113
Figure 72 : Fractogramme de l'urine 5.....	114
Figure 73 : Fractogramme de l'urine 9 (orange) et de l'urine 10 (bleu).....	115
Figure 74 : Fractogramme obtenu à partir de l'urine 11 avec la courbe de l'urine contrôle (orange) et la courbe de l'urine additionnée d'amoxicilline (bleu).....	116
Figure 75 : Fractogramme obtenu à partir de l'urine 12 avec la courbe de l'urine contrôle (orange) et la courbe de l'urine additionnée d'amoxicilline (bleu).....	117

Figure 76 : Algorithme décisionnel concernant l'amoxicilline (67)	117
Figure 77 : Algorithmes décisionnels de la ciprofloxacine et du triméthoprime-sulfaméthoxazole (67)	118
Figure 78 : Fractogramme de l'urine 13 avec le contrôle (orange), l'amoxicilline (bleu), l'amoxicilline acide clavulanique (violet), la ciprofloxacine (rouge) et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (vert)	119

Table des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque de complication des ITU [41]	51
Tableau 2 : Guide des antibiotiques à rendre (cases orange) lors d'antibiogrammes ciblés selon le profil de résistance de la bactérie en cause [35] avec les antibiotiques du panel urinaire en vert et les antibiotiques testés dans une précédente étude en bleu.	54
Tableau 3 : Méthodes commercialisées ou en cours de commercialisation	67
Tableau 4 : Antibiotiques testés dans ce travail	78
Tableau 5 : Volumes et concentrations des antibiotiques utilisés	80
Tableau 6 : Discordance entre les différentes méthodes utilisées en routine	102
Tableau 7 : Variables de décisions déterminées par courbe ROC	102
Tableau 8 : Résultats de SdFFF obtenus à partir des algorithmes décisionnels ci-dessus comparés à la méthode de référence	104
Tableau 9 : Variables de décision déterminées par la courbe ROC vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique	108
Tableau 10 : Résultats de SdFFF obtenus à partir des algorithmes décisionnels ci-dessus comparés à la méthode de référence	109
Tableau 11 : Performances globales de la SdFFF en comparaison à la méthode de référence	110
Tableau 12 : Pourcentage de souches obtenant une $DO_{600nm} \geq 0,5$ selon le temps d'incubation et la concentration bactérienne en bactéries/mL (bact/mL)	112
Tableau 13 : Résultats des tests concernant le borate sur les urines 4 et 5	113
Tableau 14 : Résultats du protocole sur les urines non traitées	115
Tableau 15 : Résultats issus des fractogrammes des urines 11 et 12	117
Tableau 16 : Résultats issus du fractogramme de l'urine 13 (boraté)	119

Avant-propos

L'histoire de l'humanité a, de tout temps, été ponctuée d'épidémies qui ont causé de nombreux morts. C'est dans ce contexte, que l'avènement des antibiotiques a révolutionné l'histoire de la médecine, en sauvant un nombre incalculable de vies. Dès la découverte de la pénicilline et de ses effets miraculeux, les chercheurs se mirent en quête de nouveaux mycètes révolutionnaires. A partir de 1940, des dizaines d'antibiotiques furent mis sur le marché, on parle alors de l'âge d'or des antibiotiques, qui a pris fin dans les années 70. Depuis, très peu de molécules furent mises sur le marché et devant les effets prodigieux de ceux-ci, les antibiotiques ont été utilisés massivement. Ce mésusage a accéléré l'émergence et la dissémination des résistances bactériennes. L'antibiorésistance a aujourd'hui atteint des records, jusqu'à induire des impasses thérapeutiques chez certains patients, en faisant l'une des préoccupations prioritaires de l'OMS.

La résistance aléatoire et de plus en plus fréquente des bactéries impose aux microbiologistes de vérifier la sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques via la réalisation d'antibiogrammes afin de mettre en place un traitement ciblé. Malheureusement, ces méthodes conventionnelles ne permettent pas un rendu de résultats assez rapide pour instaurer, en premier lieu, un traitement ciblé, conduisant à de nombreuses antibiothérapies probabilistes à large spectre.

Les infections urinaires font partie des infections les plus fréquentes en médecine humaine et sont pourvoyeuses d'un grand nombre d'antibiothérapies probabilistes. De plus, ces infections sont causées, dans la majorité des cas, par une bactérie particulièrement porteuse de résistances : *Escherichia coli*.

C'est dans ce contexte que ce travail s'inscrit. Il a pour but de proposer une méthode fiable, robuste et rapide d'antibiogramme, en moins de trois heures, utilisant un procédé novateur permettant de séparer les bactéries selon leur réponse à l'antibiotique. Cette méthode porte le nom de SdFFF (Fractionnement par couplage Flux et Force de Sédimentation) et pourrait permettre, à terme, une amélioration de la prise en charge du patient et la préservation de l'écologie microbienne.

I. Introduction

I.1. Les antibiotiques

Le terme antibiotique fut décrit pour la première fois par Selman Waksman en 1947 dans son article « qu'est-ce qu'un antibiotique ou une substance antibiotique ? ». Selon lui, un antibiotique est une substance chimique, produite par un micro-organisme ayant la capacité d'inhiber la croissance ou même de détruire d'autres micro-organismes (1). Le terme antibiotique, dérive du mot « antibiose » défini par Vuillemin comme toute relation biologique dans laquelle un être vivant en détruit un autre pour assurer sa propre existence. Il englobe aujourd'hui les molécules naturelles mais également les molécules semi-synthétiques et entièrement synthétiques.

Malgré une définition qui est longtemps restée floue, les antibiotiques occupent une place primordiale dans la médecine actuelle et sont incontestablement le plus grand progrès médical du vingtième siècle. En effet, en à peine 100 ans, les antibiotiques ont révolutionné l'histoire de l'humanité en sauvant d'innombrables vies.

I.1.1. Histoire des antibiotiques

La peste noire, la syphilis, le typhus, ... De tout temps, l'humanité a connu des épidémies, source de nombreux décès. Durant le 19^{ème} siècle, les maladies infectieuses sont considérées comme la plus grande cause de morbidité et de mortalité, chez les adultes comme chez les enfants. A la fin de ce siècle, les scientifiques sont parvenus à relier ces maladies à la présence de micro-organismes microscopiques (2). Dès lors, des recherches ont été menées dans le but de traiter la cause de ces maladies en ciblant les micro-organismes en cause.

La première molécule curative déployée fut l'arsphénamine. Elle a été mise au point par le scientifique allemand Ehrlich et le bactériologiste japonais Hata en 1909. Elle est aujourd'hui considérée comme le premier « agent chimiothérapeutique moderne ». Cette molécule, plus connue sous le nom de Salvarsan ou 606, est le 606^{ème} dérivé arsenical mis au point par le duo, lui conférant ainsi ce surnom. Il fut utilisé pour traiter la syphilis pendant une dizaine d'années puis abandonné à cause de sa toxicité. Cet antibiotique a toutefois permis d'ouvrir la voie à de nombreux autres composés.

En 1928, la parution d'un article d'Alexander Fleming, fait prendre un nouveau tournant dans l'histoire des antibiotiques. Dans celui-ci il décrit l'étrange phénomène se produisant lors de ses recherches sur les lysozymes : « autour d'une large colonie de moisissure contaminante, les colonies de staphylocoques sont devenues transparentes et visiblement en cours de lyse ». Le champignon en question était en réalité *Penicillium notatum*, dont dériveront plus tard les premières doses de pénicilline. Cette molécule, aujourd'hui emblématique, ne sera utilisée que bien plus tard du fait de la grande difficulté à la synthétiser en quantité suffisante à partir de *Penicillium notatum*.

En 1932, le Prontosil voit le jour, à défaut d'être le premier antibiotique sur le marché il fut néanmoins le premier antibiotique à être aussi largement connu. Sa popularité est apparue

lorsqu'il a contribué à guérir le président Roosevelt d'une angine à Streptocoque, et ce malgré la méfiance de bon nombre de ses médecins. Domagk, père de ce nouvel antibiotique l'a également utilisé pour sauver sa fille de l'amputation du bras (3).

Vint ensuite l'avènement des pénicillines, lorsqu'en 1942, une quantité suffisante de la molécule est extraite de *Penicillium chrysogenum*. Cette avancée va permettre de guérir le premier d'une longue série de patients. Durant la seconde guerre mondiale, le large usage de la molécule permet de sauver un nombre incalculable de soldats. C'est le début de l'âge d'or des antibiotiques. Une vraie révolution médicale s'opère et pousse les scientifiques du monde entier à chercher de nouveaux « mycètes » miracles. Au fil des ans, des dizaines et des dizaines de nouveaux antibiotiques voient le jour (Figure 1). Ils sont classés selon leur mécanisme d'action, leur spectre ou encore leur origine synthétique ou naturelle.

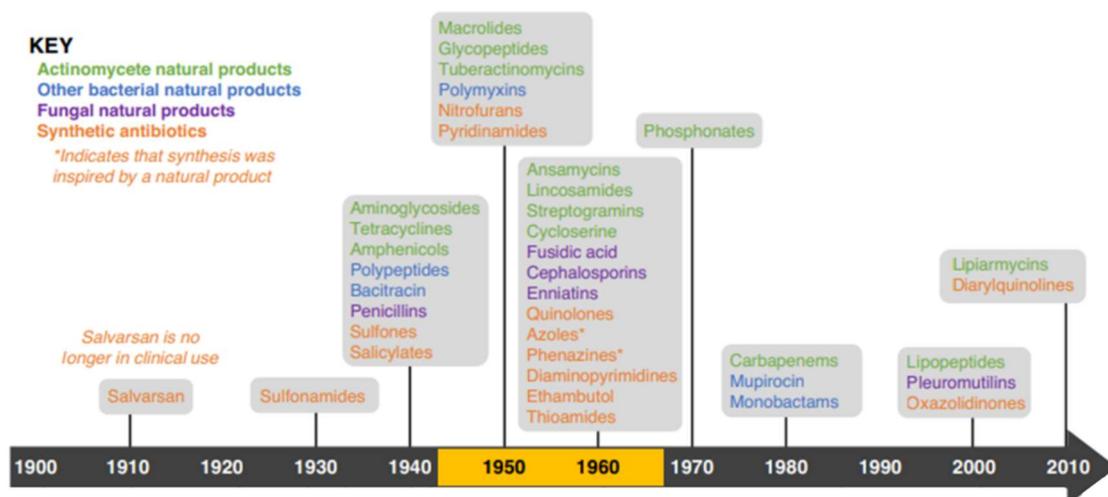


Figure 1 : Dates de mise sur le marché des différents antibiotiques (3)

I.1.2. Mécanismes d'actions des antibiotiques utilisés dans ce travail

Les antibiotiques ont différents mécanismes d'actions permettant leur classement en plusieurs groupes. Les 3 principaux sont : l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, l'action sur les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN/ARN et l'inhibition de la synthèse protéique (antibiotiques non évoqués ici car non utilisés dans ce travail) (Figure 2).

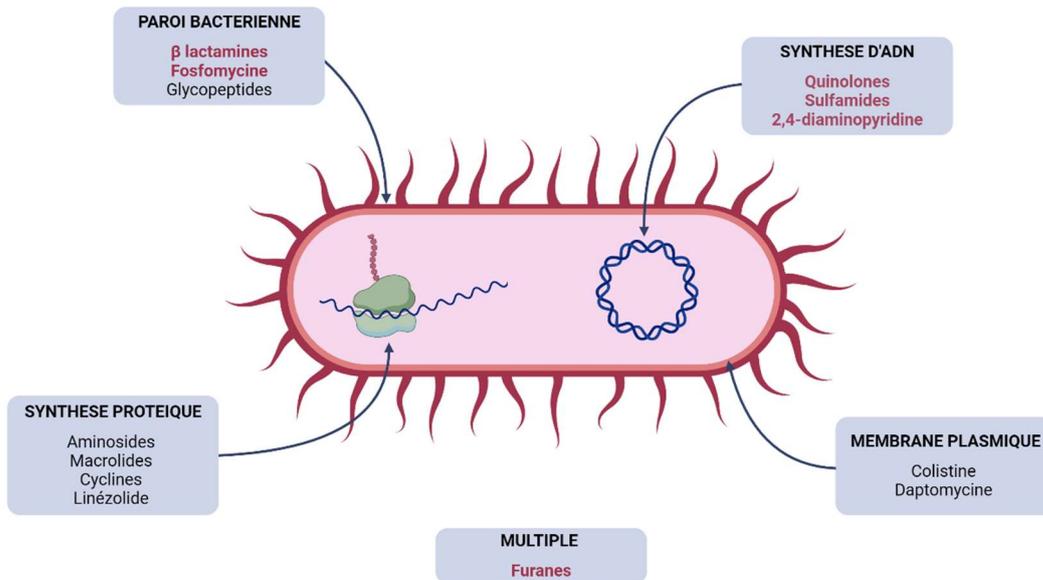


Figure 2 : Mécanismes d'actions des différents antibiotiques (en rouge ceux utilisés dans ce travail)

I.1.2.1. Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est un composant essentiel dans la vie de la bactérie. La moindre altération de son intégrité engendre la mort bactérienne, en faisant une cible de choix pour les antibiotiques.

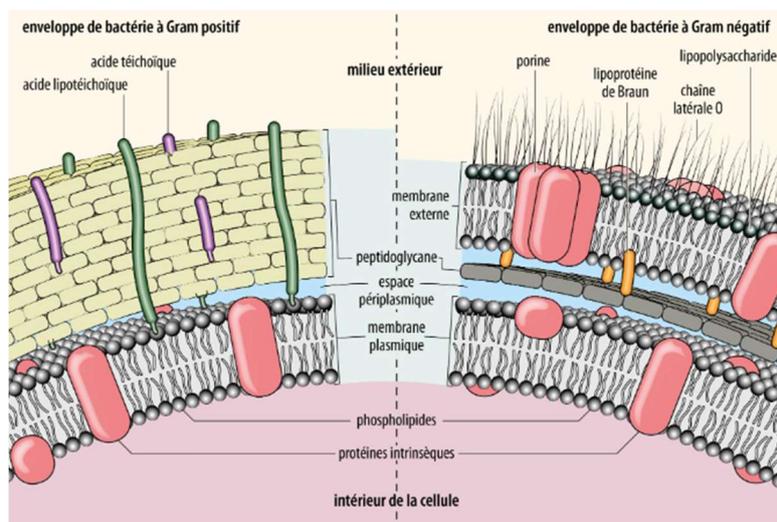


Figure 3 : Paroi des bactéries à Gram positif (gauche) ou négatif (droite) (4)

Le peptidoglycane est le composant majoritaire de la paroi bactérienne. Sa densité détermine la perméabilité de la paroi et donc les propriétés tinctoriales propres à chaque bactérie. En effet, chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane abondant forme un

maillage très serré et, à l'inverse, les bactéries à Grams négatif ont une quantité moins abondante de peptidoglycane ce qui permet de ménager un espace périplasmique entre la membrane externe (pourvue de porines) et la membrane cytoplasmique (Figure 3). Cette caractéristique permet de classer les bactéries en fonction de leur réponse à la coloration de Gram qui doit son nom au danois Hans Christian Gram. Cette coloration repose sur la différence de maillage du peptidoglycane de chaque espèce bactérienne et est composée de 5 grandes étapes : fixation par la chaleur ou l'alcool, coloration au violet de gentiane, stabilisation par le lugol, décoloration par l'alcool et contre-coloration via la fuschine. Cette contre-coloration est possible uniquement pour les bactéries ayant un maillage suffisamment lâche pour permettre ces deux dernières étapes, les bactéries sont alors roses les classant ainsi en tant que bactéries à Gram négatif. Quant aux bactéries à Gram positif, elles possèdent un peptidoglycane plus épais, la première coloration est retenue, elles apparaissent alors en violet.

Le peptidoglycane est synthétisé en trois étapes : dans un premier temps, le précurseur est synthétisé sous forme de monomères dans le cytoplasme (cible d'action de la fosfomycine), dans un second temps, il est transporté à travers la membrane cytoplasmique et transformé en dimères. Enfin dans un dernier temps, les dimères sont assemblés entre eux par les protéines liant les pénicillines, les PLP. Ces PLP sont les protéines permettant le maillage correct de la paroi, oscillant entre dégradation et synthèse (action des bêta-lactamines). (5) Trois familles d'antibiotiques agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane et donc de la paroi bactérienne. Leur action entraîne la lyse via un système complexe d'enzymes régulatrices appelées les autolysines. Il s'agit des :

- Bêta-lactamines : famille d'antibiotiques primordiale en clinique, par leur utilisation ainsi que par la quantité de molécules disponibles.
- Acides phosphoniques : représentés par la fosfomycine, molécule majeure dans le traitement des infections du tractus urinaire.
- Glycopeptides : non détaillés ici car ne faisant pas partie des molécules testées dans ce travail.

1.1.2.1.1. Les bêta-lactamines

Les bêta-lactamines représentent la famille d'antibiotiques la plus prescrite. Du point de vue chimique, toutes les molécules de cette famille ont un cycle de base commun : le cycle bêta-lactame qui donne son nom à cette classe. Les bêta-lactamines sont divisées en quatre sous familles : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Figure 4).

Ces molécules, par analogie structurale avec un composant du peptidoglycane, se lient aux PLP. Cette liaison empêche les PLP d'effectuer l'ultime étape d'assemblage des dimères de précurseurs en peptidoglycane et entraîne ainsi la lyse bactérienne (6), leur effet est alors décrit comme bactéricide.

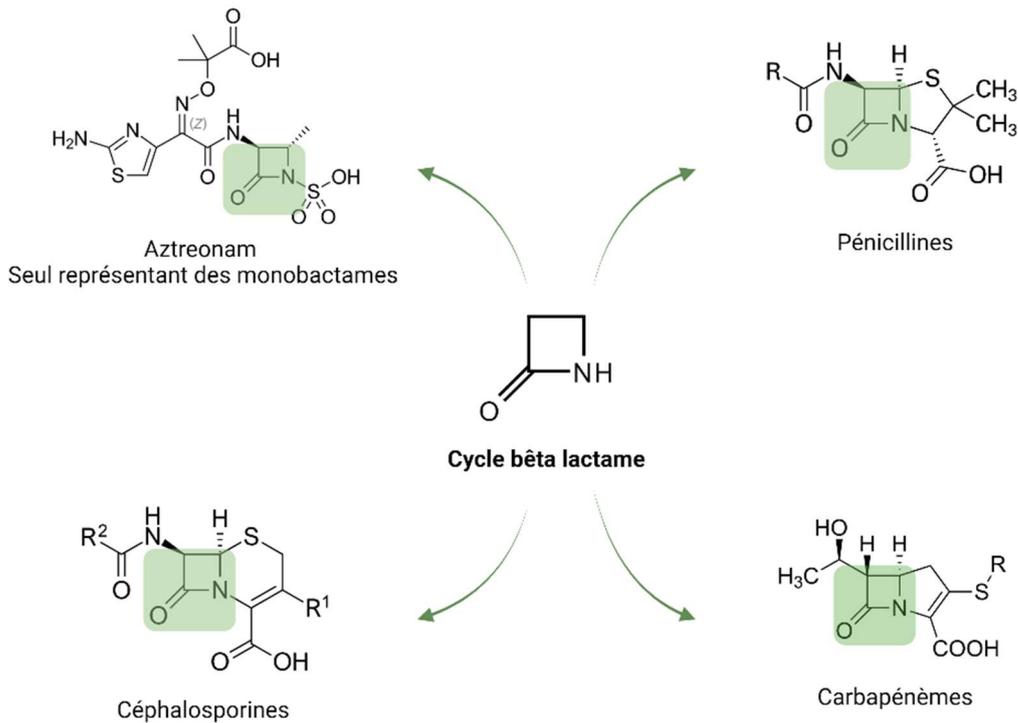


Figure 4 : Les 4 sous familles de bêta-lactamines

La pénicilline G est historiquement la première molécule de cette famille, qui, au fil du temps s'est considérablement agrandie. Très efficace dans le traitement de la syphilis, elle présente néanmoins l'inconvénient d'être sensible aux acides et donc d'être instable à l'étage gastrique, de plus cette molécule possède un spectre peu étendu. L'amoxicilline lui a succédé en 1970 (7), avec l'avantage d'être administrable par voie orale et d'avoir un spectre d'activité élargi par rapport à la pénicilline G, notamment sur les entérobactéries. Malgré les nombreux antibiotiques développés à cette époque, une ombre apparaît au tableau, en effet les pénicillinases, principales enzymes capables d'hydrolyser les pénicillines deviennent de plus en plus fréquentes. Le nouvel enjeu fut alors de rechercher une molécule active sur ces enzymes. C'est dans ce contexte que l'acide clavulanique attire l'attention en 1972, il s'agit d'une bêta-lactamine isolée de *Streptococcus clavuligerus* possédant une activité antibiotique très faible mais une liaison irréversible avec les bêta-lactamases en faisant un candidat idéal pour lutter contre ces enzymes. Une dizaine d'années plus tard, l'amoxicilline est choisie grâce à son large spectre d'action pour être coadministrée à l'acide clavulanique. C'est la naissance de l'association amoxicilline-acide clavulanique (8).

Par la suite, assimilable à la sous-famille des pénicillines, les amidinopénicillines arrivent sur le marché dans les années 1970. Cette famille contient le pivmécillinam qui est le bio-précurseur du mécillinam, ayant la particularité d'avoir une affinité plus importante pour les PLP2 et donc, d'être plus affiné pour les bactéries à Gram négatif. Cet antibiotique, peu utilisé en France, remboursé depuis à peine 2013, est largement employé dans les pays nordiques. Son regain de popularité réside dans sa stabilité vis-à-vis des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) (9).

Ensuite, la témocilline est commercialisée en 1984, elle est dérivée d'une uréido-pénicilline : la ticarcilline, à laquelle un cycle alpha-méthoxy est ajouté. Celui-ci bloque les bêta-lactamases, menant à leur hydrolyse. Cela explique sa grande stabilité vis-à-vis des

enzymes hydrolysant les pénicillines ce qui lui confère un spectre élargi par rapport aux premières molécules (10). Cependant, cette modification a pour conséquence une affinité pour un plus grand nombre de PLP, ce qui altère son efficacité sur les bacilles à Gram négatif, contrairement au mécilinam. Cela a eu comme conséquence un désintérêt vis-à-vis de cette molécule et ce jusqu'à l'apparition des BLSE et des céphalosporinases de haut niveau, enzymes très répandues contre lesquelles elle conserve une bonne efficacité (10) (11).

À la suite des pénicillines, les céphalosporines sont apparues en 1964. Les générations de céphalosporines se sont succédées pour aboutir à la cinquième génération actuellement. Ces molécules sont dotées d'un spectre large contrastant avec une faible biodisponibilité orale, ce qui impose souvent une administration parentérale. La seule céphalosporine orale de notre étude est le céfixime. Il s'agit d'une céphalosporine de troisième génération dont l'utilisation est limitée aux cystites simples à cause de sa mauvaise diffusion tissulaire et de son large spectre délétère pour le microbiote intestinal.

L'aztréonam est, quant à lui, le seul représentant de la sous famille des monobactames. Il présente l'avantage, grâce à son cycle unique, de ne pas provoquer d'allergies croisées avec les autres bêta-lactamines (effet indésirable fréquent de cette classe médicamenteuse) mais également de ne pas être hydrolysé par certaines enzymes de type bêta-lactamases.

Pour finir, les carbapénèmes, développés fin 1970 pour faire face aux résistances croissantes des bactéries, représentent les médicaments dits « de secours » lorsque la bactérie ciblée est multirésistante. Il est nécessaire de préserver ces molécules, afin de limiter leur impact sur l'écologie microbienne et de provoquer l'apparition de nouvelles résistances.

1.1.2.1.2. Les acides phosphoniques

La seule molécule de cette classe, la fosfomycine, agit en inhibant la synthèse du précurseur du peptidoglycane, composé majoritaire de la paroi.

La fosfomycine doit pénétrer à travers la paroi afin d'atteindre son site d'action qui est localisé dans le cytoplasme bactérien. Son acheminement est permis par deux types de transporteurs : le L-glycérophosphate qui est constitutif et les hexoses monophosphates qui sont inductibles et semblent être le moyen de transport majoritaire. L'induction de ce transporteur est nécessaire à l'activité de la fosfomycine qui doit donc impérativement être couplée à un inducteur : le glucose-6-phosphate (9). Par analogie avec le phosphoénolpyruvate, la fosfomycine inhibe la pyruvyl-transférase qui forme, normalement, les monomères de peptidoglycane. Cela conduit à un arrêt de synthèse de la paroi par manque de peptidoglycane et donc à la mort bactérienne : l'effet de la fosfomycine est donc également bactéricide (6).

Son spectre d'action est très large mais la fosfomycine seule est administrable uniquement par voie intraveineuse et est réservée à l'usage hospitalier. Pour permettre une utilisation orale de la fosfomycine, une molécule de trométhamine est ajoutée au radical phosphorique permettant la formation d'un sel, ce qui assure la stabilité de la molécule et permet donc son utilisation per os. On parle de fosfomycine-trométamol, c'est cette spécialité qui est indiquée en première intention dans les cystites simples.

I.1.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse de l'ADN bactérien

La réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes et fait intervenir de nombreuses enzymes. Le but est de synthétiser un nouveau brin d'ADN, sur la base du brin pré existant afin d'obtenir deux copies du même modèle. L'altération de l'une ou plusieurs de ces différentes étapes conduit à la mort de la cellule bactérienne par apoptose.

La multiplication débute par la synthèse d'une protéine initiatrice qui effectue une coupure simple brin de l'ADN qui libère l'extrémité 3', c'est la création de l'œil de réplication. L'ouverture du brin d'ADN va créer une contrainte topologique importante soulagée par les topoisomérases (dont la II est appelée ADN gyrase chez les bactéries). L'extrémité libérée va servir d'amorce à l'ADN polymérase de type III qui assure la réplication. Interviennent ensuite les hélicases qui coupent les liaisons hydrogènes entre les deux brins d'ADN, permettant de le dérouler. Les topoisomérases jouent, là aussi, un rôle primordial : elles sont situées en aval de la fourche de réplication et suppriment les contraintes subies par l'ADN, ce qui permet à l'hélicase de progresser. Viennent ensuite l'élongation et la terminaison du nouveau brin d'ADN (12).

Les antibiotiques qui agissent sur la synthèse d'ADN ciblent les enzymes impliquées dans la réplication et/ou la transcription de l'ADN. Cette action est possible uniquement sur les cellules en division entraînant un blocage de la réplication et donc la mort de la bactérie.

I.1.2.2.1. Les Quinolones

En 1958, la première quinolone est découverte à partir de la chloroquine, il s'agit de l'acide nalidixique, indiqué dans le traitement des infections urinaires, ciblant les bacilles à Gram négatif. L'amélioration constante de l'efficacité de ces molécules, appelées « quinolones de première génération » a provoqué leur déclin au profit des fluoroquinolones.

En 1980, les chimistes parviennent à ajouter un atome de fluor en position 6 de l'acide nalidixique ce qui a permis d'élargir le spectre et d'améliorer la biodisponibilité. C'est la naissance des fluoroquinolones, également appelées quinolones de deuxième génération. Parmi ces nouvelles quinolones, on retrouve la norfloxacin, l'ofloxacin et la **ciprofloxacine**. Elles ont pour avantage, en plus de leur très large spectre d'action, d'avoir une excellente diffusion tissulaire.

Vient ensuite la troisième génération de quinolones, dite « anti pneumococciques », avec pour représentants la moxifloxacin et la lévofloxacin, qui ciblent plus spécifiquement les streptocoques et les bactéries anaérobies strictes.

Ces fluoroquinolones agissent sur deux enzymes : les topoisomérases II et les topoisomérases IV essentielles pour la réplication de l'ADN (Figure 5). Ces antibiotiques ont la capacité de former un complexe ternaire avec ces enzymes, ce qui empêche leur fonctionnement, bloque la réplication de l'ADN et entraîne la mort de la cellule bactérienne : l'action est, là aussi, bactéricide. Les topoisomérases II sont les cibles de ces molécules chez les bactéries à Gram négatif, en effet, elles sont responsables du super enroulement de l'ADN. Les topoisomérases IV, quant à elles sont les cibles chez les bactéries à Gram positif, elles

sont impliquées dans le déroulement de l'ADN (9) (13). Les quinolones de première génération ne sont actives que sur les topoisomères II, expliquant leur spectre d'action étroit.

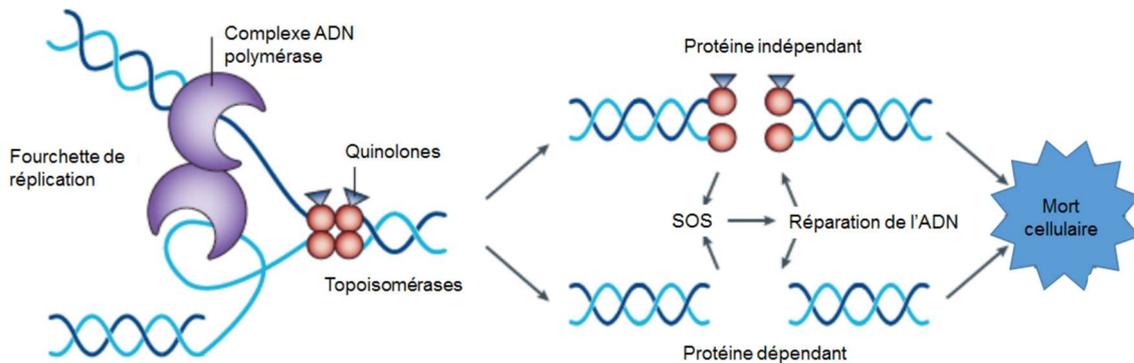


Figure 5 : Schématisation du mécanisme d'action des fluoroquinolones (14)

I.1.2.2.2. Les sulfamides et les 2,4-diaminopyridines

Les sulfamides forment une grande famille unie par la présence d'un cycle sulfonamide dans leur structure. Ils sont dérivés du para-aminobenzène-sulfonamide (PABA). La substitution sur le cycle sulfonamide conditionne la vitesse d'action de la molécule dans l'organisme, en découlent alors les sulfamides rapides (sulfadiazine) et les sulfamides semi-retard (sulfaméthoxazole et sulfafurazole).

Les sulfamides ont une activité bactériostatique par inhibition de la dihydroptéroate synthétase (DHPS). Cette inhibition est consécutive à l'analogie du médicament avec le PABA duquel il dérive. La dihydroptéroate synthétase permet, en condition normale, de former l'acide folinique, nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. La diminution de sa production empêche l'élongation de l'ADN, ce qui cause l'arrêt de la réplication bactérienne.

Le sulfaméthoxazole agit en synergie avec le triméthoprim, qui fait partie des 2,4-diaminopyridines, lui aussi actif sur la synthèse d'ADN. Il agit par inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) et inhibe également la synthèse d'acide folinique. Le pouvoir bactériostatique du triméthoprim couplé à celui du sulfaméthoxazole permet une activité bactéricide de l'association.

I.1.2.3. Les nitrofuranes

Connue depuis 1940 et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1953, la **nitrofurantoïne** (seul représentant de la classe) a été le traitement de premier choix des cystites simples pendant trois décennies, et ce jusqu'à l'avènement des fluoroquinolones, dans les années 70. À la suite des nombreuses résistances développées par les bactéries après la large utilisation des quinolones, la nitrofurantoïne est revenue sur le devant de la scène et est réapparue dans les recommandations de traitement des cystites.

Le mécanisme d'action de cette molécule est longtemps resté flou et n'est pas encore, à ce jour, totalement élucidé. Nous savons aujourd'hui que c'est une combinaison de mécanismes d'actions qui permet à la molécule d'agir. (15) La nitrofurantoïne serait réduite, par des flavoprotéines, en composés toxiques pour différentes enzymes. D'une part, elle aurait une action sur les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN et d'autre part, elle inhiberait les enzymes permettant la synthèse de la paroi bactérienne. La diversité de ses cibles rend les résistances acquises à cette molécule extrêmement rares, ce qui en fait un antibiotique de choix dans le traitement des infections urinaires (16) (10).

I.2. La résistance aux antibactériens

Il est indéniable que la découverte des antibiotiques dans le début des années 1940 a révolutionné la médecine actuelle et a conduit à une réduction de la mortalité sans précédent. Cependant, cette révolution s'est accompagnée d'un revers de médaille défini sous le nom d'antibiorésistance (Figure 6). Elle est définie par l'OMS comme la capacité d'un micro-organisme à se développer et à survivre en présence de l'antibiotique. En effet, tout agent thérapeutique peut être compromis par un phénomène de résistance, ceci est d'autant plus vrai pour les molécules actives sur des organismes vivants, faisant preuve d'adaptabilité. Cette résistance aux antibiotiques est devenue un défi mondial et est considérée comme l'une des plus grandes menaces sanitaires du XXI^{ème} siècle, toujours selon l'OMS.

Toute personne, quel que soit son âge, son sexe ou son pays est susceptible d'être impactée par ce phénomène. Les mécanismes de résistance sont multiples et peuvent être innés ou acquis. L'acquisition de mécanismes de résistance est un phénomène naturel, en effet certains antibiotiques étant des métabolites issus de micro-organismes retrouvés dans l'environnement dans lequel les bactéries évoluent, une pression de sélection a déjà été exercée. Il en résulte des phénotypes de résistance dits « innés » à certaines molécules utilisées en médecine humaine et animale. Par exemple la pénicilline est un métabolite issu du champignon *Penicillium notatum*, dont les premières résistances ont été décrites en 1940, avant même sa commercialisation, en 1942. Nous pouvons également noter l'exemple de souches bactériennes mises en évidence au sein d'une cavité isolée depuis 4 millions d'années, résistantes à 14 antibiotiques commercialisés aujourd'hui, dont la daptomycine un antibiotique récent actif sur les bactéries à Gram positif (17).

Cependant cela est à nuancer, la résistance bactérienne est, effectivement, un mécanisme naturel mais il est accéléré par le mésusage et l'utilisation massive des antibiotiques. Couplés à cela, l'importance de la transmission de cette antibiorésistance et le manque de nouvelles molécules antibiotique font qualifier ce phénomène « d'épidémie silencieuse ». Il est primordial de freiner l'acquisition et la dissémination de cette antibiorésistance qui rend certaines souches bactériennes difficiles voire impossible à traiter. Sans mesures urgentes, des infections aujourd'hui bénignes redeviendront mortelles (18).

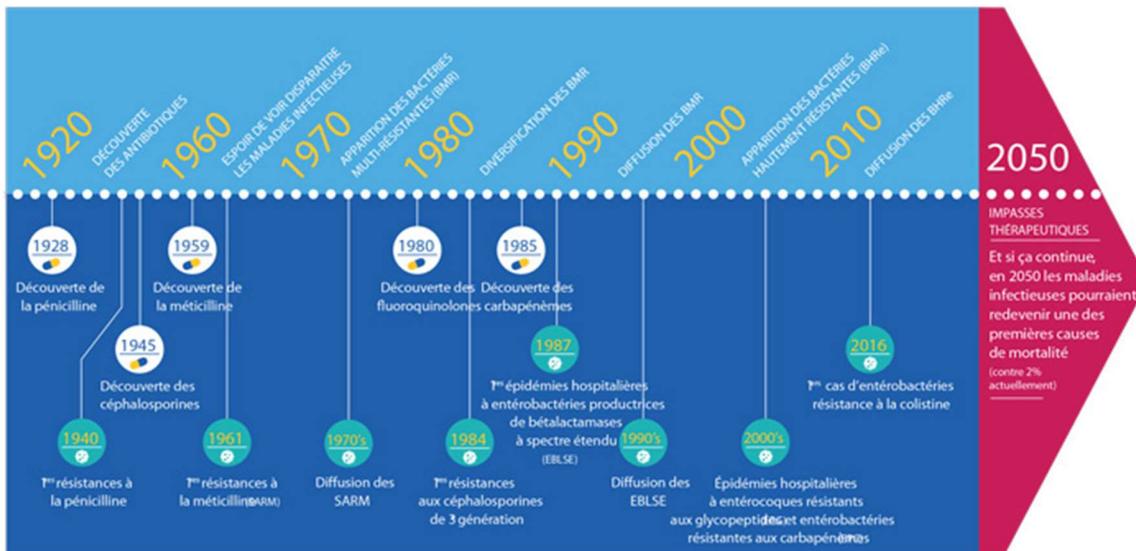


Figure 6 : Date d'apparition des résistances aux antibiotiques (19)

1.2.1. Causes de l'antibiorésistance

L'émergence de la résistance aux antibactériens est causée par la pression de sélection exercée par les antibiotiques sur les bactéries. Cette pression s'explique par une efficacité partielle de l'antibiotique sur un groupe de bactéries. En effet lors de la mise en contact avec l'antibiotique, les bactéries sensibles à la molécule active sont lysées au profit des souches résistantes ayant acquis une mutation ou un élément génétique mobile leur conférant une résistance à la molécule en question. Pendant et après le contact avec l'antibiotique, ces bactéries, qui n'auront pas pu être éliminées, vont se reproduire, proliférer et peuvent provoquer une nouvelle infection (Figure 7) (20).

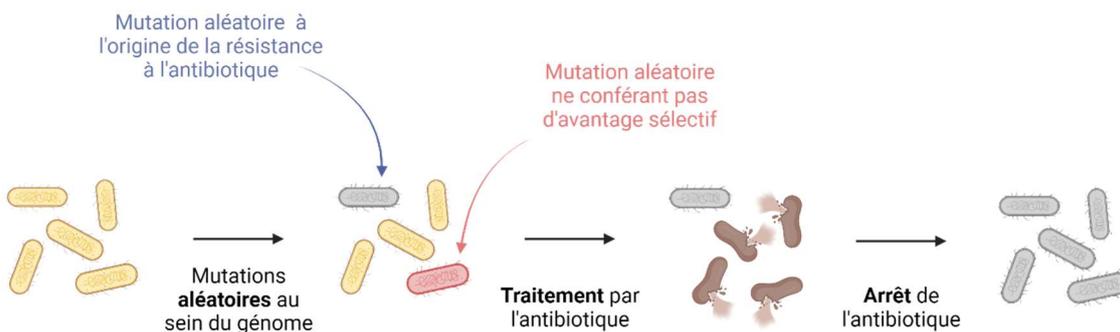


Figure 7 : Emergence de résistances par pression de sélection antibiotique

L'intensité de cette pression de sélection s'explique dans un premier temps par l'utilisation inappropriée d'antibiotiques. En effet, ce mésusage est la première cause de l'augmentation de l'antibiorésistance au niveau mondial. En parallèle du progrès médical qu'ont représenté les antibiotiques au XX^{ème} siècle, leur consommation n'a cessé de croître

jusqu'au XXI^{ème} siècle. La quantité de médicaments utilisée dans le monde a quasiment doublé entre 2000 et 2010. Aujourd'hui, l'antibiorésistance est la conséquence d'une utilisation massive et inadaptée de ces molécules en santé humaine mais également en santé animale. En effet, d'après l'OMS, plus de la moitié de la production d'antibiotiques est destinée à l'utilisation vétérinaire, notamment les céphalosporines de troisième génération, les fluoroquinolones et la colistine utilisés, en dehors de l'Union Européenne, comme facteurs de croissance chez les animaux. Ces molécules sont des antibiotiques phares en clinique humaine et cette utilisation vétérinaire massive soumet les bactéries à une forte pression de sélection de mutants résistants (Figure 8).

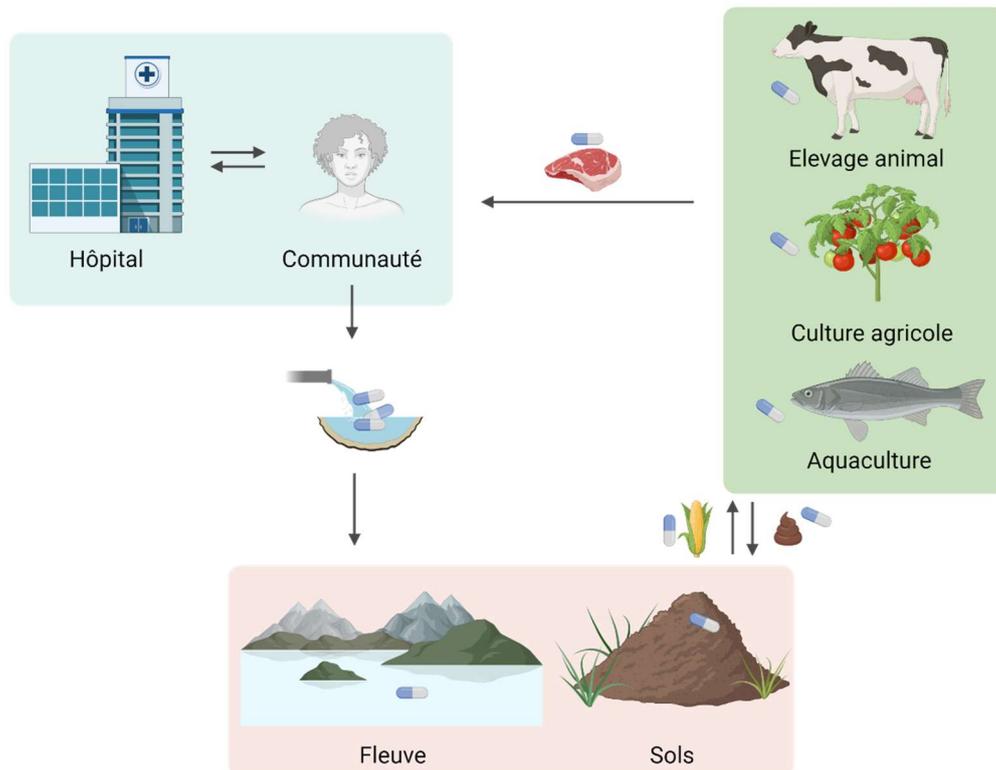


Figure 8 : Représentation de la transmission de la RAM entre les animaux, les humains et l'environnement

La quantité d'antibiotique délivrée est, de surcroît, souvent inadaptée et augmente la pression de sélection exercée sur le microbiote. Devant l'absence de méthode de détection rapide des bactéries et de leurs résistances, l'antibiothérapie probabiliste à large spectre s'est rapidement imposée comme premier choix dans de nombreuses infections. Elle se définit comme une administration d'antibiotique réalisée avant même de connaître la nature et la sensibilité du micro-organisme responsable de l'infection. Cette méthode s'appuie sur des données épidémiologiques et implique un traitement actif sur la plupart des bactéries en cause dans le type d'infection et donc un antibiotique à très large spectre. Ces antibiothérapies, néfastes pour l'écologie microbienne, doivent être réadaptées dès les antibiogrammes disponibles. Ces résultats, rarement disponibles avant 48-72 heures sont incompatibles avec une désescalade thérapeutique et impliquent bien souvent une seconde visite, trop rarement effectuée.

Dans un second temps, l'antibiorésistance évolue par la dissémination des bactéries et/ou de leurs éléments génétiques mobiles. La première souche possédant une carbapénémase NDM, enzyme hydrolysant toutes les bêta-lactamines à l'exception de l'aztréonam, a été rapportée pour la première fois en 2008 chez un patient revenant de New Delhi avant de devenir ubiquitaire dès 2013. Ici encore, la vitesse du rendu de résultat des méthodes conventionnelles d'antibiogramme est mise en défaut. En pratique, les patients porteurs de bactéries hautement résistantes émergentes et épidémiogènes doivent être isolés suite à la découverte d'un portage d'une souche résistante, c'est à dire après le résultat de l'antibiogramme. Les techniques actuelles permettent d'obtenir l'antibiogramme classiquement 48-72 heures après la réception de l'échantillon au laboratoire. Pendant ce laps de temps, aujourd'hui difficilement compressible, le patient est en contact avec du personnel de santé, mais également son entourage ou encore d'autres patients, permettant ainsi la dissémination de la bactérie dans l'environnement du patient.

I.2.2. Epidémiologie

La rapidité de dissémination des résistances couplée à l'utilisation excessive et inappropriée des antibiotiques a pour conséquence un accroissement exponentiel des bactéries multirésistantes à l'échelle mondiale.

L'émergence de la résistance a non seulement causé une augmentation des dépenses associées aux soins en imposant l'utilisation de médicaments coûteux et en allongeant la durée d'hospitalisation mais surtout, elle a contribué à augmenter la morbidité et la mortalité dues aux maladies infectieuses.

En 2019, à l'échelle mondiale, cinq millions de personnes sont décédées des suites d'une infection causée par une bactérie résistante et 1,27 millions, soit 25,4% de ces morts sont attribués directement à l'antibiorésistance. Dans la population générale, les jeunes enfants et les personnes âgées sont les populations les plus à risque, en effet, les enfants de moins de 5 ans représentent 20% des décès attribués à la résistance aux antimicrobiens (Figure 9) (21).

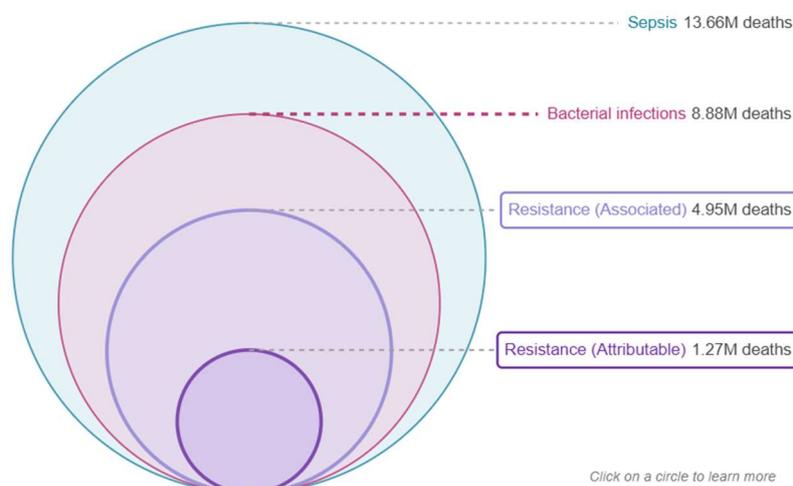


Figure 9 : Détail des décès liés à une infection (21)

Parmi les dizaines d'espèces bactériennes mises en cause dans les décès imputables à l'antibiorésistance, seulement 6 d'entre elles sont à l'origine de plus de 929 000 morts, soit 73% des décès. *Escherichia coli* est en tête de ce classement, suivi par *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 10).

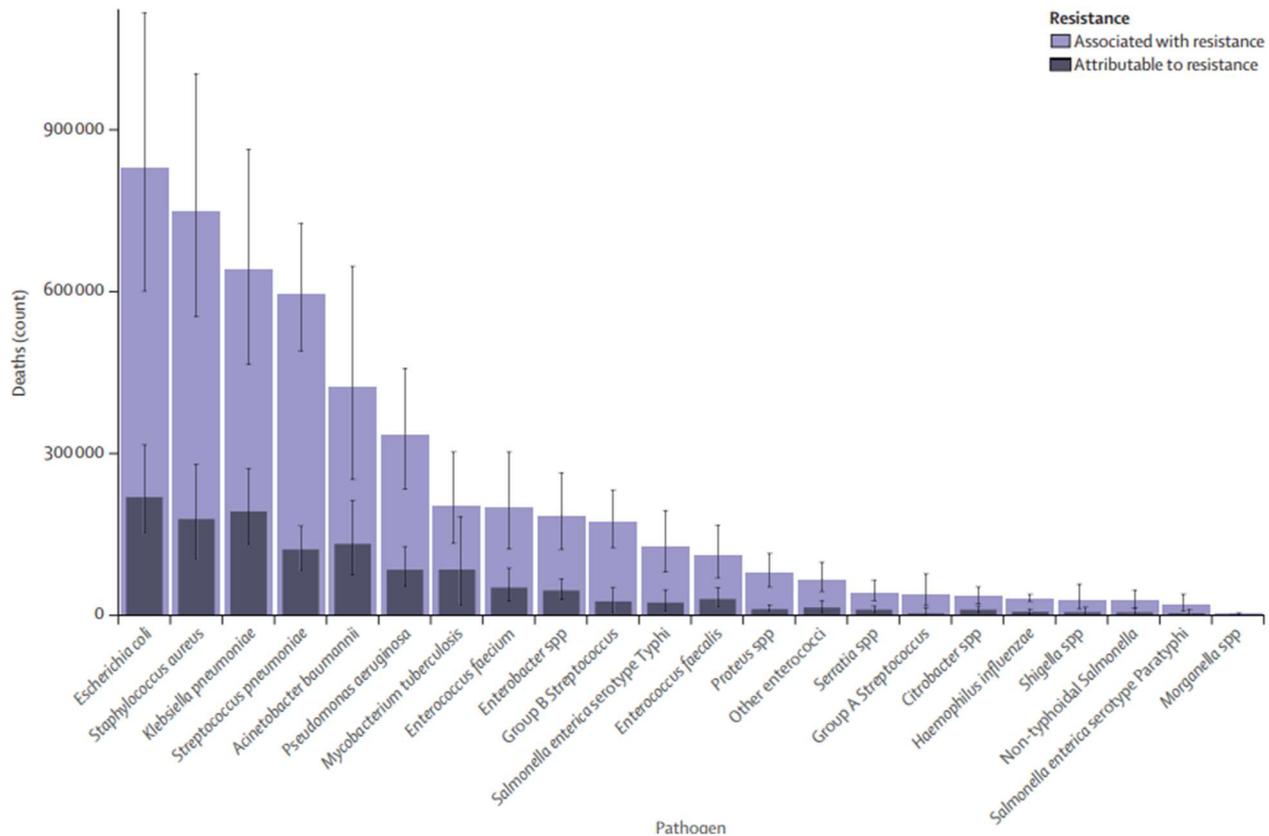


Figure 10 : Nombre de décès associés et attribuables à l'antibiorésistance dans le monde en 2019 (22)

Dans le monde de la microbiologie, deux phénomènes ont particulièrement attiré l'attention ces dernières années. Le premier est l'augmentation du nombre d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE), notamment en ville. Ce type de résistance occasionne une diminution de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, antibiotique probabiliste de première ligne très fréquent. On note par exemple en 2022 que 9,5% des souches d'*E. coli* isolées dans les hémocultures étaient résistantes aux C3G et 7,3% des *E. coli* tous prélèvements hospitaliers confondus l'étaient également (23). Ces résistances impliquent l'utilisation de médicaments de dernier recours tels que les carbapénèmes. Or, le deuxième phénomène qui inquiète est l'apparition d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC), hydrolysant ainsi cette sous-famille de dernier recours, imposant une escalade thérapeutique encore plus importante ou bien conduisant à une impasse thérapeutique (24).

I.2.3. Résistance innée ou acquise

Il existe deux grands types de résistances selon qu'elles soient naturellement présentes dans le génome bactérien ou bien acquises durant la vie de la bactérie (Figure 11).

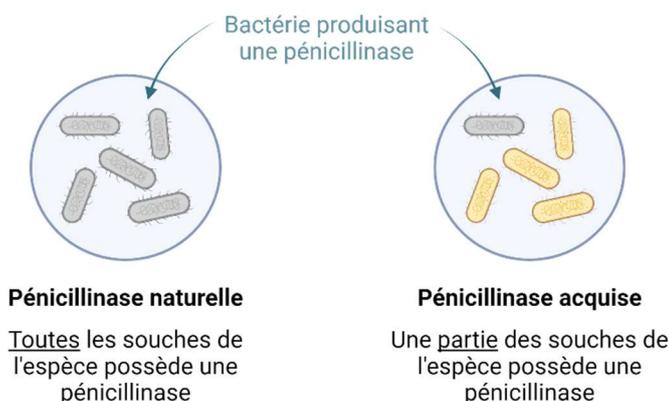


Figure 11 : Représentation schématique de la résistance innée et acquise

I.2.3.1. La résistance innée

La résistance dite naturelle ou innée est définie, par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), comme une « caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification » (25). Elles sont également dites « intrinsèques » et en cas de présence unique de ces résistances, on parle alors de phénotype sauvage de la bactérie. Elles font partie du patrimoine génétique de toutes les souches de l'espèce bactérienne en question et se transmettent donc systématiquement à la descendance. On parle de transmission verticale de la résistance naturelle. Ces résistances s'opposent aux résistances acquises.

I.2.3.2. La résistance acquise

Les résistances acquises sont présentes chez une fraction de bactéries au sein d'une même espèce. La résistance peut être acquise de deux façons : par mutation survenant sur le chromosome ou par acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon) porteur de gène(s) de résistance.

La résistance chromosomique est le fruit d'une mutation aléatoire apparaissant dans l'ADN bactérien, consécutivement à une erreur survenant durant la réplication. Si le fruit du hasard procure à la bactérie une résistance à un antibiotique, alors l'exposition à cette molécule risque de sélectionner la fraction de la population bactérienne possédant cette résistance (Figure 7). Ces bactéries résistantes ne survivent que si une pression de sélection est appliquée car la résistance est le plus souvent coûteuse énergétiquement à la bactérie, si

elle n'est pas vitale elle ne prendra pas l'ascendant et disparaîtra au profit de souches plus sensibles avec un meilleur « fitness ». Cette résistance étant conférée par une ou plusieurs mutations présentes sur le chromosome bactérien, elle peut se transmettre verticalement à la descendance comme la résistance naturelle. Ce type de résistance, bien que prédominant pour certaines classes médicamenteuses telles que les fluoroquinolones, ne représente que 20% des résistances acquises.

La résistance par acquisition de matériel génétique étranger contenant un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques est le mécanisme le plus largement répandu. En effet, il représente 80% des résistances acquises (24). Ces gènes de résistance sont le plus souvent issus de germes environnementaux qui ont développé ces mécanismes au fil des siècles afin de survivre en présence d'antibiotiques naturellement présents dans leur environnement, on parle alors de « résistome environnemental » (26).

L'acquisition de matériel génétique est possible selon trois méthodes : la transformation, la transduction et la conjugaison. Les éléments génétiques mobiles (EGM) peuvent être de plusieurs types : cela peut être des plasmides (très fréquents), des cassettes d'intégrons et des transposons.

La transformation est le moyen le plus simple de transfert d'EGM : la bactérie receveuse capte de l'ADN nu dans son l'environnement. Cet ADN nu est la conséquence de la lyse d'une bactérie à proximité dite donneuse qui doit être génétiquement proche de la bactérie receveuse afin que celle-ci puisse l'intégrer à son génome par recombinaison homologue. A cette première condition s'ajoute la nécessité que la bactérie soit « compétente » c'est-à-dire qu'elle ait la capacité de faire pénétrer cet ADN nu dans son cytoplasme (Figure 12).

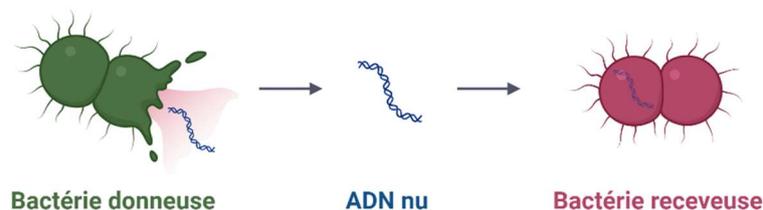


Figure 12 : Représentation d'une transformation bactérienne

La conjugaison est un mécanisme de transfert majeur, notamment chez les entérobactéries et est accru lorsqu'une pression de sélection antibiotique est exercée. Il est permis par la formation d'un pilus sexuel créant un « pont » entre deux bactéries qui va permettre le transfert de matériel génétique. Celui-ci correspond à une petite molécule d'ADN circulaire appelée plasmide qui possède la capacité unique de s'auto répliquer. Ces plasmides confèrent à la bactérie de nouvelles propriétés telles que la capacité de former des pili permettant la conjugaison, l'accroissement de la virulence mais également différents moyens de protection contre les antibiotiques (Figure 13).

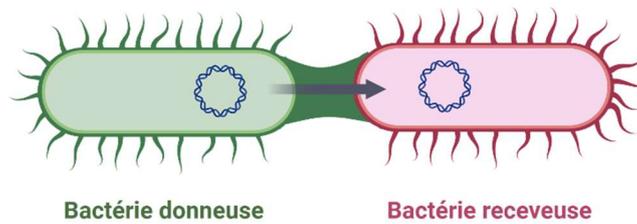


Figure 13 : Représentation d'une conjugaison bactérienne

La transduction consiste en un transfert de matériel génétique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse via des bactériophages. Le phage, dans un premier temps, va injecter son ADN viral dans une bactérie, ce qui, par déviation des mécanismes de synthèse de l'ADN bactérien, va pousser la bactérie à produire de nouveaux phages. Lors de la lyse bactérienne, les jeunes phages vont quitter la cellule bactérienne avec une partie de son matériel génétique, incluant éventuellement un gène bactérien de résistance, et seront capables de renouveler le cycle en l'injectant à de nouvelles bactéries (Figure 14).

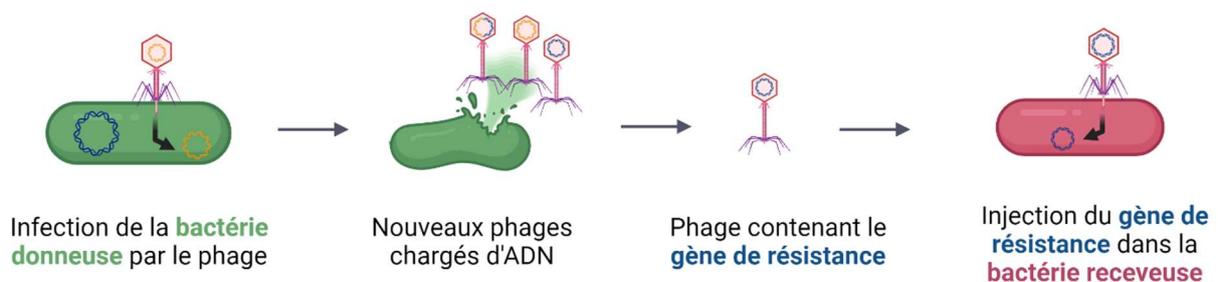


Figure 14 : Représentation de la transduction

Des éléments génétiques mobiles sont donc transférables d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse, on parle alors de transmission horizontale en opposition à la transmission verticale vers la descendance. Ces caractéristiques confèrent à ce type de résistance un fort pouvoir épidémiogène, et sont, de ce fait, extrêmement surveillées.

I.2.4. Mécanismes de résistance aux antibactériens

Les mécanismes permettant aux bactéries de résister aux antibiotiques sont très variés. La résistance peut être liée : à la sécrétion d'enzymes menant à l'inactivation de l'antibiotique, à la modification de la cible, à la diminution de la perméabilité membranaire limitant ainsi l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie et enfin à la surexpression de pompes d'efflux diminuant la concentration de molécule active au niveau du site d'action (Figure 15). Ce travail ayant été mené sur des souches de *Escherichia coli*, seuls les mécanismes de résistance décrits chez et intéressants les antibiotiques testés dans ce travail seront détaillés.

Escherichia coli est une bactérie qui, à l'état sauvage, est classiquement sensible à la plupart des antibiotiques. Elle possède, dans son génome, un gène *AmpC*, classiquement non exprimé et non dérégulé dû à l'absence de gène *AmpR*. Cette bactérie est donc intrinsèquement sensible aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif. Cependant, aujourd'hui, elle a acquis, grâce aux différents mécanismes décrits précédemment, une grande quantité de résistances faisant d'elle la première bactérie incriminée dans les décès attribuables à l'antibiorésistance.

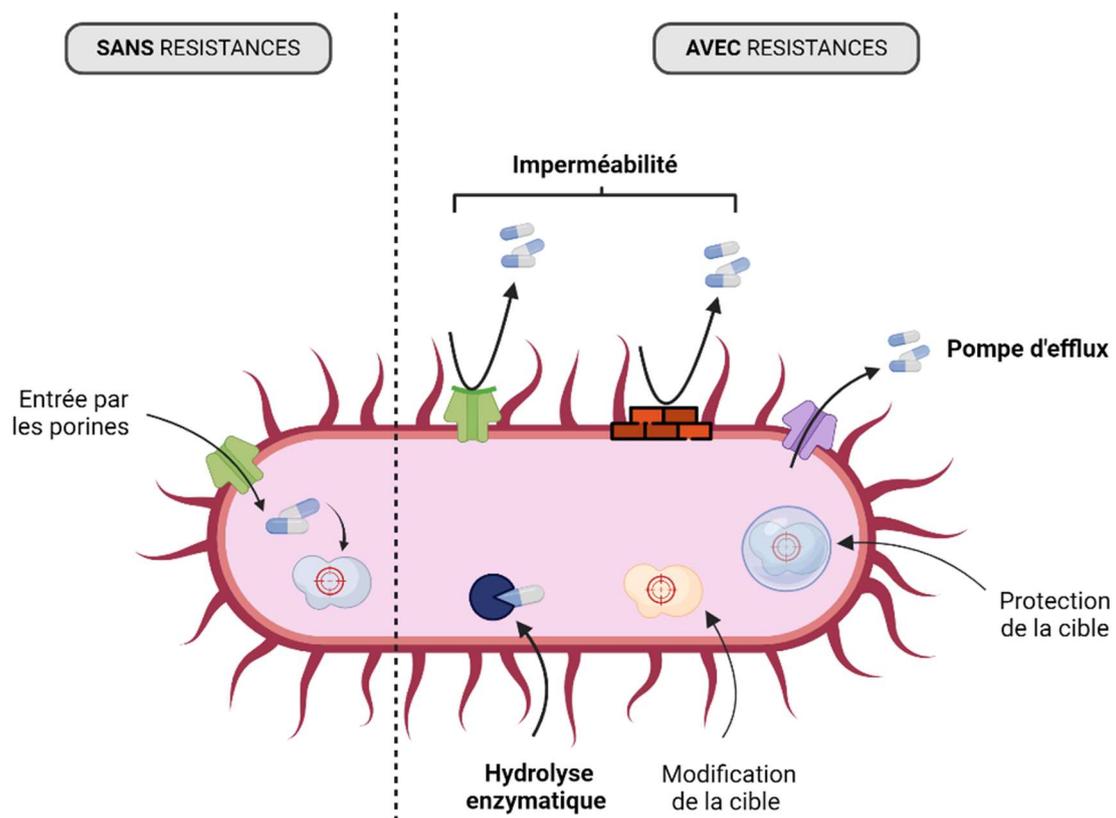


Figure 15 : Représentation des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques

I.2.4.1. Inactivation enzymatique des antibiotiques

L'inactivation enzymatique est le mécanisme de résistance le plus répandu et l'un des plus efficaces du monde bactérien. L'enzyme inactivatrice modifie la structure des antibiotiques, ce qui les empêche d'exercer leur action sur leur cible. Cette enzyme peut être chromosomique, ou, plus fréquemment, acquise via des éléments génétiques mobiles porteurs de gènes de résistance. Le phénotype acquis prend le nom de l'antibiotique auquel on ajoute le suffixe « -ase ». Cette nomenclature est largement répandue dans la famille des bêta-lactamines : pénicillinases, céphalosporinases, carbapénémases.

Les plus connues de ces enzymes sont les bêta-lactamases qui agissent par dégradation du cycle bêta-lactame. Elles sont regroupées en 4 classes par Ambler sur la base de leur homologie moléculaire (Figure 16).

La classe A de la classification d'Amblar, également appelée pénicillinase, est la classe la plus large : elle contient les enzymes hydrolysant uniquement les pénicillines, d'autres hydrolysant jusqu'aux céphalosporines mais également les antibiotiques ayant le spectre le plus large : les carbapénèmes. Les pénicillinases classiques type TEM-1 et SHV-1, sont également soumises à l'évolution et à la pression de sélection, TEM-1 en est le parfait exemple : des mutations sont survenues dans son site catalytique, lui conférant une capacité d'hydrolyse des céphalosporines de troisième génération, devenant ainsi TEM-3. Cette enzyme, TEM-3, rejoint alors les enzymes BLSE aux côtés de GES, SHV, et CTX-M hydrolysant jusqu'aux céphalosporines de troisième génération (26). Concernant les carbapénémases, on note IMI, SME et NMC qui sont encodées chromosomiquement, en opposition à KPC et GES qui sont situées sur des éléments génétiques mobiles et sont donc transférables. Toutes ces enzymes, malgré une hydrolyse très puissante pour certaines carbapénémases, restent des pénicillinases ou des « super pénicillinases » et sont donc sensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases.

La classe B, en opposition aux classes A, C et D qui ont des résidus sérine sur leur site actif, possède un ion métallique d'où son nom de métallo bêta-lactamase. Cet ion, la plupart du temps le zinc, est nécessaire à l'activité de l'enzyme, on parle alors de « cofacteur ». Cette classe a pour particularité de ne contenir que des carbapénémases, dont les plus importantes en clinique humaine sont : VIM, IMP et NDM. Ces enzymes hydrolysent toutes les bêta-lactamines à l'exception de l'aztréonam, qui a un cycle bêta-lactame différent de ses congénères.

La classe C ne contient que des céphalosporinases codées par le gène *AmpC* capables d'hydrolyser les pénicillines, les monobactames et les céphalosporines jusqu'à la troisième génération. Dans de rares cas, cette classe hydrolyse également la quatrième génération de céphalosporines et est alors appelée ESAC (Extended Spectrum AmpC). Le gène *AmpC* est majoritairement constitutionnel, situé sur le génome des entérobactéries des groupes 1 et 3. Cette classe est la seule à ne pas contenir de carbapénémases.

Enfin, la classe D de la classification d'Amblar avec les oxacillinases qui peuvent hydrolyser les bêta-lactamines jusqu'aux céphalosporines ou jusqu'aux carbapénèmes. Elles épargnent fréquemment plusieurs céphalosporines. La plus fréquente est l'OXA-48 qui possède plusieurs variants avec des profils phénotypiques différents. Ces enzymes sont fréquemment portées par des éléments génétiques mobiles mais peuvent également s'intégrer dans le génome, comme c'est le cas chez *Acinetobacter baumannii* avec OXA-23. (27)

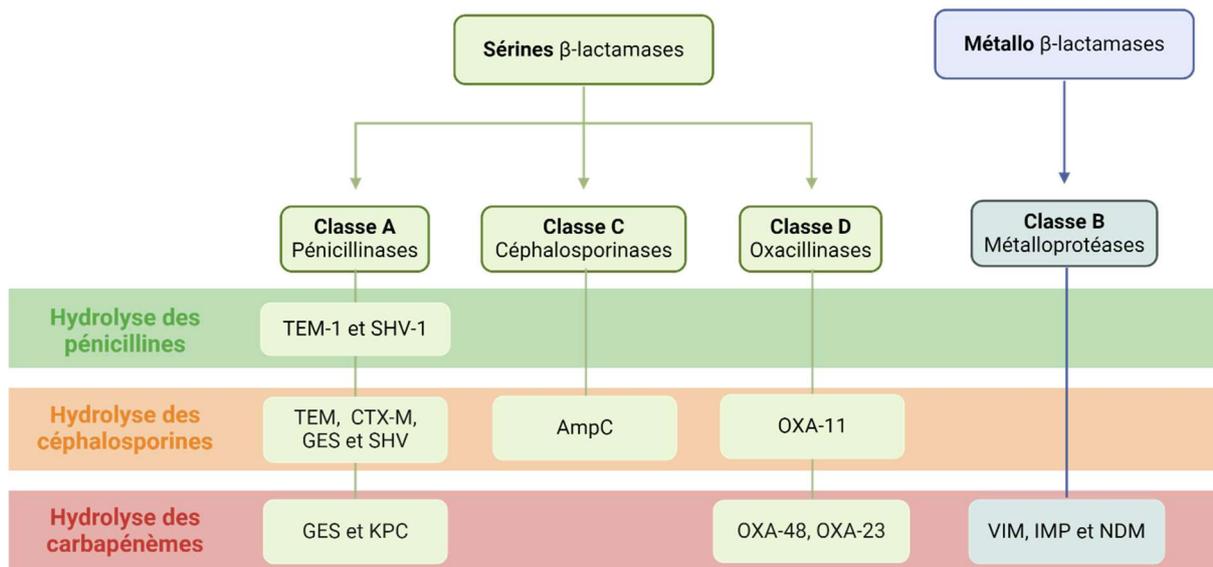


Figure 16 : Classification des bêta lactamases selon Ambler

I.2.4.2. Diminution de la concentration d'antibiotique au niveau de la cible

Les antibiotiques ont des cibles intracellulaires et doivent donc traverser la paroi de la bactérie afin de pouvoir agir, la diminution de leur pénétration entraîne une quantité insuffisante d'antibiotique au site d'action et donc une résistance à l'antibactérien.

Ce défaut de pénétration est possible par deux mécanismes : via l'imperméabilité de la membrane externe avec une diminution du nombre de porines permettant l'entrée du médicament et/ou via l'augmentation du nombre de pompes d'efflux expulsant l'antibiotique de la bactérie.

I.2.4.2.1. Diminution de la perméabilité membranaire

C'est un mécanisme particulièrement important chez les bactéries à Gram négatif car ce sont les porines, situées sur la membrane externe, qui permettent l'entrée des antibiotiques. Ce mécanisme affecte particulièrement les bêta-lactamines et les fluoroquinolones. Les porines majoritaires chez *E. coli* sont : OmpC, OmpF et PhoE, elles peuvent être échangées contre des porines moins affines pour les molécules (avec un canal plus étroit par exemple ne permettant pas à l'antibiotique de passer), diminuées en nombre ou bien déficientes.

Ce mécanisme mène à de faibles niveaux de résistance qui deviennent significatifs lorsqu'ils sont couplés à d'autres types de résistances tels que l'augmentation des pompes d'efflux.

I.2.4.2.2. Pompes d'efflux

Les pompes d'efflux permettent l'extrusion d'un seul (les pompes sont dites spécifiques) ou de plusieurs antibiotiques (les pompes sont alors dites aspécifiques). Les gènes codant ces pompes peuvent être localisés sur des EGM souvent associés à d'autres mécanismes, ou chromosomiques. La pompe la plus connue chez *E. coli* est la pompe AcrAB-TolC qui permet d'effluer une large gamme de composés des bêta-lactamines, des quinolones aux cyclines et au chloramphénicol (28).

I.2.4.3. Modification de la cible d'action

La modification de la cible d'action est le mécanisme de résistance prédominant pour les fluoroquinolones. Celles-ci agissent en inhibant deux enzymes principales : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Lorsque les gènes codants ces enzymes subissent des mutations, la traduction et le changement d'acide aminé en conséquent produit une enzyme avec une affinité diminuée pour les fluoroquinolones. La première mutation provoque une faible augmentation des CMI mais c'est l'accumulation de mutations qui confère une résistance élevée aux fluoroquinolones.

I.2.4.4. Protection de la cible

La protection de la cible est un mécanisme de défense minoritaire contre la famille des fluoroquinolones dont la protéine la plus connue, dont le gène est porté par un plasmide, se nomme Qnr. Cette protéine se comporte comme un homologue de l'ADN et se lie à l'ADN gyrase et aux topoisomérases IV, ce qui empêche les fluoroquinolones de se lier à leurs cibles. Ce mécanisme de résistance confère uniquement un bas niveau de résistance aux quinolones mais faciliterait la sélection des mutants ayant acquis une modification chromosomique dans leurs génomes.

L'utilisation des antibiotiques dans les pratiques médicales permet la prise en charge des patients présentant des infections urinaires mais aussi des patients d'oncologie, des patients opérés, mais également des transplantés d'organes... En revanche, cette large utilisation combinée à la lenteur de développement de nouvelles molécules ont mené à l'émergence et à la croissance d'antibiorésistance pouvant atteindre un niveau critique avec l'émergence de bactéries aujourd'hui intraitables. Afin de ralentir la propagation et l'apparition de résistances, une approche globale est mise en place devant ce problème multifacettes qu'est l'antibiorésistance.

I.2.5. Plans d'action

Devant la menace de l'antibiorésistance qui pèse sur la médecine moderne, il est nécessaire d'agir. Les actions passent par la responsabilité personnelle, mais également nationale et internationale, la résistance ne connaissant pas de frontière. Chaque maillon de la chaîne est essentiel pour contenir ce fléau.

La responsabilité individuelle, dans un premier temps est effectivement engagée devant ce phénomène. En effet, chaque patient doit être conscient de l'ampleur du problème et apporter sa pierre à l'édifice. Il est nécessaire pour chacun de respecter les prescriptions médicales, que ce soit en termes de dose ou de durée et ne pas pratiquer d'automédication, ni inciter le médecin à la prescription d'antibiotiques. Les règles d'hygiène et la vaccination participent également à freiner la transmission de bactéries et donc potentiellement de résistances, c'est en ce sens-là que plusieurs campagnes d'informations sont effectuées depuis plusieurs années (18).

Ensuite, au niveau national, les responsables politiques ont un rôle primordial à jouer. Il est de leur devoir de promouvoir la surveillance de la propagation de résistance, d'informer les professionnels de santé ainsi que la population des dangers et des actions nécessaires pour les endiguer. Les campagnes de sensibilisation du grand public ont contribué à faire diminuer la consommation d'antibiotiques au début du siècle. Malheureusement elle est aujourd'hui repartie à la hausse, la France conservant sa place de mauvais élève au classement des pays les plus consommateurs d'antibiotiques. Les responsables politiques peuvent également établir des plans de prévention ainsi qu'une réglementation imposant un usage rationné des antibiotiques. La promotion de la recherche est essentielle notamment pour le développement de nouveaux antibiotiques et de nouveaux vaccins mais également sur les stratégies de diagnostics rapides permettant l'instauration d'un antibiotique adapté dans les meilleurs délais.

Comme vu précédemment, l'émergence de bactéries résistantes est favorisée par la forte consommation d'antibiotiques dans le monde vétérinaire et de la pression de sélection qui en découle. Le secteur de l'élevage a donc un rôle non négligeable à jouer. Il est primordial de réglementer l'usage des antibiotiques vétérinaires et de favoriser la vaccination des animaux. De plus, il est absolument essentiel d'interdire l'usage des antibiotiques vétérinaires en tant que facteurs de croissance. Cette décision a été prise en 2006 en Europe mais n'est pas une obligation réglementaire aux Etats Unis, cette pratique étant seulement découragée par la FDA. Les différentes recommandations nationales se basent sur des plans internationaux ayant pour but de guider les pays dans leur politique de ralentissement de l'antibiorésistance.

Au niveau international, l'organisation mondiale de la santé (OMS), en collaboration avec l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé animale (OMSA) a identifié trois menaces particulièrement préoccupantes pour la santé, l'une d'entre elles est l'antibiorésistance (29). Un plan d'action global, « une seule santé » a été mis en place, basé sur le fait que la santé humaine, la santé animale et la santé végétale sont interdépendantes et ne connaissent pas de limite de frontières (Figure 17).

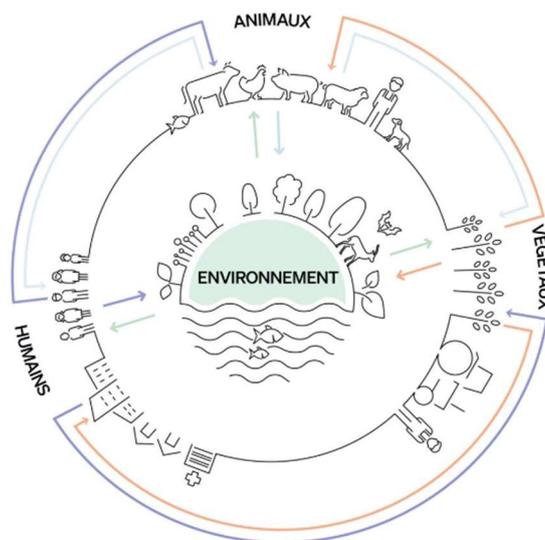


Figure 17 : Fondation du concept " One Health ", " une seule santé "(30)

Ce plan d'action global a pour but d'aider les différents pays à mettre en place des stratégies alignées sur les mêmes objectifs mondiaux. Les cinq piliers de ce plan global sont :

- La sensibilisation de la population et du personnel de santé,
- Le renforcement de la surveillance et la promotion de la recherche,
- La diminution du nombre d'infections par des mesures d'assainissement, d'hygiène et de prévention,
- L'optimisation de l'usage des antibiotiques en médecine humaine et animale,
- L'investissement dans la recherche de nouveaux traitements, diagnostics ou vaccins.

Dans le but de relever ce défi, un plan emblématique de la lutte contre l'antibiorésistance a été créé depuis 2011 : le plan Ecoantibio fournissant de multiples objectifs couronnés de succès. En effet, il a permis de réduire de 52% l'exposition globale des animaux aux antibiotiques en l'espace de 11 ans (de 2011 à 2022). Actuellement, la troisième version est en place, pilotée par la DGAL (Direction Générale de l'ALimentation) qui vise à prolonger cette décroissance de la consommation d'antibiotiques sur le plan vétérinaire ainsi que les risques qui en découlent (31).

Plusieurs projets ont également vu le jour parmi lesquels nous pouvons citer : la semaine mondiale pour le bon usage des antibiotiques mise en place depuis 2015, un système mondial de surveillance, un partenariat mondial pour la recherche développement d'antibiotiques visant à proposer de nouvelles molécules... (32)

I.3. *Escherichia coli*

I.3.1. La bactérie

Escherichia coli, fréquemment abrégée *E. coli*, a été découvert en 1885 par l'allemand Theodor Escherich durant ses recherches sur les diarrhées néonatales. Cette bactérie est un bacille à Gram négatif commensal du tube digestif humain et animal qui appartient à la grande famille des entérobactéries. Ce germe doté d'une ciliature péritriche lui conférant sa mobilité, est aéro-anaérobie facultatif et croît rapidement sur milieux classiques (une division toutes les 20 minutes à 37°C sur milieu riche). Cette facilité de culture en fait un germe de choix pour de nombreuses études.

Escherichia coli possède plusieurs antigènes qui vont permettre son classement en plus de 160 sérotypes. Deux antigènes permettent ce sérotypage : l'antigène somatique O contenu dans les lipopolysaccharides de la paroi et l'antigène flagellaire H qui confère à la bactérie sa mobilité. Il existe également au sein d'*E. coli* l'antigène F contenu dans les pili de la bactérie et l'antigène capsulaire K inconstamment présent, qui serait un facteur de virulence ayant une activité anti phagocytaire (Figure 18) (33).

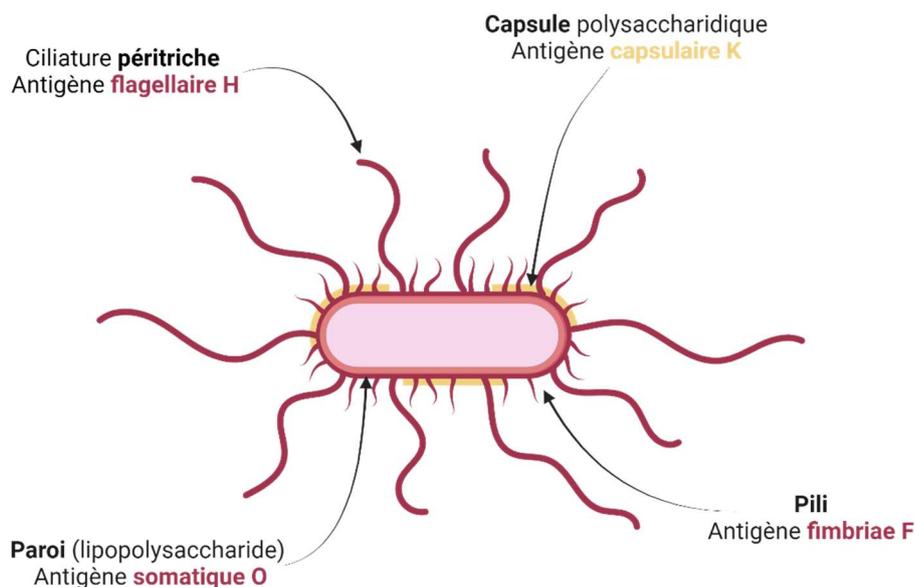


Figure 18 : Représentation de la localisation des différents antigènes d'*E. coli*

I.3.2. Implications en médecine humaine

Escherichia coli est une bactérie fondamentale du microbiote intestinal, cependant certaines souches ont acquis des gènes de virulence et sont devenues pathogènes faisant de *E. coli* le germe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine, dans les infections communautaires comme nosocomiales (34). Les souches sont classées en 8 pathovars selon

leurs facteurs de virulence qui définissent leurs profils d'infection : intestinal, urinaire ou neurologique (Figure 19). Ces différentes infections peuvent être le point de départ de sepsis engageant le pronostic vital. *E. coli* est également une bactérie apte à sécréter différentes toxines qui peuvent causer des toxi-infections alimentaires ainsi que des syndromes hémolytiques et urémiques.

Il est à noter que c'est la première bactérie impliquée dans les infections du tractus urinaire que ce soit en communautaire ou bien en milieu hospitalier. La fréquence et la gravité des infections l'incriminant, combinée à la fréquence et la diversité des résistances d'*Escherichia coli* lui confèrent une place particulière dans le monde de la microbiologie (9).

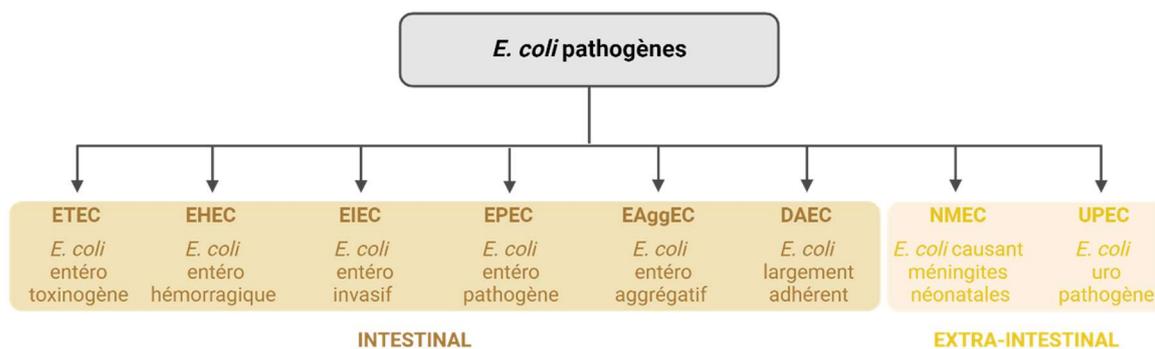


Figure 19 : Différents sous types pathologiques de *E. coli* (35)

I.3.3. Résistances d'*E. coli*

I.3.3.1. Résistances naturelles

E. coli possède différentes résistances naturelles, notamment du fait de la typologie de sa paroi. En effet, comme l'ensemble des bactéries à Gram négatif, *E. coli* présente une résistance aux pénicillines G et V et M, molécules de hydrophobes ne pouvant pas franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il en est de même pour la classe des glycopeptides, lipopeptides et macrolides incapables de traverser la membrane externe via les porines en raison de leur haut poids moléculaire et donc incapables d'atteindre leur cible d'action.

Les entérobactéries regroupent des germes fréquemment retrouvés dans le tube digestif qui sont commensals du microbiote intestinal. Concernant la résistance aux bêta-lactamines, les entérobactéries, toutes résistantes aux pénicillines G, V et M comme vu ci-dessus, sont classées en 6 groupes selon leurs résistances naturelles à cette famille d'antibiotiques. *E. coli* fait partie du groupe 1 tout comme *Shigella spp.* et possède une céphalosporinase chromosomique non inductible codée par le gène *AmpC*.

I.3.3.2. Résistances acquises

Les résistances acquises chez *E. coli* sont nombreuses et variées, seules les résistances aux molécules utilisées dans cette étude ont été détaillées. L'antibiorésistance est étudiée par les CPIas (Centres d'appui pour la Prévention des Infections Associées Aux Soins) durant leur mission « Surveillance et Prévention de l'AntibioRésistance en Etablissement de Santé » (SPARES) ainsi que leur mission « Prévention des infections associées aux soins et antibiorésistance en ville et médico-social » (PRIMO). La mission SPARES documente les résistances de *E. coli* tous prélèvements confondus à la différence de la mission PRIMO qui catégorise les infections urinaires à part. Il en découle une différence majeure en ce qui concerne la prévalence de la résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique, antibiotique pour lequel le breakpoint est fonction de l'infection. En effet, il est classiquement de 8 mg/L mais est de 32 mg/L pour les cystites, expliquant la différence majeure entre la prévalence de la résistance hospitalière et extrahospitalière (Figure 21).

La résistance aux bêta-lactamines (amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, céfixime) est, dans la majorité des cas, une résistance enzymatique par hydrolyse de l'antibiotique. Ces enzymes peuvent être des pénicillinases, des céphalosporinases, des BLSE ou encore des carbapénémases. Plus rarement, l'action de cette classe peut être altérée par des mécanismes d'imperméabilité ou d'efflux, notamment en ce qui concerne la témocilline. Il est à noter que la témocilline est un antibiotique fortement hydrolysé par les carbapénémases de classe C type OXA-48 et OXA-48-like en faisant un signal d'alerte de vérification. Le mécanisme de résistance au mécilinam est peu documenté et serait soit le résultat de l'hydrolyse enzymatique par des carbapénémases de classe A et B, soit, plus fréquemment, dû à une mutation dans le gène *cysB* qui diminuerait la production de cystéine engendrant la production d'un composé toxique pour le mécilinam (10).

Les résistances aux fluoroquinolones, telles que la ciprofloxacine, sont le plus souvent dues à des mutations dans les gènes codant l'ADN gyrase et/ou la topoisomérase IV : *gyrA* et *gyrB* ainsi que *parC* et *parE*. Ces mutations engendrent une modification de la cible des fluoroquinolones, empêchant alors leur action. Cette résistance est généralement chromosomique. Il existe également des gènes portés par des plasmides qui empêchent les quinolones de se lier à leur cible par protection de celle-ci : les protéines Qnr codées par les gènes *qnr* (34). De manière bien plus rares, il peut y avoir de l'imperméabilité et des pompes d'efflux qui entrent en jeu dans la résistance à cette classe d'antibiotiques.

La résistance acquise à la fosfomycine est due à trois mécanismes : l'un empêchant la molécule d'atteindre sa cible par mutation des gènes codants les protéines de transport (*glpT* et *uhpA/T*), le second également par mutation mais cette fois du site de liaison de la fosfomycine à sa cible et enfin, le dernier, par modification enzymatique (FosA, FosB et FosX) de la fosfomycine et ouverture de son cycle oxyrane (Figure 20) (34).

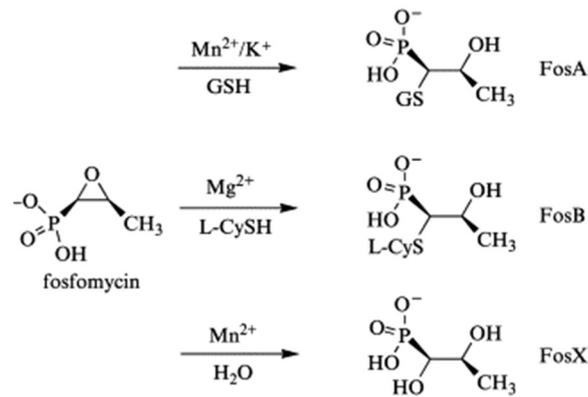


Figure 20 : Action des enzymes modifiant la fosfomicine. GSH : glutathion ; L-CySH : L-cystéine (36)

La résistance à la nitrofurantoïne est peu fréquente et évolue beaucoup plus lentement que la résistance aux autres antimicrobiens. Ceci s'explique par la multiplicité de ses cibles d'actions obligeant le microorganisme à accumuler différents mécanismes de résistances afin d'être sélectionné. Les résistances résultent de mutations sur les gènes codant les nitroréductases insensibles à l'oxygène (*nsfA* et *nsfB*) qui seraient les enzymes transformant la nitrofurantoïne en composé actif (34) (10).

Quant à la résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole), elle peut être plasmidique et résulter de l'acquisition d'au minimum deux gènes engendrant des enzymes toxiques pour l'antibiotique : *sul*, qui confère une résistance au sulfaméthoxazole, et *dfr*, qui confère une résistance au triméthoprime. Elle peut également découler de mutations dans les gènes producteurs de la cible (gène de DHFR et gène de DHPS). Ces mutations vont, soit altérer la cible et empêcher la reconnaissance de l'antibiotique, soit survenir dans les gènes régulateurs et permettre une surexpression de la cible et donc une diminution de l'efficacité du traitement (37).

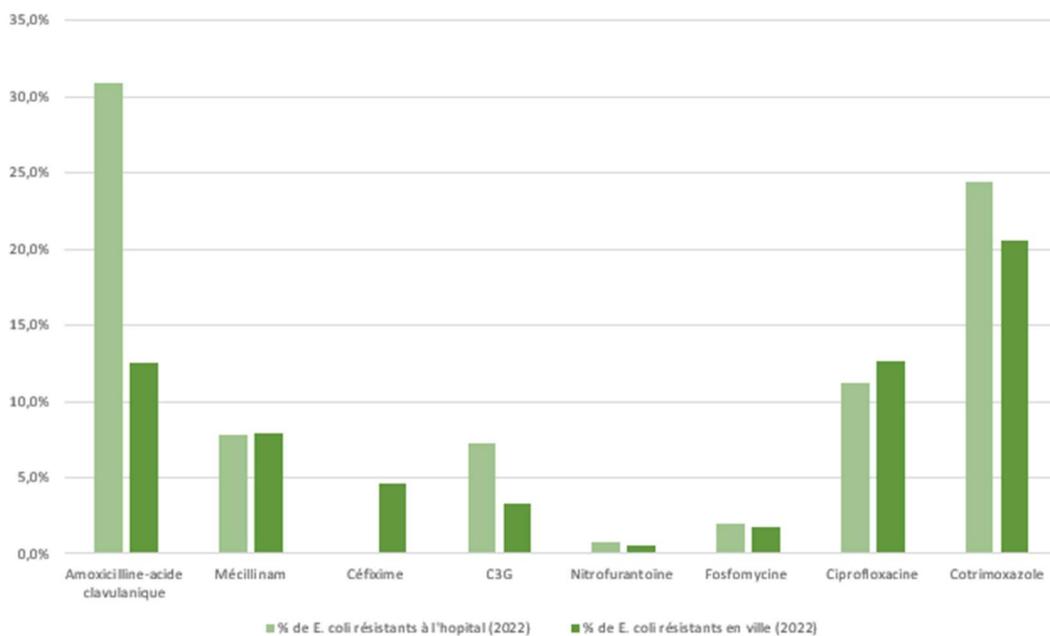


Figure 21 : Pourcentages de souches de *E. coli* résistants aux antibiotiques en ville et à l'hôpital (38) (39)

I.4. Infections du tractus urinaire et ECBU

I.4.1. L'infection du tractus urinaire : ITU

L'infection du tractus urinaire (ITU) est l'une des infections les plus communes en ville, comme à l'hôpital : 150 millions d'ITU sont diagnostiquées par an dans le monde ce qui en fait la deuxième infection la plus fréquente derrière les infections pulmonaires (35). Elle est définie par la multiplication de germes dans l'arbre urinaire occasionnant une réaction inflammatoire et des symptômes cliniques. On estime que 40% des femmes et 12% des hommes connaîtront au moins une infection urinaire dans leur vie, parmi lesquels 25% subiront une récurrence (40).

Les microorganismes les plus fréquemment impliqués sont ceux du tube digestif, du fait de leur proximité, et notamment les *E. coli* uropathogènes (UPEC) impliqués dans 70 à 90% des ITU communautaires et 40 à 50% des ITU nosocomiales. Les bactéries impliquées dans ces infections sont phylogénétiquement distinctes de celles commensales du tube digestif et sont dotées de facteurs de virulence supplémentaires (40). Les UPEC ont notamment des adhésines qui leur permettent de s'ancrer à la cellule urothéliale, ce qui permet ensuite à la bactérie d'envahir la cellule. Une fois entrée, l'UPEC se multiplie et produit des communautés intracellulaires (type biofilms) qui permettent la pérennisation de la bactérie.

Les ITU sont classées en trois catégories selon le site anatomique lésé : les cystites dont l'atteinte se limite à la vessie, les pyélonéphrites lorsque l'infection atteint le rein, et les prostatites chez les hommes. Ces infections peuvent être « simples » ou « à risque de complication » (Tableau 1) (34).

Tableau 1 : Facteurs de risque de complication des ITU (41)

Facteurs de risque de complication

Anomalie de l'arbre urinaire	
Terrain favorisant	Homme Grossesse Clairance de la créatinine <30mL/min Immunodépression grave Sujet > 75 ans Sujet > 65 ans avec critère de fragilité*

* : Critères de fragilité de Fried : perte de poids involontaire au cours de la dernière année, vitesse de marche ralentie, faible endurance, faiblesse/fatigue, activité physique réduite.

I.4.2. L'examen cyto bactériologique des urines : ECBU

L'ECBU est l'examen de référence qui permet de documenter les ITU. Malgré la remise en cause récente consécutive aux études sur le microbiote, l'urine est, aujourd'hui encore, considérée physiologiquement comme stérile mais est, malgré une toilette soignée, fréquemment contaminée par les germes de l'extrémité de l'urètre et du méat urinaire. En théorie, pour prévenir ces contaminations, le prélèvement idéal est la ponction sus pubienne mais en pratique peu réalisée car très invasive. Une bonne alternative réside dans le sondage aller-retour, qui est lui aussi, souvent délaissé pour le recueil de « milieu de jet » plus simple à réaliser. Pour un recueil de qualité il est nécessaire de rejeter le premier jet d'urine chargé de la flore commensale et de recueillir le milieu de jet dans un pot stérile. Ces contaminations par la flore expliquent l'utilisation de seuils, nécessaires pour conclure à la pathogénicité d'une bactérie dans un contexte clinique donné. L'ECBU est une analyse qualitative mais aussi quantitative constamment associée à une analyse cytologique.

L'aspect analytique et notamment l'acheminement de l'urine est une étape critique de l'examen. En effet, l'urine constitue un excellent milieu de culture pour les bactéries, qui, si elles ne sont pas figées dans leur croissance, continuent à se répliquer et faussent donc la numération au laboratoire. Les ECBU doivent donc être acheminés au laboratoire dans un délai inférieur à deux heures. Une fois ce délai dépassé, elles ne pourront être analysées que si elles ont été conservées à 4°C mais le compte des leucocytes sera erroné. La contrainte organisationnelle que ce délai impose a poussé les préleveurs à utiliser des tubes chargés en borate, un agent bactériostatique présentant l'avantage d'empêcher la prolifération bactérienne et de conserver également les leucocytes permettant une analyse jusqu'à 48 heures après le prélèvement.

Une fois au laboratoire, l'analyse se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, 10 microlitres d'urines sont ensemencés, il est nécessaire de faire cet ensemencement à l'ose calibrée car cela va permettre une quantification bactérienne par la suite. Cet ensemencement est effectué sur une gélose non sélective et déficiente en électrolytes, chromogène ou non (Figure 22). Elle est ensuite incubée 16- 24 heures à 35°C.

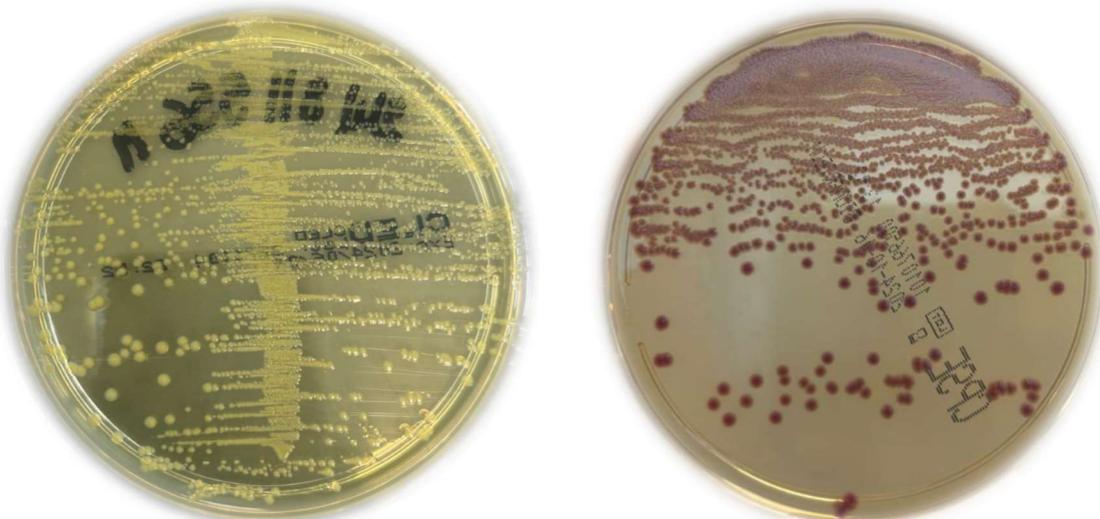


Figure 22 : Photo de gélose non sélective électrolyte déficiente (à gauche) et chromogène (à droite) contenant de l'*E. coli*

Dans un second temps, l'analyse cytologique est effectuée. Elle comprend le décompte des leucocytes et celui des hématies qui est exprimé en cellules/mL. Il peut être réalisé manuellement par Kova Slide par exemple ou par des automates comme l'UF4000 (Sysmex). Cet automate utilise la cytométrie en flux pour distinguer les cellules et peut rendre, en plus des décomptes de globules rouges et blancs, une approximation de quantité de bactéries et le nombre de cellules épithéliales pouvant être un marqueur de contamination. Dans certains laboratoires de microbiologie, la détection et la caractérisation des cristaux est également effectuée ainsi que la coloration de Gram, la recherche de levures,... (42)

Enfin après 16-24 heures d'incubation, les cultures sont analysées par le microbiologiste qui, selon l'aspect de la culture, la leucocyturie et les renseignements cliniques disponibles, statue sur la bactérie impliquée dans l'ITU. Pour cela il dispose de seuils basés sur le pouvoir uropathogène des différentes bactéries qui aident à la décision, par exemple le seuil de pathogénicité d'*E. coli* se situe à 10^3 UFC/mL, aussi bien chez l'homme que chez la femme pour les ITU communautaires. L'antibiogramme est ensuite réalisé et interprété après 16-24 heures d'incubation.

I.4.3. Antibiogrammes ciblés et choix des molécules étudiées

Depuis octobre 2023, la HAS recommande de rendre un antibiogramme ciblé dans le cadre des ITU. Cela consiste à rendre uniquement une partie des antibiotiques testés afin d'épargner les antibiotiques « de secours » dits critiques qui ont un fort impact sur l'écologie microbienne et donc sur l'accroissement de la résistance. Le but de l'antibiogramme ciblé est de s'appuyer sur le type d'infection et le phénotype de résistance de la bactérie en cause afin de rendre les antibiotiques avec le spectre le plus étroit possible et d'éviter ainsi la prescription d'antibiotiques critiques. Il existe trois tableaux guidant le microbiologiste dans le rendu des résultats : l'un avec les recommandations en l'absence de renseignements cliniques, l'un avec les recommandations en cas de cystites et le dernier avec les recommandations lors de pyélonéphrites. Seul le tableau d'antibiogramme ciblé en l'absence de renseignements cliniques sera détaillé ici car c'est malheureusement le cas le plus fréquent au laboratoire, il ne tient compte que du phénotype de résistance de la bactérie impliquée dans l'infection (Tableau 2).

Tableau 2 : Guide des antibiotiques à rendre (cases orange) lors d'antibiogrammes ciblés selon le profil de résistance de la bactérie en cause (43) avec les antibiotiques du panel urinaire en vert et les antibiotiques testés dans une précédente étude en bleu.

	Sensible amoxicilline	Résistant amoxicilline	Résistant amoxicilline-acide clavulanique et sulfaméthoxazole-triméthoprine	Résistant C3G et BLSE			
Amoxicilline							
Pivmécillinam							
Fosfomycine trométamol							
Nitrofurantoïne							
Triméthoprine							
Triméthoprine Sulfaméthoxazole							
Amoxicilline acide clavulanique							
Céfixime							
Céfotaxime Ceftriaxone							
Fluoroquinolones							
Témocilline							
Céfoxitine							
Pipéracilline Tazobactam							
Ceftazidime							
Céfépime							
Aztréonam							
Amikacine Gentamicine							
Carbapénèmes				Si pas de bêta-lactamines sensible			
Nouvelles associations bêta-lactamines/inhibiteurs de bêta-lactamases				Uniquement sur demande			

Le choix des antibiotiques testés dans ce travail a été basé sur ces recommandations. Les molécules les plus utilisées ont donc été testées, en excluant celles qui l'avaient déjà été dans une précédente étude, représentées en bleu dans le Tableau 2. Par conséquent les six molécules étudiées dans ce travail sont : le pivmécillinam, la fosfomycine trométamol, la nitrofurantoïne, l'amoxicilline-acide clavulanique aux doses recommandées dans les cystites (32 mg/L), le céfixime et la témocilline pour le panel testé sur les souches de *E. coli*.

Parmi les molécules rendues en première intention on retrouve le triméthoprim, qui, dans les faits est peu utilisé en clinique à cause de la forte pression de sélection exercée par celui-ci. Le triméthoprim n'est pas présent sur les antibiogrammes automatisés réalisés en routine (milieu liquide, VITEK®-2). Pour ces différentes raisons il ne sera pas testé dans cette étude.

Les antibiotiques testés directement sur les urines ont été implémentés au fur et à mesure selon les données obtenues et la liste a augmenté au fil des tests jusqu'à aboutir à quatre antibiotiques : amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, triméthoprim-sulfaméthoxazole et ciprofloxacine.

I.4.4. Le traitement des ITU

Le choix de ces antibiotiques est guidé par les recommandations de la haute autorité de santé (HAS), élaborées en partenariat avec la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) et le groupe de pathologie infectieuse pédiatrique (GPIP), préconisant le choix du traitement et la durée selon le type d'ITU (44). Ces recommandations tiennent compte de la nouvelle stratégie de prévention de l'antibiorésistance 2022-2025 promouvant l'utilisation d'antibiotiques ciblés (43).

I.4.4.1. Les cystites

Lors d'une cystite aigue simple chez un patient sans critères de complication, il n'est pas recommandé d'effectuer un ECBU. Le traitement instauré est donc uniquement probabiliste avec en première intention la fosfomycine-trométamol en prise unique et en seconde intention le pivmécillinam pendant 3 jours.

En cas de cystite aigue à risque de complication, la réalisation de l'ECBU est indispensable et l'antibiotique est prescrit à la suite des résultats de l'antibiogramme. Cependant lorsque les symptômes sont trop importants, il est possible de prescrire une antibiothérapie probabiliste à base de nitrofurantoïne ou de fosfomycine trométamol.

Il est ensuite recommandé de réévaluer l'antibiothérapie lors des résultats de l'ECBU en priorisant les antibiotiques possédant le spectre d'action le plus étroit possible afin de diminuer la pression de sélection. C'est dans ce but que l'on priorise l'amoxicilline (1g 3 fois par jour pendant 7 jours) puis en cas de résistance le pivmécillinam (400mg 2 fois par jour pendant 7 jours) et enfin la nitrofurantoïne (100mg 3 fois par jour pendant 7 jours).

En ce qui concerne les cystites récidivantes, une antibioprophylaxie est recommandée si la fréquence des cystites est d'au minimum un épisode par mois. Il est alors recommandé d'utiliser en première intention la fosfomycine (tous les 7 jours au maximum et avant les rapports si cystites post coïtales) ou bien le triméthoprim (1 fois par jour au coucher ou avant les rapports si cystites post coïtales). En deuxième intention le cotrimoxazole, qui correspond à l'association du triméthoprim et du sulfaméthoxazole peut également être utilisé (1 fois par jour au coucher ou avant les rapports si cystites post coïtales) (9).

I.4.4.2. Les pyélonéphrites

En cas de pyélonéphrites, l'ECBU est indispensable et l'antibiothérapie débute immédiatement après le prélèvement par une céphalosporine de troisième génération ou bien par une fluoroquinolone. Une désescalade thérapeutique doit ensuite être effectuée dès l'obtention des résultats de l'antibiogramme. D'après la SPILF, le choix de l'antibiothérapie de relais doit être discuté entre l'amoxicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, les fluoroquinolones, le céfixime et le triméthoprim-sulfaméthoxazole sachant qu'il est préférable d'instaurer l'antibiotique avec le spectre le plus étroit possible.

I.4.4.3. Les prostatites

Concernant les prostatites, la prise en charge est différente, du fait de la nature de l'organe atteint. En effet, certains antibiotiques ont une mauvaise diffusion dans le tissu prostatique. On ne privilégie donc pas les antibiotiques à spectre étroit mais les fluoroquinolones et le cotrimoxazole, dont la diffusion prostatique est importante. Le traitement probabiliste est à éviter si le patient est pauci symptomatique et repose sur l'administration de fluoroquinolones s'il est nécessaire. Il est ensuite nécessaire de confronter les résultats de l'antibiogramme avec la prescription initiale. Les fluoroquinolones peuvent être conservées si la souche mise en cause est sensible à ces molécules. Le cas échéant, on privilégie le cotrimoxazole qui a une diffusion excellente mais dont le niveau de preuve de son efficacité est plus faible.

Ces différentes recommandations montrent l'importance de l'antibiogramme dans la prise en charge du patient et l'épargne thérapeutique. De plus, la rapidité de rendu des résultats permet d'adapter l'antibiothérapie et de préserver l'écologie microbienne.

I.5. Détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques

Afin de déterminer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique donné, deux types de méthodes sont disponibles : les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques. Les méthodes phénotypiques sont les plus proches de la réalité clinique : elles mesurent la croissance effective de la bactérie en présence d'un antibiotique et donc détectent les résistances exprimées par celle-ci. En revanche elles présentent l'inconvénient d'être longues et engendrent donc un délai de rendu de résultats important. Les méthodes génotypiques quant à elles sont basées sur la détection des gènes de résistance, en faisant des méthodes particulièrement rapides mais qui ne permettent pas de déterminer si ces gènes s'expriment effectivement chez la bactérie.

I.5.1. Tests phénotypiques

Les résistances acquises aux antibiotiques sont nombreuses et surtout imprévisibles. Lors d'une infection à une souche bactérienne donnée nécessitant un traitement, il est essentiel de déterminer le profil de sensibilité de cette souche aux antibiotiques afin de traiter par un antibiotique adapté. On appelle cela réaliser un « antibiogramme ».

Il existe deux grands types de méthodes utilisées au laboratoire pour tester la sensibilité aux antibiotiques : la microdilution en milieu liquide et la diffusion en milieu gélosé.

I.5.1.1. Tests en milieu liquide

I.5.1.1.1. Macrodilution en milieu liquide

La macrodilution en milieu liquide est la méthode d'antibiogramme la plus ancienne. Son principe est simple : l'antibiotique à tester est dilué au demi, en cascade, afin d'obtenir une gamme avec des concentrations décroissantes d'antibiotique. La dilution est effectuée avec du bouillon Mueller Hinton, milieu de référence de l'antibiogramme, qui permet la culture de nombreux micro-organismes non exigeants. Une quantité fixe de suspension bactérienne est ensuite ajoutée dans chaque tube, cette quantité est de $5 \cdot 10^5$ UFC/mL équivalent à 0,5 McFarland (turbidité de la suspension bactérienne). Les tubes sont ensuite mis à incuber durant la nuit à 35°C et leur turbidité est évaluée le matin. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber la croissance bactérienne visible à l'œil nu (Figure 23) (45).

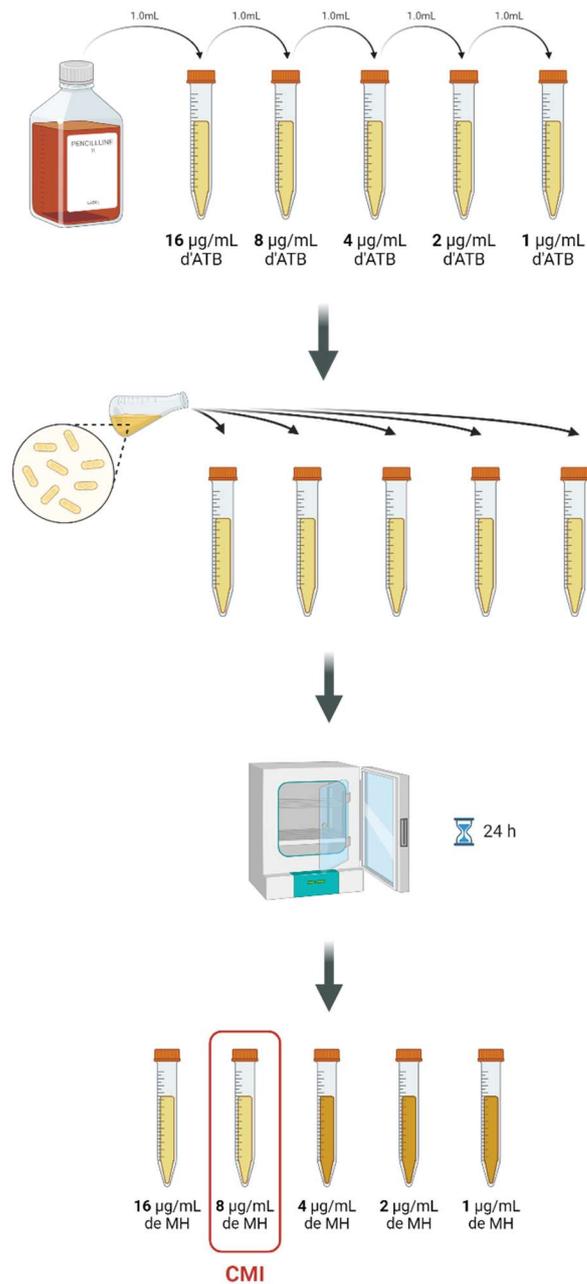


Figure 23 : Principe de la macrodilution en milieu liquide

Cette méthode présente comme principal avantage l'obtention de la CMI. En revanche, le temps nécessaire à la mise en œuvre, l'espace requis et le nombre potentiel d'erreurs lors de la réalisation de cette technique manuelle a contraint les laboratoires à miniaturiser cette technique laissant place à la microdilution en milieu liquide.

I.5.1.1.2. Microdilution en milieu liquide

La microdilution en milieu liquide reprend le même principe que la macrodilution mais les tubes sont miniaturisés sous forme de puits afin d'utiliser moins de réactifs. Cette méthode est aujourd'hui la méthode de référence contre laquelle toutes les nouvelles techniques doivent être comparées. Cela se présente sous forme d'une plaque plastique composée de 96 puits contenant chacun des concentrations croissantes des différents antibiotiques déshydratés testés : 12 antibiotiques peuvent être testés avec 8 dilutions différentes. La suspension bactérienne standardisée à 0,5 McFarland est ensuite diluée et ajoutée à chaque puit, puis la plaque est mise à incuber 16-24 heures, à 35°C. La lecture est ensuite effectuée par évaluation visuelle de la croissance bactérienne et la CMI est déterminée de la même façon que précédemment (Figure 24).

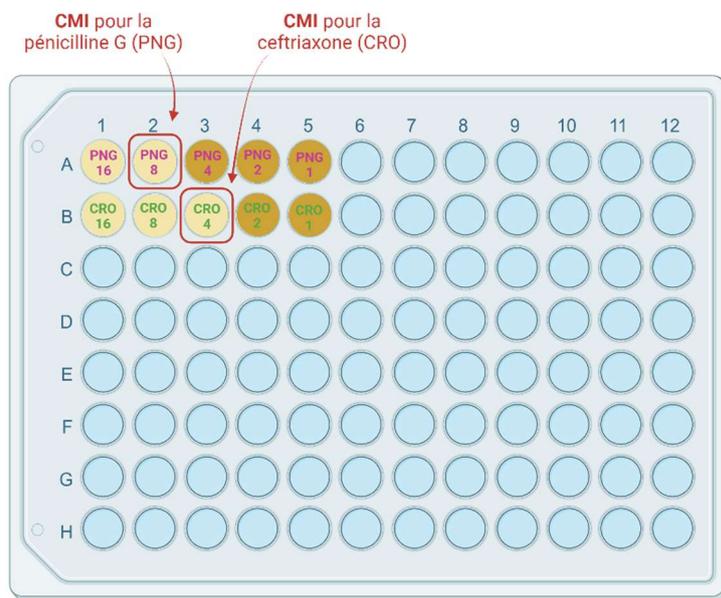


Figure 24 : Schéma d'une plaque de microdilution en milieu liquide

Cette miniaturisation permet la semi-automatisation de la méthode et l'intégration dans la pratique courante des laboratoires. Cela représente également un gain d'espace et de temps pour les laboratoires qui n'ont plus qu'à préparer une solution à 0,5 McFarland de la souche bactérienne à étudier qui est ensuite répartie automatiquement dans la plaque. Des cartes peuvent également être utilisées, les fournisseurs en proposent plusieurs avec des panels d'antibiotiques adaptés à la bactérie d'intérêt ou même parfois à l'infection comme c'est le cas avec la carte N372 pour les ITU (Figure 25). Un système de détection est intégré à l'appareil et contrôle la croissance bactérienne par analyse continue ou itérative de la turbidité, permettant de rendre une CMI en 6 à 11 heures, temps technicien compris.



Figure 25 : Principe d'automatisation de la microdilution en milieu liquide (carte Vitek 2)

I.5.1.2. Tests en milieu solide ou gélosé

I.5.1.2.1. Méthode des disques

Le test de sensibilité par la méthode de diffusion des disques consiste à ensemencer un inoculum bactérien standardisé (en pratique 0,5 McFarland) sur une gélose et ensuite d'apposer à la surface différents disques contenant chacun une quantité fixe d'antibiotique. La gélose est mise à incuber 16-24 heures puis les diamètres d'inhibition autour de chaque disque d'antibiotique sont mesurés en millimètres (Figure 26). Ils sont ensuite comparés à un diamètre critique permettant de catégoriser la souche sensible ou résistante à l'antibiotique utilisé. Cependant, cette méthode ne permet pas de rendre une CMI, elle est dite « qualitative ». Elle est particulièrement utile pour les souches nécessitant une atmosphère particulière pour permettre la croissance bactérienne comme les bactéries anaérobies strictes.

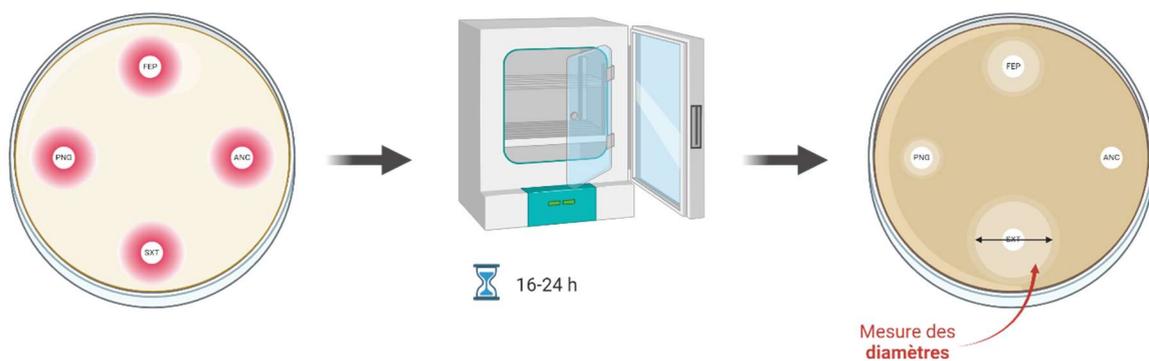


Figure 26 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode des disques

I.5.1.2.2. Méthode du gradient de diffusion

Cette méthode utilise une bandelette chargée d'antibiotique avec un gradient de concentrations croissant. Les bandelettes commercialisées par le fabricant bioMérieux sont appelées « E-test® » et sont largement utilisées dans les laboratoires français. Ces bandelettes sont imprégnées d'antibiotiques déshydratés sur leur face postérieure en contact avec la gélose. Sur la face antérieure on retrouve une graduation correspondant à la concentration d'antibiotique permettant de lire la CMI. La gélose est ensemencée avec la souche bactérienne d'intérêt à concentration fixe de 0,5 McFarland puis la bandelette de l'antibiotique à tester est déposée à sa surface. L'antibiotique contenu à la face postérieure de la bandelette diffuse dans la gélose, qui est mise à incuber 16 à 24 heures. Après l'incubation, la lecture de la CMI est faite visuellement et correspond au croisement entre l'ellipse et la graduation de la bandelette (Figure 27), cette méthode est dite « quantitative ».

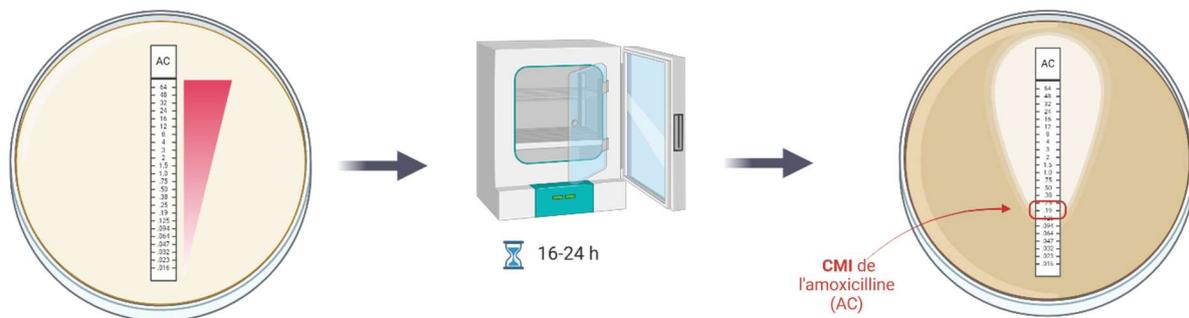


Figure 27 : Principe de détermination de la CMI par la méthode du gradient de diffusion

I.5.1.3. Interprétation des résultats de l'antibiogramme phénotypique

Ces différents tests permettent d'obtenir des CMI ou des diamètres d'inhibition qui sont ensuite interprétés en se rapportant aux recommandations du CA-SFM. Pour chaque couple espèce bactérienne-antibiotique, des valeurs critiques sont établies sur trois critères : l'épidémiologie de la bactérie, la pharmacocinétique-pharmacodynamie du médicament et la probabilité de succès thérapeutique. Les bactéries peuvent alors être catégorisées « sensibles », « sensibles à forte posologie » ou « résistantes » vis-à-vis des différents antibiotiques testés.

Si la CMI déterminée est inférieure ou égale à la concentration critique sensible alors la souche est catégorisée « sensible », une faible concentration d'antibiotique inhibe la croissance bactérienne (Figure 28). Si la CMI est strictement supérieure à la concentration critique alors la souche est catégorisée « résistante ». Dans certains cas, il existe une plage de CMI comprise entre la concentration critique sensible et la concentration critique résistante, ne permettant pas de catégoriser la souche sensible ou résistante, on parle alors de « sensibilité à forte posologie ».

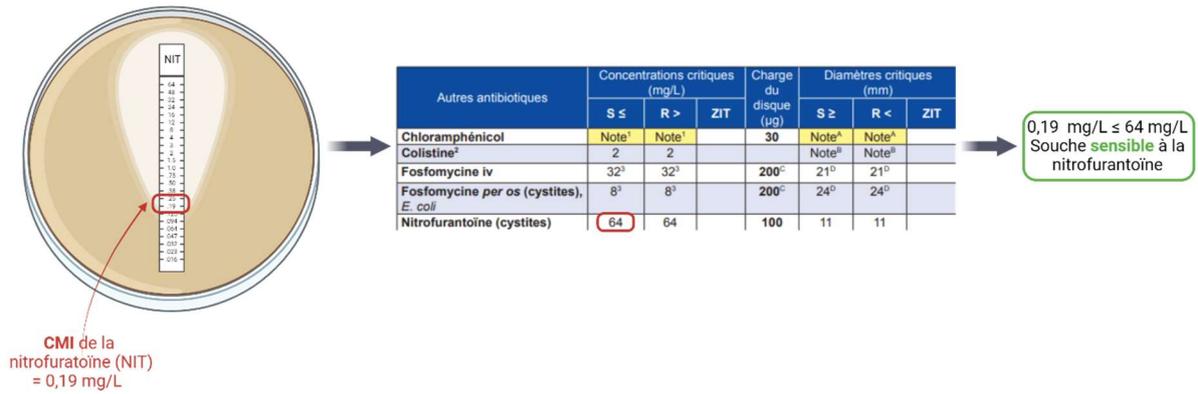


Figure 28 : Principe de catégorisation "sensible" à la nitrofurantoïne selon la CMI de cette souche

L'interprétation est similaire en ce qui concerne les diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques que l'on compare aux diamètres critiques issus des recommandations du CA-SFM. Si la bactérie ne parvient pas à pousser autour de l'antibiotique, le diamètre est supérieur ou égal au diamètre critique, l'antibiotique est suffisamment puissant pour inhiber la croissance bactérienne, la souche est catégorisée « sensible » (Figure 29). En revanche, si le diamètre est inférieur au diamètre critique, l'antibiotique est inactif sur la bactérie qui parvient à pousser malgré la présence de l'antibiotique, la souche est catégorisée « résistante ».

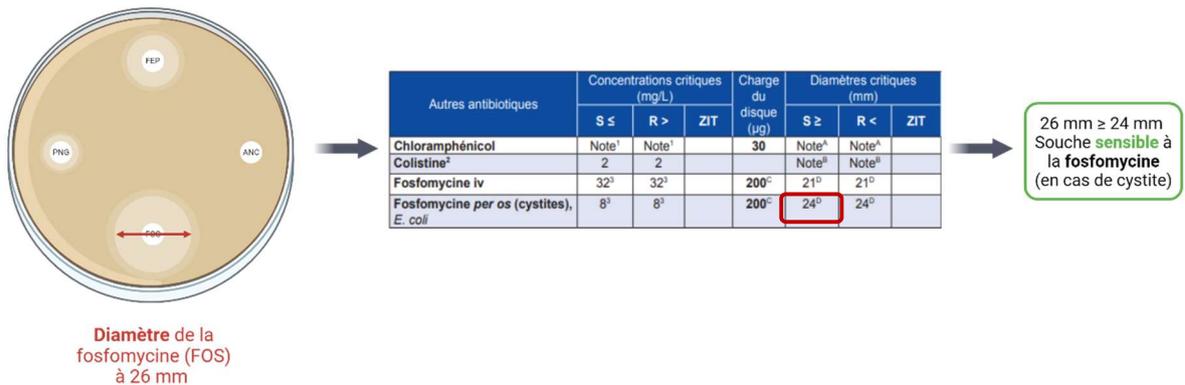


Figure 29 : Principe de la catégorisation "sensible" à la fosfomycine selon le diamètre d'inhibition de la souche

I.5.2. Tests génotypiques

Ces tests sont majoritairement basés sur la détection des gènes de résistances aux antibiotiques par des techniques d'amplifications géniques par PCR, d'hybridation sur puces ou de séquençage complet du génome bactérien.

La plus fréquemment utilisée en routine est la PCR en temps réel, qui suit l'évolution du nombre d'amplicons d'ADN impliqués dans la résistance aux antibiotiques. En plus de permettre un rendu rapide des résultats, ces PCR existent sous forme multiplex. Cette technologie permet de détecter plusieurs gènes de résistances simultanément. Ces tests

permettent un rendu de résultat en moins de 2 heures ce qui représente un gain de temps considérable lorsque le pronostic vital du patient est engagé.

Les méthodes génotypiques présentent de nombreux avantages : en effet, elles permettent d'obtenir des informations sur les résistances des bactéries à croissance lente ou difficile, d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques directement sur le prélèvement sans passer par une étape de culture bactérienne, et surtout elles permettent d'obtenir une réponse rapide pour les patients ayant un lourd contexte clinique. Ces techniques permettent également de détecter la présence d'un gène de résistance, qui, faiblement exprimé peut être imperceptible par les méthodes phénotypiques conventionnelles.

En revanche seuls les gènes connus et donc ciblés par ces méthodes sont décelables, ce qui empêche la détection de nouveaux mécanismes de résistances. Ils sont limités en nombre : détection du gène *ctx-M* et des gènes de carbapénémases pour les bactéries à Gram négatif. De plus, les résistances qui résultent de l'accumulation de différents mécanismes sont également difficilement détectables. Cela permet à ces techniques de rendre a priori un phénotype de résistance mais elles sont incapables d'affirmer la sensibilité phénotypique à une molécule donnée. Enfin, le niveau d'expression du gène et la CMI ne peuvent être obtenues ce qui peut entraver la prise de décision lors du traitement de certaines infections (46).

Ces techniques sont particulièrement onéreuses et présentent un intérêt limité en ce qui concerne les ITU. Elles ne sont donc pas utilisées en routine et le délai classique du rendu de résultat de l'antibiogramme est maintenu.

1.5.3. Délai de rendu de l'antibiogramme d'un *Escherichia coli* isolé d'une urine

Comme démontré auparavant, le délai de rendu de l'antibiogramme est crucial dans la prise en charge du patient et la préservation de l'écologie microbienne. En effet, les antibiothérapies probabilistes sont fréquemment prescrites dans les ITU. Le clinicien choisit l'antibiotique sans avoir connaissance de la bactérie responsable ni de son antibiogramme. Cette pratique vise à pallier une latence, incompressible aujourd'hui, entre le prélèvement et le rendu du résultat par le laboratoire.

Dans le cadre d'un ECBU, le prélèvement urinaire est effectué avant l'antibiothérapie, puis envoyé au laboratoire. Dès lors, le médecin prescripteur met en place une antibiothérapie si la suspicion clinique est forte et/ou que les symptômes sont très importants. Le rendu de résultats du laboratoire permet par la suite d'adapter le traitement.

Dès réception, l'urine estensemencée au laboratoire sur des boîtes de Pétri adaptées qui sont mises à l'étuve à 35-37°C puis la cytologie est effectuée (décompte des globules blancs et des globules rouges). Après 16 à 24 heures, les géloses sont analysées et si une bactérie est présente, l'identification est lancée parallèlement à l'antibiogramme. Le résultat de l'identification de la bactérie est rapide, environ 1 heure en pratique grâce à la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Désorption ionisation laser assistée par matrice de pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol). L'antibiogramme, quant à lui, nécessite la croissance des bactéries et n'est donc lisible que 10 à 24 heures après. Au total l'antibiothérapie ne peut être adaptée qu'après 36 à 48 heures (Figure 30) et le plus souvent au-delà.

Le temps de rendu du résultat affecte d'une part le patient, qui peut ne pas bénéficier du traitement adapté le temps que les résultats du laboratoire soient disponibles et d'autre part l'écologie bactérienne. L'utilisation d'antibiotiques à large spectre permettant d'assurer un minimum d'échec clinique accroît la pression de sélection et donc le nombre de bactéries résistantes.

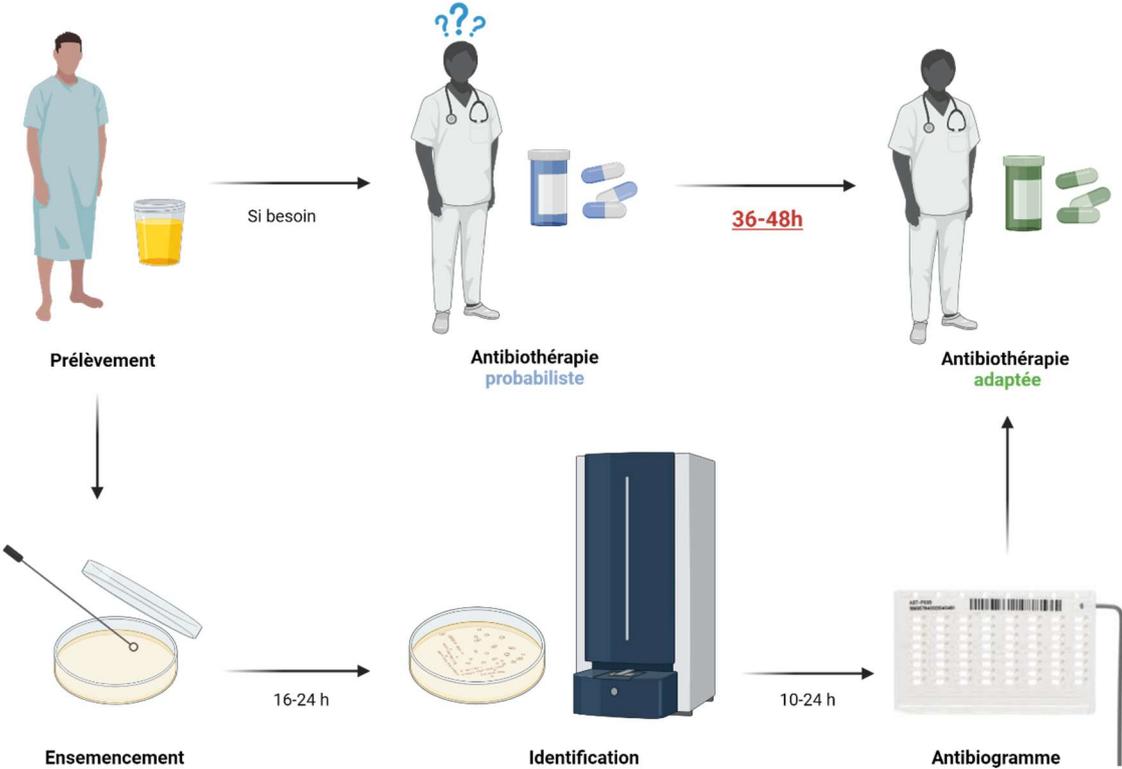


Figure 30 : Prise en charge classique d'un ECU au laboratoire

I.6. Les antibiogrammes phénotypiques rapides

L'enjeu actuel est de diminuer le délai de rendu de résultat de l'antibiogramme afin de permettre au clinicien d'effectuer une prescription initiale d'antibiotiques adaptés. Pour que cela soit compatible avec une journée classique en clinique, l'antibiogramme doit être rendu dans un délai de 6 à 8 heures maximum (47). La précocité de rendu des résultats permet d'épargner l'antibiothérapie probabiliste à large spectre préservant ainsi l'écologie microbienne et permettant au patient de bénéficier d'un traitement ciblé. Depuis plusieurs années, la recherche est encouragée, à l'échelle nationale et internationale, afin de développer des méthodes d'antibiogrammes rapides, fiables, peu coûteuses et quantitatives (permettant d'obtenir des valeurs de CMI). De nombreux projets ont alors vu le jour dont certains ont été commercialisés ou sont en cours de commercialisation.

I.6.1. Méthode RAST par diffusion gélosé

Peu de méthodes d'antibiogrammes rapides (RAST pour rapid AST) se concentrent sur le classique antibiogramme par diffusion en milieu gélosé, or, compte tenu de l'automatisation des laboratoires, celle-ci semble pouvoir être améliorée et fournir des résultats plus rapidement que les méthodes de routine actuelles. L'EUCAST a ainsi développé une lecture automatisée et rapide de celui-ci afin qu'il puisse être lu et interprété précocement. Celle-ci se concentre uniquement sur les hémocultures positives qui peuvent être analysées de manière automatisée après 4h, 6h et 8h d'incubation et fournir un résultat dès que la croissance bactérienne est visualisable. Un inoculum et des diamètres spécifiques sont utilisés (48).

De plus, une gélose (MHR) a été mise au point afin de permettre une croissance plus rapide et donc une lecture dès 6-8 heures d'incubation. L'inoculation directe d'hémocultures positives ou d'échantillons d'urines permet un rendu de résultats plus 40 heures avant les méthodes standard concernant les antibiogrammes des germes urinaires (49). L'antibiogramme est interprété à l'aide des diamètres critiques classiques déterminés par le CA-SFM.

I.6.2. Méthodes innovantes commercialisées ou en cours de commercialisation

La plupart des méthodes sur lesquelles s'appuient les RAST sont basées sur la croissance bactérienne. Cette croissance est analysée en présence d'antibiotique et est ensuite comparée à un échantillon dit « contrôle » incubé en l'absence d'antibiotiques. Ces différentes méthodes sont compilées dans le Tableau 3 ainsi que leur approbation par la FDA, permettant un accès au marché Américain et le marquage CE-IVD (Conformité Européenne In Vitro Diagnostic) permettant un accès au marché Européen.

Plusieurs méthodes récemment commercialisées reposent sur la microscopie en temps réel, méthode semblant la plus prometteuse afin de réduire le délai de rendu des

résultats. Différentes entreprises ont développé des RAST basés sur cette technique notamment Accelerate Diagnostics (PhenoTest BC), Quantamatrix (dRAST) et Q-linea (ASTar) permettant une analyse directement à partir de flacons d'hémoculture. La microscopie haute résolution permet un décompte bactérien précoce (dès 120 bactéries) ainsi que l'analyse de la morphologie, de la vitesse de réplication et pour certaines de la cinétique bactérienne. La population bactérienne est régulièrement visualisée et est ensuite traduite en courbes de croissance permettant de déterminer la sensibilité ou la résistance de la souche vis-à-vis de l'antibiotique (50,51) (délai de rendu des résultats : 4 à 7 heures selon les techniques).

La microscopie en temps réel a également été couplée à la microfluidique par l'entreprise Gradientech afin de proposer le test QuickMIC. La microfluidique consiste à faire circuler dans un canal contenant les bactéries des concentrations croissantes d'antibiotiques et l'évolution bactérienne est analysée par microscopie grâce à une échelle de tonalité de gris. Ce gradient permet d'éviter la multiplication des puits de culture afin d'effectuer un maximum de test parallèlement. Il est à noter que ce test est possible sur souche isolées ou directement à partir de flacons d'hémocultures positifs (délai de rendu des résultats : 2 à 4 h) (52).

Cependant ces différents tests basés sur la microscopie en temps réel nécessitent une optique haute résolution ainsi qu'une fréquence d'analyse élevée des différents endroits de culture ce qui rend ces automates extrêmement coûteux et le multiplexage ardu.

L'Alfred 60 AST est développé par une société italienne sur le principe de modification de dispersion du faisceau laser projeté sur un bouillon de culture additionné d'antibiotiques. Une bactérie résistante à l'antibiotique étudié a la capacité de se multiplier malgré la présence de celui-ci et donc de troubler le milieu de culture. Ce bouillon trouble va disperser avec plus d'intensité la lumière du faisceau laser et donc diminuer la quantité de lumière perçue par le capteur. Les résultats sont traduits en une courbe qui est comparée à celle de la culture sans antibiotique (contrôle) afin de déterminer la sensibilité ou la résistance de la souche bactérienne (délai de rendu des résultats : 4 à 6 h) (53).

Une méthode très prometteuse basée sur la quantification de l'impédance est commercialisée par l'entreprise iFAST. Elle présente l'avantage de pouvoir être réalisée sur des flacons d'hémocultures positifs ainsi que sur des urines. Celles-ci sont incubées 30 min afin de faire entrer les bactéries en division puis incubées 30 minutes avec différents antibiotiques à diverses concentrations et enfin analysées par cytométrie d'impédance. Les caractéristiques électriques mesurées sont le reflet de l'activité de l'antibiotique sur la bactérie et permettent la catégorisation clinique (délai de rendu des résultats : 3 heures pour le sang et 4 heures pour les urines) (54).

Le Vitek® Reveal™ commercialisé par bioMérieux repose sur un réseau de capteurs colorimétriques permettant la détection de substances organiques volatiles émises lors de la croissance bactérienne. La variation de couleur des capteurs est évaluée toutes les 10 minutes (délai de rendu des résultats : 5 à 6 h) [44] [45].

Pour finir sur les méthodes basées sur la croissance bactérienne, l'une des plus efficace en terme de rapidité utilise la nanofluidique. Développée par Sysmex, le système PA-100 AST est capable de piéger les bactéries dans des nanocanaux ce qui permet de visualiser en temps réel la division bactérienne via un microscope à contraste de phase. Celui-ci compare le canal additionné d'antibiotique avec le canal contrôle afin de déterminer l'impact de l'antibiotique sur les bactéries. Cette technologie, encore en développement, serait capable

d'effectuer l'analyse directement à partir d'urines et pourrait à l'avenir être disponible directement chez le médecin généraliste ainsi que dans les services d'urgences afin de guider la prescription (délai de rendu des résultats : 45 min) (57,58).

Ces diverses méthodes présentent l'inconvénient d'être basées sur la croissance bactérienne dont le temps est difficilement compressible. Elles perdent donc en rapidité de rendu de résultats et ne sont pas validées pour les bactéries à croissance lente telles que celles du groupe HACEK (*Haemophilus* sp, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella* sp) par exemple.

En réponse à cette problématique, le kit FAST-inov AST indépendant de la croissance bactérienne a été développé par la société du même groupe. Il utilise la technique de la cytométrie en flux, largement utilisée dans d'autres domaines de la biologie notamment en hématologie. Un colorant fluorescent se lie aux bactéries et permet la mise en évidence des dommages subis par celles-ci en présence d'antibiotiques. Ces variations de fluorescence sont analysées par le logiciel BioFast développé par la même entreprise. Cet antibiogramme est vendu comme étant l'antibiogramme « le plus rapide du monde » actuellement. En effet, cette technologie est en mesure de rendre un phénotype de résistance en 2 h seulement (59).

Tableau 3 : Méthodes commercialisées ou en cours de commercialisation

Nom de l'entreprise	Nom du test	FDA approbation	Marquage CE-IVD	Matrice	Technique	CMI	Temps total
Gradientech	QuickMIC	Non	Oui	Hémoculture	Microfluidique +	Oui	2-4 h
Quantamatrix	dRAST	Non	Oui	Hémoculture	Microdilution + microscopie en temps réel	Oui	4h
Q-linea	ASTar	Oui	Oui	Hémoculture		Oui	6h
Accelerate diagnostics	Accelerate Pheno	Oui	Oui	Hémoculture		Oui	6h30
AliFax	Alfred 60 AST	Non	Oui	Hémoculture Urine Liquides biologiques	Dispersion de la lumière	Non	4-6h
bioMérieux	Vitek Reveal	Oui	Oui	Hémoculture	Biocapteurs de substances volatiles	Oui	5-6h
FastInov	FastInov AST	Non	Oui	Hémoculture	Cytométrie en flux optique	Non	2h
iFast	iFast AST	Non	Non	Hémoculture Urine	Microfluidique + Cytométrie en flux d'impédance	Oui	3h (sang) 4h (urine)
Sysmex	PA 100 AST	Non	Non	Urine	Nanofluidique + microscope à contraste de phase	Non	45min

I.6.3. Méthodes innovantes en développement

Le nombre de RAST en développement étant très important, seules certaines techniques seront développées ici. Ces méthodes sont expérimentales et doivent encore

transiter vers l'état de tests diagnostics de laboratoires et être approuvées afin de pouvoir être utilisées en routine. Parmi elles, nous pouvons noter :

- La nano-mobilité bactérienne couplée à l'intelligence artificielle qui offre des résultats prometteurs et innovants par rapport aux méthodes pré-existantes. Cette technique est développée par Resistell™, une start-up suisse, menant actuellement des tests de validation technologique dans le but de commercialiser cette nouvelle approche. Cette méthode se base sur la mesure des « vibrations » bactériennes des souches en suspension avec et sans antibiotiques, qui seraient le témoin de la viabilité bactérienne. En présence d'antibiotique efficace, le fitness de la bactérie diminue. Les modifications de vibrations qui en découlent sont captées sous forme d'un signal qui va être analysé ensuite par une intelligence artificielle permettant de qualifier la bactérie de « sensible » ou « résistante » à un antibiotique donné. L'avantage de cette méthode réside dans son indépendance vis-à-vis de la croissance bactérienne, étant uniquement basée sur la nano-mobilité. Elle permet d'évaluer en 2 heures la réponse à un antibiotique, et ce sans limite d'espèce bactérienne, qu'elle soit de croissance rapide ou lente. Typiquement, la réponse de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie à croissance lente) aux antibiotiques pourrait être évaluée en 2 heures seulement, ce qui représente un gain de temps considérable en comparaison aux méthodes conventionnelles, permettant d'obtenir un antibiogramme en un mois environ (60).
- Parmi ces méthodes émergentes, nous pouvons également évoquer la spectrométrie de masse MALDI TOF déjà utilisée pour l'identification des différents micro-organismes en routine dans les laboratoires. Cette technologie est capable de détecter rapidement la croissance par analyse des changements protéiques et donc de déterminer la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques. Cette méthode est actuellement étudiée pour la détection d'enzymes de résistance (délai de rendu des résultats : 3 h) (61).
- La spectroscopie Raman améliorée par les surfaces est basée sur le phénomène physique selon lequel la lumière circulant dans un milieu est légèrement modifiée selon les caractéristiques de celui-ci. Une lumière monochromatique est émise sur l'échantillon à tester et le faisceau lumineux qui en ressort est analysé. L'échange d'énergie entre le faisceau lumineux et le milieu traversé est dépendant des molécules émises lors de la croissance bactérienne (délai de rendu des résultats : 4 h) (62).
- La SNDA-AST est une technique permettant l'obtention d'un antibiogramme en 3 heures. Elle a été développée au sein de la faculté du Technion (Israël) et a donné naissance à la start-up Nanosynex. Elle repose sur des microplaques composées de plusieurs puits accueillant des gouttelettes nanométriques auxquelles est ajouté l'antibiotique ainsi que la résazurine. La transformation de la résazurine en composé fluorescent est proportionnelle à la respiration des cellules et donc à leur viabilité. L'utilisation de la fluorescence permet d'augmenter la sensibilité de détection de ce phénomène et limite donc l'utilisation d'optique haute résolution. Cette technique présenterait plusieurs avantages : l'indépendance vis-à-vis de la réplication cellulaire et la capacité à pouvoir être réalisée directement à partir de flacons d'hémocultures positifs ou d'échantillons urinaires (délai de rendu des résultats : 3 h) (63).

Des méthodes, non détaillées dans cette partie se basant sur les mêmes principes que les techniques commercialisées (cytométrie en flux, microfluidique (64), biocapteurs, microscopie en temps réel...) sont en développement et permettront probablement des améliorations dans le futur.

I.7. Le fractionnement par couplage flux force (FFF)

La chromatographie est sans doute la technique la plus performante pour séparer des espèces de petite et moyenne taille, cependant elle présente deux inconvénients majeurs : sa capacité de séparation est amoindrie sur les analytes supramoléculaires (adsorption quasi irréversible sur la phase stationnaire) et la force de cisaillement important qu'elle exerce peut altérer les analytes. C'est dans le but de s'affranchir de ces inconvénients que JC Giddings, en 1960, introduit pour la première fois la technique de fractionnement par couplage flux-force (FFF) qui s'apparente à une méthode de chromatographie liquide sans phase stationnaire. Les systèmes de FFF sont composés, comme les systèmes de chromatographie liquide, d'une pompe, d'un injecteur, d'une colonne appelée « canal » séparateur et d'un détecteur (Figure 31). A la différence des systèmes de chromatographie liquide, le canal séparateur ne possède pas de phase stationnaire mais seulement une phase mobile, on parle alors de technique monophasique. La FFF présente l'avantage de séparer les analytes (nanoparticules, colloïdes et polymères) d'une large plage de dimension moléculaire allant de quelques nm à 100 μm sans les altérer. C'est cette propriété qui a fait leur renommée, en effet, l'absence de phase stationnaire diminue les contraintes exercées sur les analytes et donc minimise leur altération.

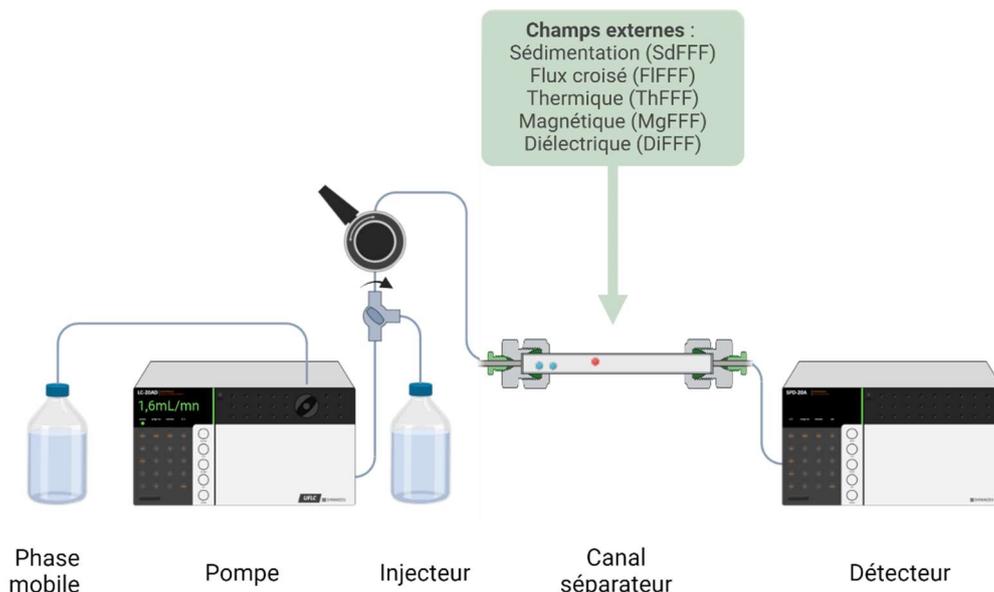


Figure 31 : Représentation schématique d'une plateforme FFF

Les plateformes FFF fonctionnent par couplage de deux forces : la première est toujours la force du flux (phase mobile) qui a un profil parabolique dans le canal de séparation et la seconde est un champ de force externe, orienté perpendiculairement à l'écoulement qui dirige les particules vers une « paroi d'accumulation ».

Cette force externe va déterminer plusieurs types de FFF différents dont seuls 5 sont significativement utilisés actuellement (Figure 32) :

- La FFF par filtration (FIFFF) consiste en l'ajout d'un second flux qui filtre à travers la paroi supérieure poreuse vers la paroi inférieure, perpendiculaire au flux laminaire

classique. Cette méthode est celle qui connaît le plus grand succès grâce à la polyvalence de ses applications et à la large gamme de tailles d'analytes qu'elle est capable de prendre en charge.

- La FFF thermique (ThFFF) : la force externe est générée par un gradient de température entre les deux parois du canal obtenu en chauffant la plaque supérieure et en refroidissant la plaque inférieure, elle est principalement utilisée pour la séparation de polymères.
- La FFF de sédimentation ou centrifuge (SdFFF ou CFFF) contient un canal plié de manière à former une roue qui tourne autour d'un axe grâce à un moteur. La seconde force couplée au flux est donc la force centrifuge exercée perpendiculairement à l'écoulement de la phase mobile, elle peut atteindre une accélération 1000 fois supérieure à celle de la gravité terrestre. Cette méthode particulièrement intéressante permet la séparation de molécules submicroniques en fonction de leur masse, de leur diamètre et de leur densité.
- La FFF magnétique (MgFFF) permet une séparation selon les moments dipolaires des nanoparticules magnétiques.
- La FFF diélectrique ou diélectrophorétique (DIFFF ou DEPFFF) exploite un champ électrique qui permet de séparer les molécules polarisables. Les charges superficielles des analytes détermineront leur position dans le canal (65,66).

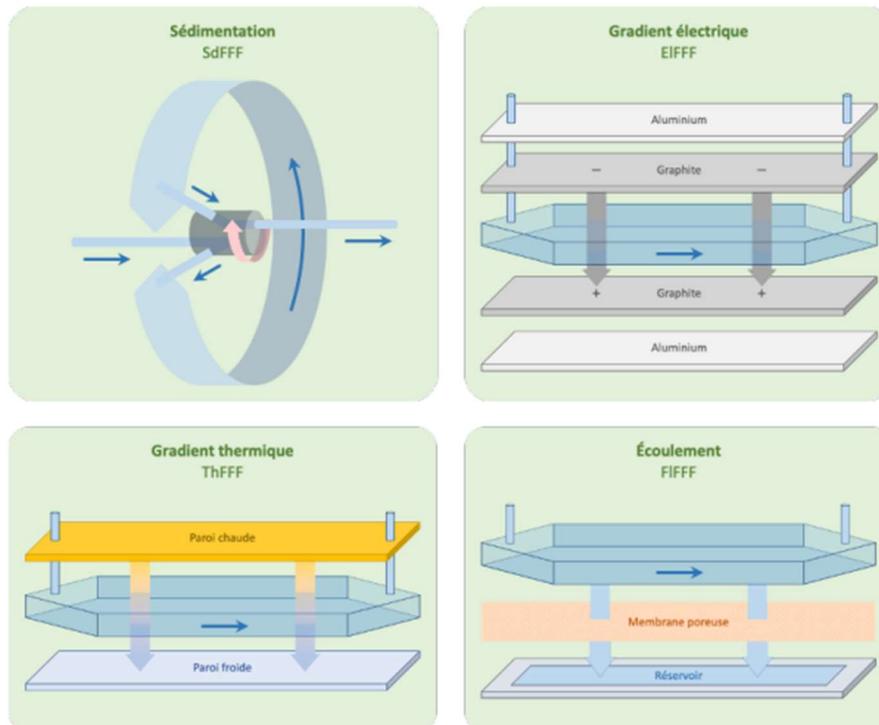


Figure 32 : Schématisation des différents types de champ de séparation utilisés en FFF (67)

I.7.1. Principe

Le principe général de la technique de FFF repose sur l'injection d'une petite quantité d'analyte qui est entraînée par la phase mobile s'écoulant de manière laminaire à travers un canal séparateur vers un détecteur. L'écoulement laminaire de la phase mobile représente la première force de séparation grâce à ses différentes lignes de flux, la vitesse d'écoulement est maximale au centre du canal et décroît au niveau des parois.

Le canal séparateur est sous forme de ruban possédant une paroi supérieure et une paroi inférieure. La paroi supérieure est la « paroi de déplétion » sur laquelle est appliqué un champ de force externe qui s'oppose perpendiculairement à l'écoulement laminaire : c'est la seconde force de séparation qui va entraîner les molécules, selon leurs caractéristiques intrinsèques vers la paroi inférieure, appelée « paroi d'accumulation ».

Le couplage de cette première force caractérisée par des lignes de flux de différentes vitesses et de cette deuxième force provoquant l'accumulation plus ou moins importante des analytes vers la paroi d'accumulation va conférer à chaque molécule une vitesse qui lui est propre et donc un temps de séjour dans l'appareil relié à ses caractéristiques intrinsèques (Figure 33) (65).

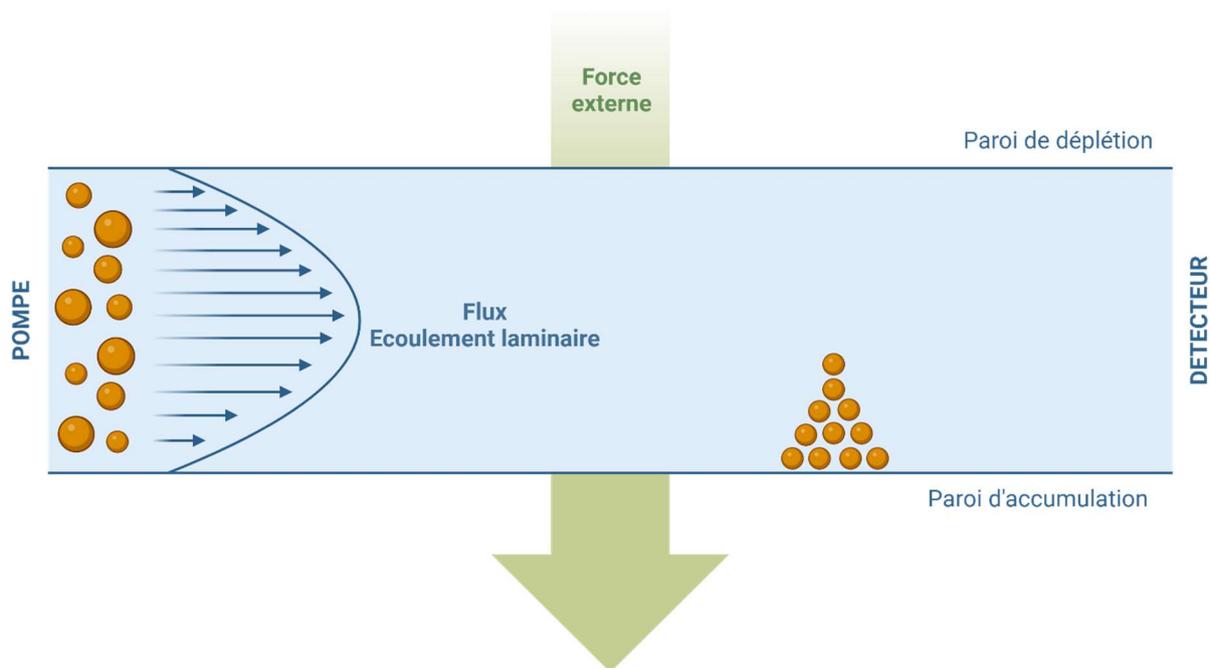


Figure 33 : Représentation schématique d'un canal séparateur de FFF

Afin d'analyser les différents temps de rétention, on détermine le facteur de rétention de l'analyte R_{obs} . Il correspond alors au temps d'éluion du volume mort t_0 , temps de sortie des espèces non retenues par le canal (temps nécessaire pour aller de l'injecteur au détecteur sans rétention) qui est divisé par le temps d'éluion de l'espèce étudiée t_r (Figure 34).

$$R_{obs} = \frac{t_0}{t_r}$$

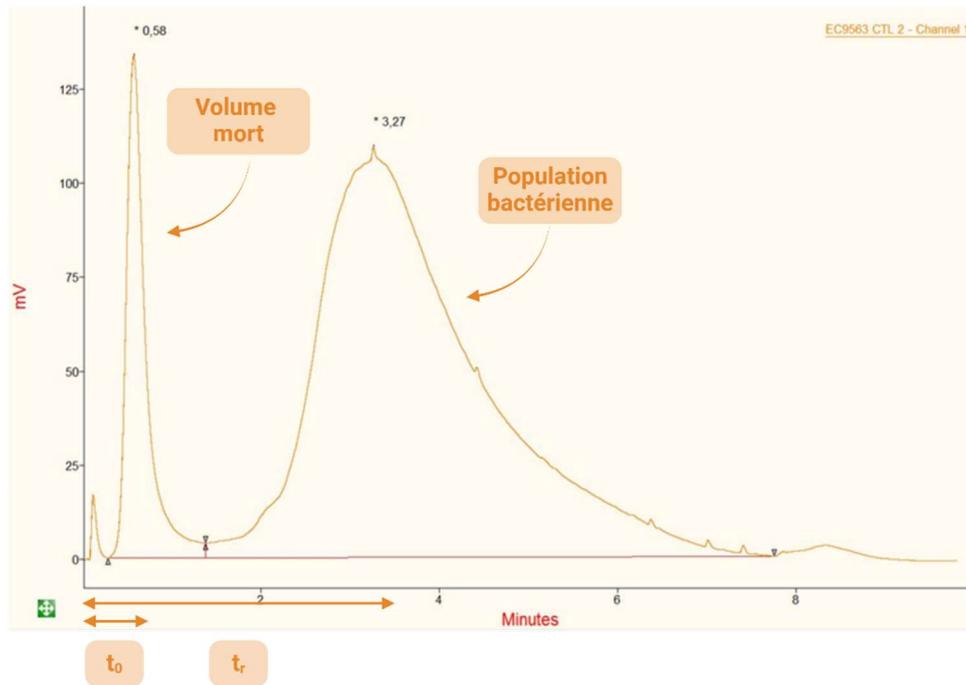


Figure 34 : Exemple de fractogramme d'une souche de *E. coli* non additionnée d'antibiotique

1.7.2. Mode d'élution

Il existe différents modes d'élution selon le positionnement des particules dans le séparateur : le mode normal, le mode inversé et le mode « hyperlayer ». Dans le mode stérique idéal, les analytes sont poussés à toucher la paroi d'accumulation qu'importe leurs tailles, or en pratique le mode d'élution va dépendre de la taille des particules que l'on souhaite analyser car chaque type d'élution permet une séparation de particules de taille bien précise.

Le mode normal ou brownien est un mode d'équilibre entre le flux et la force externe qui est appliquée entraînant les analytes au niveau de la paroi d'accumulation. La différence de rétention est due aux mouvements browniens des analytes de faible poids moléculaire qui vont leur permettre de pouvoir se positionner dans des lignes de flux plus centrales et donc plus rapides (Figure 35). Dans ce mode d'élution, les analytes les moins volumineux seront les premiers à sortir du canal. Ce mode est adapté à la séparation des nanoparticules et des macromolécules.

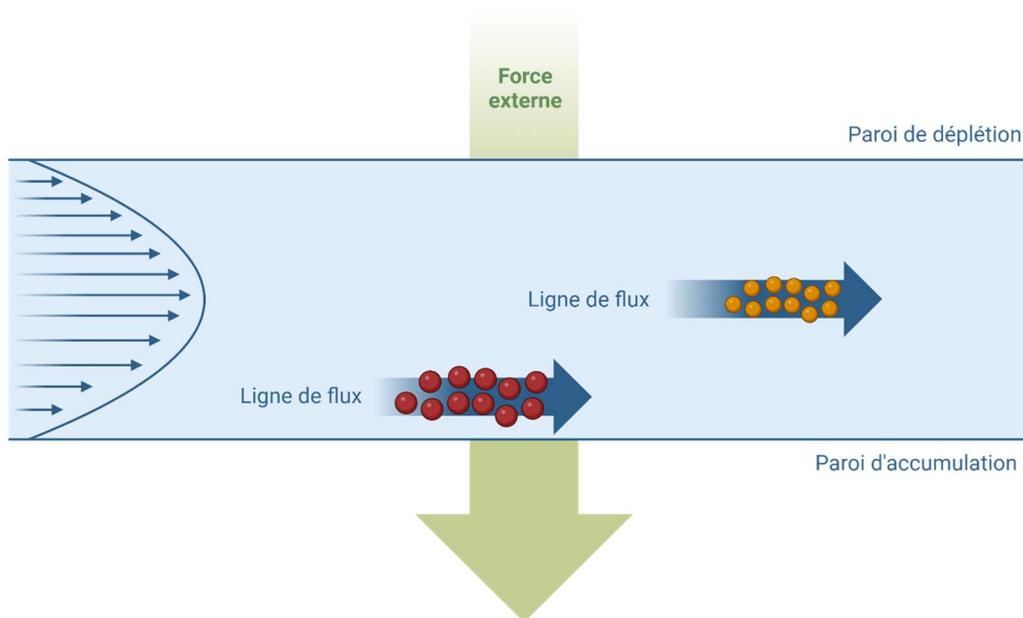


Figure 35 : Représentation schématique d'un mode d'élution normal en FFF

Lorsque les particules sont trop volumineuses pour subir l'effet brownien, on parle de mode d'élution inverse ou « stérique », les analytes sont tous entraînés vers la paroi d'accumulation. Le phénomène de séparation est dû au diamètre des analytes : ceux de diamètre plus important se situent dans une ligne de flux plus centrale que les analytes plus petits et sortiront donc en premier (Figure 36). Ce mode est dit inversé car ici les analytes les moins volumineux sortiront en dernier, contrairement au mode normal. Cependant les particules s'amoncellent au niveau de la paroi d'accumulation, il se produit alors une exclusion stérique qui limite l'efficacité de la séparation. Afin de réduire ce phénomène le mode « hyperlayer » a été développé.

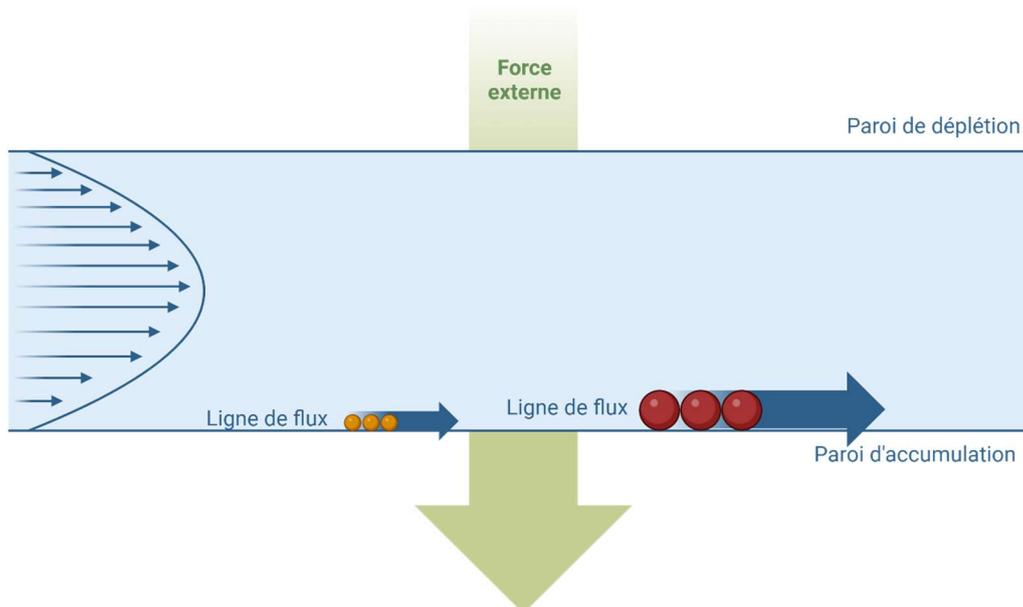


Figure 36 : Représentation schématique d'un mode d'élution inversé en FFF

Dans des conditions de débit élevé, le mode d'élution inverse va devenir « hyperlayer », les analytes subissent des forces hydrodynamiques tellement élevées que la force de portance va les décoller de la paroi d'accumulation. L'ordre d'élution sera donc le même que celui du mode inversé mais les caractéristiques physiques des analytes vont entrer en compte ce qui permet une séparation non plus uniquement sur la taille des particules mais également sur les caractéristiques intrinsèques (Figure 37). Celles-ci sont variées et peuvent être : la densité, la forme, la rigidité et les propriétés de la paroi. Ce mode de séparation est particulièrement adapté lorsque le but est non seulement la séparation des analytes mais également une analyse fine de la suspension (66).

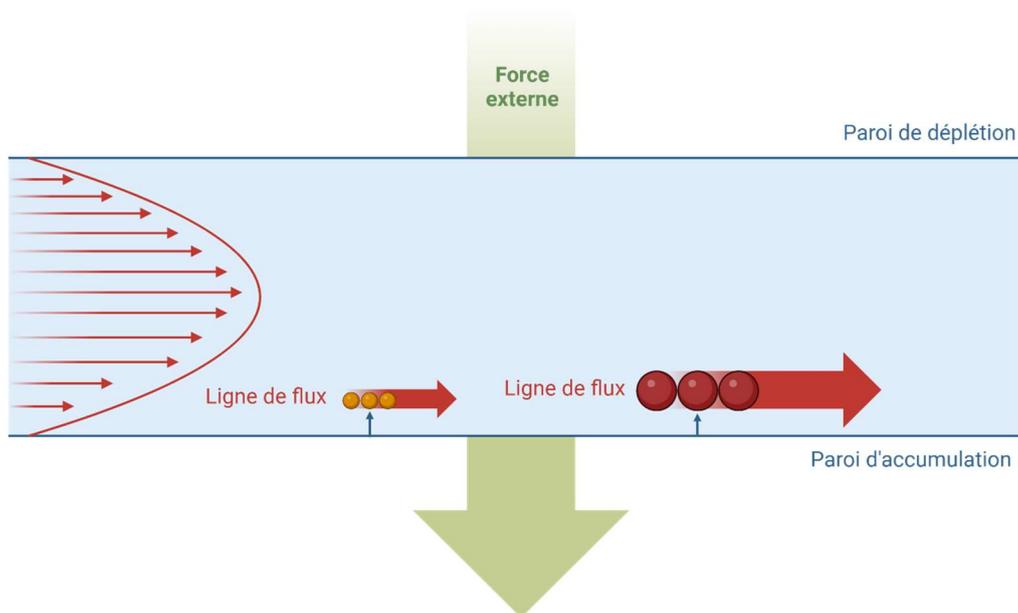


Figure 37 : Représentation schématique d'un mode d'élution "hyperlayer" en FFF

I.7.3. Applications actuelles

La technique de FFF est capable de séparer et caractériser les analytes nano ou micrométriques dans une multitude de domaines : industrie agroalimentaire, pharmaceutique et environnementale (66).

Dans le domaine de la biologie et de la biotechnologie, cette technique, bien que moins connue que d'autres méthodes séparatives, offre de nombreux avantages permettant la séparation des mélanges complexes de nanoparticules d'intérêt biologique (protéines, acides nucléiques, virus, bactéries, levures). Cette séparation fine permet de séparer mais également d'étudier les caractéristiques des analytes et notamment leurs interactions au sein d'une matrice, ce qui est possible grâce à la non altération des analytes due à l'absence de phase stationnaire (68). De plus, le traitement de cellules eucaryotes en l'absence de marquage, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la transplantation et de la thérapie ciblée (69).

Dans le domaine alimentaire, la technique de FFF permet de vérifier l'absence de nanoparticules, émanant des processus de fabrication ou de l'emballage du produit, potentiellement nocifs pour la santé des consommateurs. De plus, elle joue également un rôle dans le domaine environnemental en caractérisant les nanoparticules contenues dans les systèmes aquatiques et terrestres et en analysant l'impact sur la faune et la flore. En effet, la technique de FFF n'exerce pas de force de cisaillement sur les analytes grâce à l'absence de phase stationnaire, ce qui ne rompt pas les liaisons entre les différents analytes et permet donc l'étude d'éventuelles interactions (68).

I.7.4. SdFFF et RAST

La FFF de sédimentation (SdFFF), également appelée FFF centrifuge (CFFF), est une technique de fractionnement par couplage du flux et de la force de sédimentation (ou force centrifuge). Elle permet la séparation d'un large éventail d'analytes, des nanoparticules aux macromolécules, selon leur masse et leur densité (Figure 38).

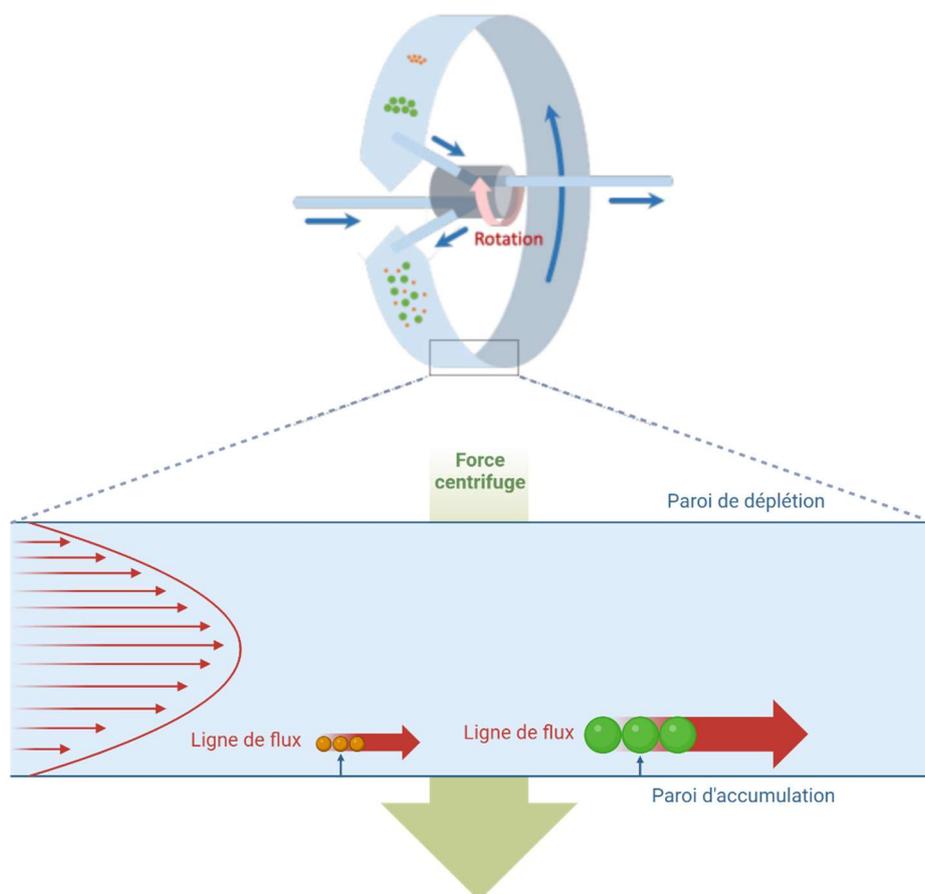


Figure 38 : Principe de la méthode de SdFFF (67)

Cette technique de FFF est particulièrement efficace pour détecter précocement les changements physicochimiques au sein des cellules. Avant même les années 2000, la SdFFF était déjà considérée comme la méthode de choix pour déterminer les densités et tailles bactériennes. Dès les années 2000, elle a été décrite comme la méthode de FFF la plus efficace pour discriminer les bactéries mortes des bactéries vivantes grâce au mode « hyperlayer » (Figure 39) (70).

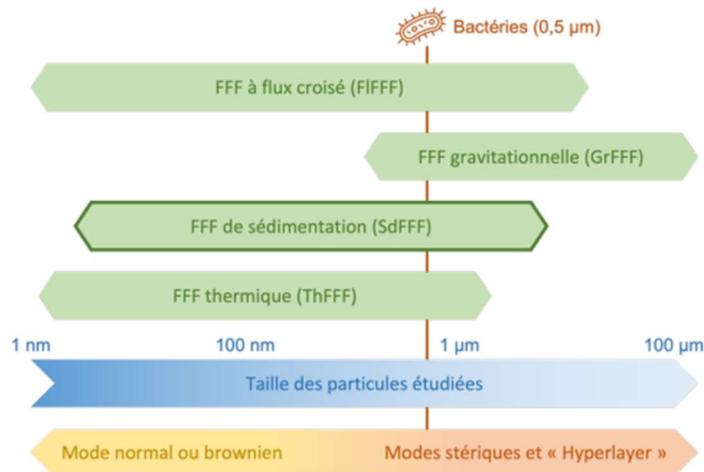


Figure 39 : Gamme de taille des analytes pris en charge par modes de FFF et modes d'élution associés (67)

Pour cette raison cette méthode a été sélectionnée pour effectuer les tests rapides de sensibilité aux antibiotiques. En effet, lorsqu'une bactérie est en contact avec un antibiotique, si elle est sensible, un changement physico-chimique s'opère au sein de la cellule bactérienne. La SdFFF est une technique capable de détecter de façon précoce les changements cellulaires. En effet, le profil d'élution d'une bactérie lésée est distinguable de celui d'une bactérie saine, permettant ainsi de catégoriser une bactérie comme « sensible » à l'antibiotique étudié. En revanche si la bactérie est résistante l'ajout d'antibiotique n'aura pas d'effet sur son profil d'élution et donc le fractogramme obtenu, représentant le temps d'élution de l'espèce bactérienne, sera superposable au fractogramme de la même bactérie en l'absence d'antibiotique.

II. Objectifs de l'étude

L'avancée considérable que connaît la microbiologie dans le domaine de la réalisation d'antibiogrammes rapides est majeure, non seulement pour la prise en charge des patients mais également pour la préservation de l'écologie microbienne. Cependant, la plupart de ces méthodes ont été développées et validées pour être utilisées sur des flacons d'hémocultures positifs. Evidemment, la précocité de la prise en charge des bactériémies conditionne le pronostic vital et la nécessité de travailler sur la rapidité de l'antibiogramme est indéniable. Cependant, les ITU représentent la première cause d'infection nosocomiale et la deuxième cause d'infection communautaire engendrant de nombreuses antibiothérapies probabilistes. C'est dans ce contexte que ce travail s'inscrit, afin de développer une technique d'antibiogramme rapide peu coûteuse et performante à partir de bactéries isolées d'urines mais aussi directement à partir de prélèvements urinaires.

Cette étude fait suite à plusieurs travaux réalisés par l'équipe de recherche de Limoges ayant pour but d'adapter la SdFFF à la réalisation d'antibiogrammes rapides. Précédemment, un plan d'évaluation de la performance de cette nouvelle technique a été mené conformément au règlement européen relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* 2017/746 et un brevet a été déposé afin d'établir la méthode en tant qu'innovation scientifique, et ainsi, la protéger.

De nombreux tests ont été réalisés afin d'optimiser la machine de SdFFF. En effet, l'utilisation d'un canal d'épaisseur réduite semble permettre une élution rapide et une dilution de l'échantillon moins importante sans infériorité sur la séparation des analytes (71). Le type d'élution a également été étudié et une séparation plus précise a été objectivée lors de l'utilisation du mode hyperlayer et donc lors de l'augmentation des forces hydrodynamiques. Plusieurs tests ont également été réalisés dans le but d'optimiser le protocole d'injection, notamment l'inoculum bactérien, le temps d'incubation minimal nécessaire, l'étape de « stop-flow », l'agitation des échantillons et les paramètres d'élutions.

Dans un premier temps, la performance technique a été évaluée. Une preuve de concept a été réalisée afin d'assurer la reproductibilité et la répétabilité des résultats. La capacité de la SdFFF à détecter très précocement les changements induits par les antibiotiques sur les souches bactériennes a été démontrée (72).

Dans un second temps, la performance clinique a été appréciée. Plusieurs souches ont été testées afin d'évaluer les performances de la SdFFF sur un plus grand nombre d'échantillons. Pour cela, 100 souches de *E. coli* ont été testées avec un panel d'antibiotiques et comparées à la méthode de référence BMD (73).

Dans un troisième temps, 50 souches ont été testées directement sur des hémocultures préparées à partir de sang de cheval défibriné inoculé avec une souche de *E. coli*. Des résultats très prometteurs ont été obtenus : 96,1% de résultats concordants avec la méthode de référence (74).

Dans cette étude, le but était d'adapter la méthode à l'analyse des ECBU. Pour cela, les antibiotiques utilisés dans les ITU ont été testés afin de mettre au point les algorithmes permettant la catégorisation des souches de *E. coli* vis-à-vis de ces molécules. Par la suite, la capacité de la SdFFF à effectuer un antibiogramme, directement à partir d'échantillons d'urines, sans étape d'isolement préalable, a été évaluée.

III. Matériels et méthodes

III.1. Antibiotiques testés

III.1.1. Antibiotiques testés dans ce travail

Plusieurs antibiotiques ont été testés tout d'abord sur des souches bactériennes afin de mettre au point le « panel urinaire » puis, directement sur des échantillons d'urines (Tableau 4).

Tableau 4 : Antibiotiques testés dans ce travail

	<i>Souches</i>	<i>Urines</i>
<i>Amoxicilline</i>	Etude antérieure	X
<i>Amoxicilline-acide clavulanique</i>	X	X
<i>Témocilline</i>	X	A venir
<i>Mécillinam</i>	X	A venir
<i>Céfixime</i>	X	A venir
<i>Nitrofurantoïne</i>	X	A venir
<i>Fosfomycine</i>	X	A venir
<i>Ciprofloxacine</i>	Etude antérieure	X
<i>Cotrimoxazole</i>	Etude antérieure	X

III.1.2. Préparation des antibiotiques

III.1.2.1. Provenance et stockage des antibiotiques

Les antibiotiques ont été achetés auprès de différents fournisseurs (Sigma-Aldrich et Alsachim). Ils ont ensuite été reconstitués à une concentration de 1 g/L (solution mère) et conservés au congélateur à -20°C en différentes aliquotes selon les recommandations du fournisseur.

III.1.2.2. Choix de la concentration finale des antibiotiques

La concentration finale a été choisie selon les breakpoints (BP) de sensibilité renseignés par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) selon les recommandations 2023 (V.1.0 juin). Ces seuils sont restés inchangés dans les recommandations de juin 2024. Par exemple, pour la nitrofurantoïne le breakpoint sensible était ≤ 64 mg/L et le breakpoint catégorisant une souche résistante était > 64 mg/L (Figure 40). Il en est de même pour tous les antibiotiques sans « zone d'incertitude technique » (ZIT), ni zone de « sensibilité à forte posologie » (SFP). La concentration utilisée dans ce travail était alors de 64 mg/L de nitrofurantoïne.

Autres antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		
	S \leq	R $>$	ZIT
Nitrofurantoïne (cystites)	64	64	

Figure 40 : Extrait des recommandations du CA-SFM 2023 permettant l'interprétation de la CMI de la nitrofurantoïne

Certains couples antibiotique-bactérie possèdent une plage de CMI entre le BP sensible et le BP résistant catégorisant la souche SFP. Dans le panel d'antibiotiques testés, c'est le cas de la témocilline, lorsqu'elle est utilisée dans le traitement des ITU sans signes de gravité. En effet, une souche est catégorisée sensible à la témocilline si sa CMI pour cette molécule est ≤ 8 mg/L. En revanche, si sa CMI est > 16 mg/L elle est catégorisée résistante (Figure 41). Depuis le CA-SFM 2023, si sa CMI est entre ces deux concentrations, à 16 mg/L, la souche est catégorisée SFP vis-à-vis de la témocilline. Dans ce travail, la concentration choisie était égale au BP sensible, ce qui ne permet pas, à l'heure actuelle, de discriminer les souches SFP des souches résistantes. Des essais avec une concentration à 16 mg/L seront réalisés ultérieurement. Il en est de même pour les antibiotiques présentant des ZIT qui ne seront pas abordés ici car dans cette étude, aucun couple bactérie-antibiotique ne possède de ZIT.

Pénicillines	Concentrations critiques (mg/L)		
	S \leq	R $>$	ZIT
Témocilline (infections urinaires sans signes de gravité)	8	16	

Figure 41 : Extrait des recommandations du CA-SFM 2023 et introduction des zones de « sensibilité à forte posologie »

Dans ce travail, l'acide clavulanique a bénéficié d'un traitement particulier. En effet, dans une précédente étude menée au laboratoire, un nombre important d'erreurs très majeures (VME) a été observé lorsque cet inhibiteur de bêta-lactamases était utilisé à la concentration recommandée par le CA-SFM (2mg/L). En effet, certaines souches étaient catégorisées résistantes selon la méthode de référence mais classées sensibles avec la méthode d'antibiogramme rapide SdFFF. L'acide clavulanique a alors été testé avec une concentration abaissée déterminée dans une précédente étude à 0,35 mg/L.

En résumé, lors des essais menés dans ce travail avec la SdFFF, les antibiotiques ont été utilisés à leur BP sensible selon le CA-SFM 2023 sauf en ce qui concerne l'acide clavulanique (Tableau 5).

Tableau 5 : Volumes et concentrations des antibiotiques utilisés

<i>Antibiotique</i>	<i>Acronyme</i>	<i>Concentration initiale (mg/L)</i>	<i>Volume utilisé (µL)</i>	<i>Concentration finale dans le tube (mg/L)</i>
<i>Amoxicilline</i>	AMX	1000	48	8
<i>Amoxicilline – acide clavulanique</i>	AMC	1000	192	32
		175	12	0,35
<i>Témocilline</i>	TEMO	1000	48	8
<i>Mécatinam</i>	MEC	1000	48	8
<i>Céfixime</i>	CFX	500	12	1
<i>Nitrofurantoïne</i>	NIT	3000	128	64
<i>Fosfomycine</i>	FOS	1000	48	8
<i>Glucose 6 phosphate</i>		2000	75	25
<i>Ciprofloxacine</i>	CIP	100	15	0,25
<i>Triméthoprim- Sulfaméthoxazole</i>	SXT	1000	12	2
		5000	45,6	38

III.2. Choix des souches bactériennes

III.2.1. Les souches d'*E. coli* composants le panel urinaire

Dans un premier temps, le travail a été mené à partir d'une collection de 51 souches de *E. coli* isolées d'hémocultures de patients hospitalisés au CHU de Limoges qui avaient été utilisées dans un travail précédent (73).

Par la suite, devant le manque de souches résistantes notamment à la fosfomycine et à la nitrofurantoïne, une nouvelle collection a été constituée, appelée « panel complémentaire ». Ces souches, au nombre de 38, ont été isolées de patients hospitalisés au CHU de Limoges en tenant compte de l'antibiogramme pratiqué en routine. Au total, ces 89 souches sont dénommées DAM-ECxxx.

III.2.2. Les souches sélectionnées pour la mise au point du test de sensibilité vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique via SdFFF

Comme vu précédemment, l'amoxicilline-acide clavulanique a bénéficié d'un traitement particulier compte tenu des résultats issus des précédentes études. Ceux-ci ont mené à tester en priorité un nombre plus important de souches vis-à-vis de cette molécule afin de pouvoir, le cas échéant, optimiser la méthode. Cela explique la plus grande quantité de données concernant l'amoxicilline-acide clavulanique comparativement aux autres antibiotiques du panel.

Afin de vérifier l'absence de VME, les souches résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique en méthode de référence ont été étudiées en SdFFF afin de valider la nouvelle concentration d'acide clavulanique. Celle-ci doit être assez importante pour que la résistance soit détectée mais suffisamment faible pour que l'effet antibiotique de l'acide clavulanique ne soit pas exprimé. Puis, dans un second temps, les souches résistantes à l'amoxicilline mais sensibles à l'amoxicilline couplée à l'acide clavulanique ont été testées afin de confirmer que l'acide clavulanique conservait son activité inhibitrice de bêta-lactamases malgré la diminution de concentration effectuée. Enfin, différentes souches sensibles à l'amoxicilline et à l'association amoxicilline-acide clavulanique ont été testées. Au total, 69 souches ont été testées vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique.

III.3. Tests conventionnels de sensibilité aux antibiotiques

III.3.1. Antibiogramme par dilution en milieu liquide : méthode de référence

Sauf exceptions, la méthode de référence pour déterminer la sensibilité d'une souche à un antibiotique est la microdilution en milieu liquide (BMD, Sensititre™ Thermo Fisher). Ces résultats ont donc été utilisés pour la comparaison de méthodes lorsque ceux-ci étaient disponibles.

Dans le cadre d'un projet de recherche précédent, la sensibilité aux antibiotiques des 51 souches d'*E. coli* a été testée par la méthode BMD pour tous les antibiotiques du panel urinaire, à l'exception du céfixime, qui a donc dû être testé en E-test (cf paragraphe suivant). Les sensibilités au mécillinam et à la fosfomycine ont également été déterminées à l'aide d'E-tests pour certaines souches.

Afin de réaliser un antibiogramme par BMD, un inoculum de 0,5 McFarland a été préparé à partir de la souche préalablement repiquée sur gélose au sang. Ensuite, 10 µL de

cet inoculum ont été transférés dans 11 mL de bouillon Mueller Hinton, puis 50 µL de cette suspension ont été distribués dans les 96 puits de la plaque Sensititre™. Les différents puits de cette plaque contiennent des concentrations croissantes d'antibiotiques lyophilisés. La plaque a été incubée à 37°C pendant 16-24 heures (Figure 42).

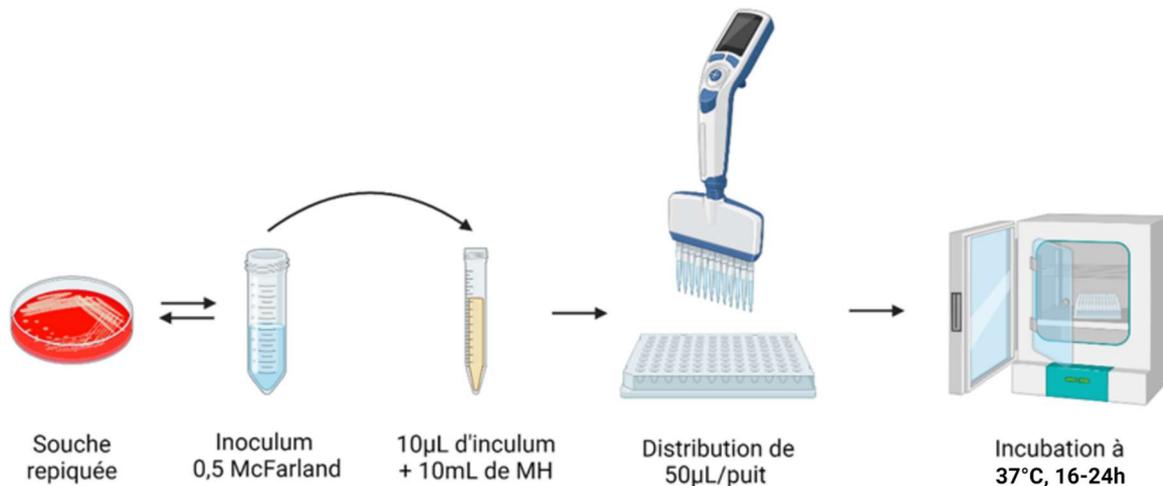


Figure 42 : Schématisation de la réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide (BMD)

Après incubation, la plaque était lue par l'automate Vizion® combiné au logiciel SWIN qui permet de détecter la présence ou l'absence d'un culot bactérien dans chaque puit. Cela permet alors de déterminer la CMI de la souche pour chaque antibiotique, elle correspond au premier puit avec une concentration suffisante d'antibiotique pour inhiber la pousse bactérienne. Cette concentration est alors considérée comme la CMI de la souche, c'est à dire la concentration minimale d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne à l'œil nu.

III.3.2. Antibiogramme par gradient de diffusion en milieu gélosé : E-test

Les souches du « panel complémentaire » n'ont pas été testées en microdilution en milieu liquide, nous avons utilisé une autre méthode pour déterminer la CMI : les bandelettes E-tests, pour les six antibiotiques du panel. De plus, le céfixime ne faisant pas partie des antibiotiques testés dans la plaque BMD, toutes les souches ont été testées par la méthode du gradient de diffusion en milieu gélosé (E-test).

Afin de réaliser ce test, il est nécessaire de préparer un inoculum bactérien à 0,5 McFarland avec une souche repiquée la veille. Cet inoculum est ensuite étalé sur une gélose Mueller Hinton et une bandelette E-test est déposée à sa surface. La gélose est ensuite incubée à 37°C pendant 16 à 24 heures puis la CMI est lue visuellement. Elle correspond au croisement de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette (Figure 43).

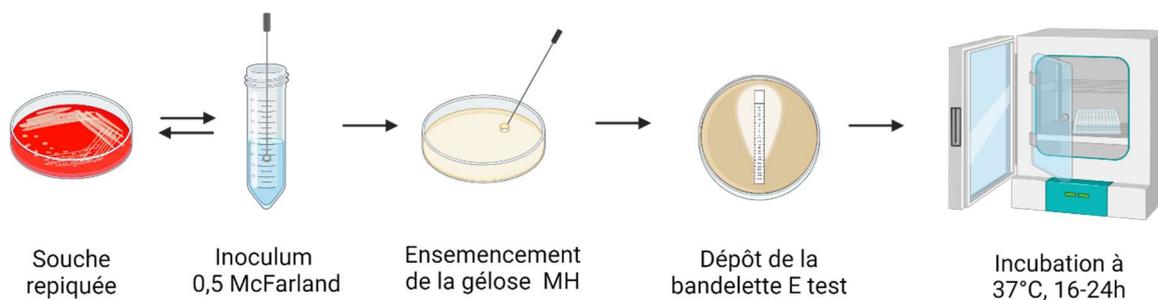


Figure 43 : Schéma du processus de réalisation d'un antibiogramme par la méthode du gradient de diffusion en milieu gélosé

III.4. Tests de sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques par SdFFF

III.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien

La préparation de l'inoculum bactérien débute par le repiquage des souches bactériennes stockées dans des cryobilles à -80°C la veille du passage en SdFFF sur des géloses au sang. Ces géloses sont incubées à 37°C pendant 16 à 24 heures (Figure 44).

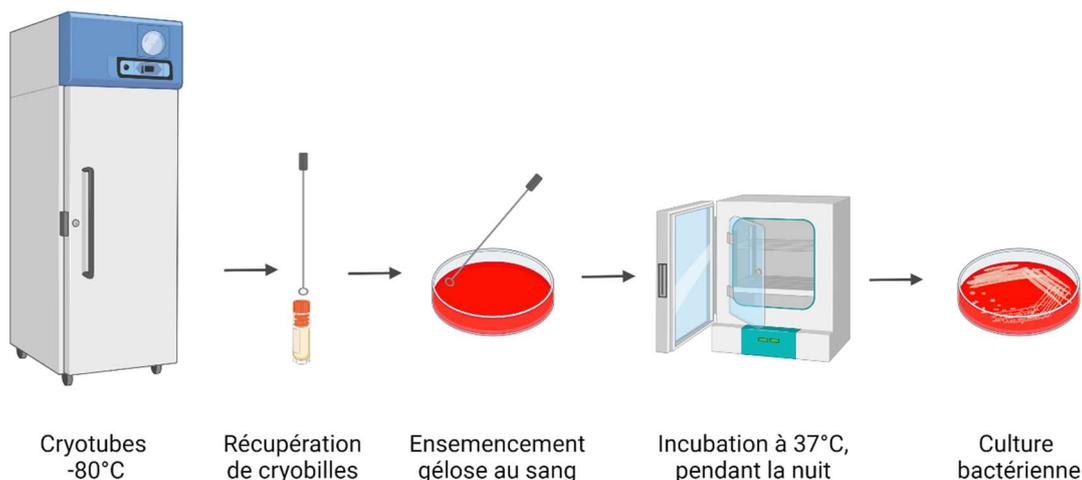


Figure 44 : Schématisation du repiquage des souches bactériennes

Une suspension bactérienne est préparée en prélevant des colonies et en les diluant dans 10mL d'eau physiologique jusqu'à atteindre une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de $0,200 \pm 0,01$ mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette densité optique correspond en théorie à 1 McFarland, inoculum nécessaire afin d'avoir une charge bactérienne suffisante pour pouvoir avoir, après 2 heures d'incubation, un signal détectable en SdFFF (Figure 45) (67).

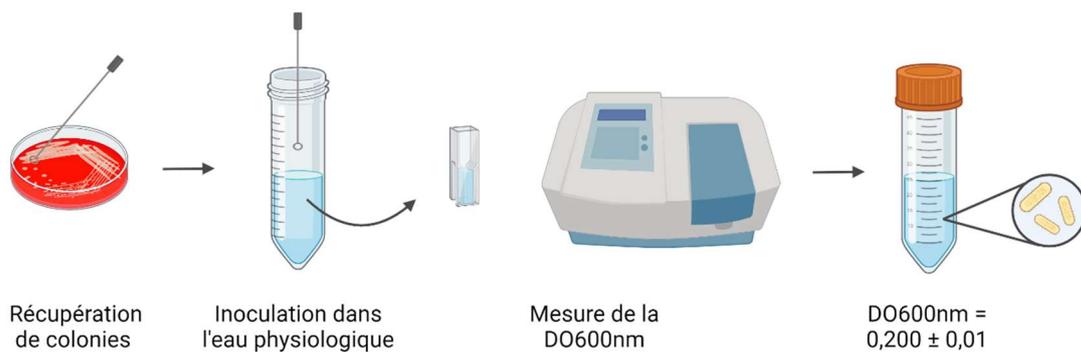


Figure 45 : Schématisation de la réalisation de la suspension bactérienne pour la SdFFF

III.4.2. Préparation des échantillons pour la SdFFF

Afin de réaliser l'antibiogramme par SdFFF, x tubes contenant 5mL de bouillon Mueller Hinton (MH) sont préparés. Le nombre de tubes préparés correspond au nombre d'antibiotiques testés + 1. Ce tube surnuméraire correspond à un tube sans antibiotique, donc au tube « contrôle », dont l'analyse du fractogramme servira de référence pour les comparaisons. Dans ce travail, 6 antibiotiques ont été testés donc 7 tubes ont été réalisés.

A ces 5mL de MH + antibiotiques, 1mL de l'inoculum bactérien précédemment préparé ($DO600nm = 0,200 \pm 0,01$) est ajouté et l'ensemble est mis à incuber 2 heures à 37°C et 300 rotations par minutes (rpm) (Figure 46).

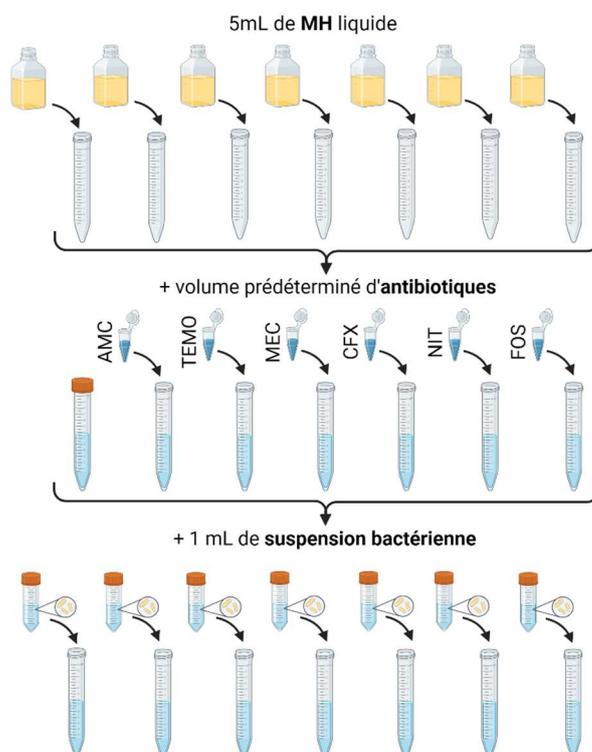


Figure 46 : Préparation des échantillons pour la SdFFF

AMC : amoxicilline-acide clavulanique, TEMO : témocilline, MEC : mécillinam ; CFX : céfixime ; NIT : nitrofurantoïne ; FOS : fosfomycine.

Après 2 heures d'incubation, la DO_{600nm} est mesurée par spectrophotométrie. Cette mesure permet de vérifier que la souche a suffisamment poussé dans le tube contrôle. Cette étape est nécessaire afin que les pics du fractogramme représentant la population bactérienne « contrôle » soient suffisamment visibles pour être interprétables et comparés à ceux des suspensions additionnées d'antibiotiques. En pratique, on considère qu'une $DO_{600nm} > 0,4$ est suffisante pour obtenir des résultats analysables par SdFFF dans la majorité des cas.

Chaque tube est ensuite centrifugé à 3400 rpm/600 g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé par retournement afin de récupérer le culot bactérien et celui-ci est remis en suspension dans 500 μ L de PBS (tampon de phosphate alcalin). Cette étape permet aux bactéries d'être maintenues dans un milieu isotonique en attendant l'injection dans la machine de SdFFF (Figure 47).

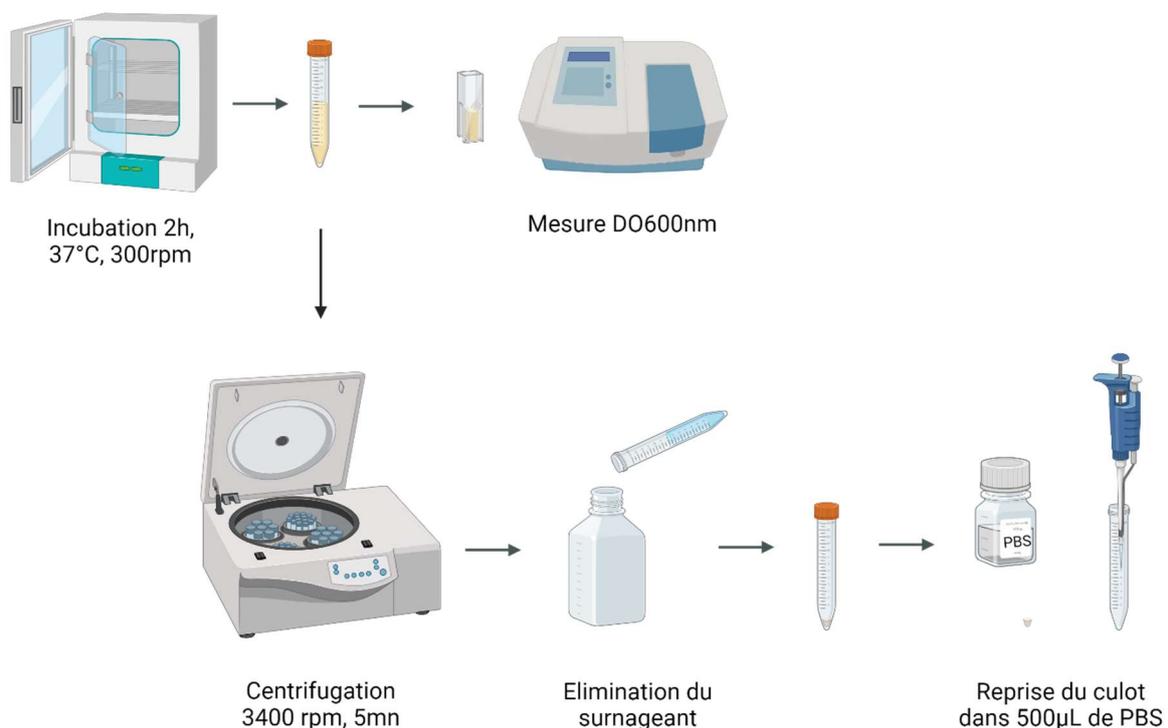


Figure 47 : Suite de la préparation des échantillons pour la SdFFF

Protocole modifié pour les souches pour lesquelles le signal de SdFFF n'est pas interprétable

L'une des souches de *E. coli*, particulièrement muqueuse, a nécessité un protocole modifié afin d'obtenir un fractogramme mieux résolu avec un volume mort distinct de la population bactérienne. La quantité de PBS a été adaptée pour permettre la remise en suspension du culot bactérien de cette souche muqueuse. La formule est la suivante :

$$\text{Volume de PBS (mL)} = \frac{\text{DO}_{600\text{nm}} \text{ échantillon contrôle à 2h} \times \text{volume initial de PBS (mL)}}{\text{DO}_{600\text{nm}} \text{ théorique cible à 2h}}$$

- « $\text{DO}_{600\text{nm}}$ échantillon contrôle à 2h » représentant la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ du tube avec la souche bactérienne non additionnée d'antibiotique, lue par le spectrophomètre après 2 heures d'incubation.
- « Volume initial de PBS », c'est-à-dire le volume permettant de re-suspendre le culot bactérien en protocole normal, en pratique 0,5 mL.
- « $\text{DO}_{600\text{nm}}$ théorique cible à 2h » soit la densité optique minimale après les 2 heures d'incubation permettant de séparer le pic du volume mort du pic de la souche bactérienne qui est de 0,1.

Les paramètres d'éluion ont également été modifiés et sont détaillés dans la partie III.4.3.2 ainsi que le « stop flow » détaillé en III.4.3.3.

III.4.3. Injection des bactéries dans la machine de SdFFF

III.4.3.1. Nettoyage de la machine

Avant et après chaque expérience, il est nécessaire d'effectuer 3 cycles de nettoyage afin de décrocher les éventuels débris présents dans les différents compartiments de la machine. Ils comprennent le passage de phases mobiles successives :

- Eau stérile,
- FlowClean : solution déprotéinisante éliminant les protéines et autres dépôts,
- Javel : destruction de toute bactérie encore présente dans le système.

III.4.3.2. Paramètres d'éluion

Les conditions d'éluion utilisées ici ont été déterminées dans une précédente étude (67). Il s'agit d'une force gravitationnelle de 20G et d'un débit de phase mobile de 1,6 mL/min (Figure 48). La phase mobile utilisée est du PBS nécessaire à la conservation de la structure bactérienne.

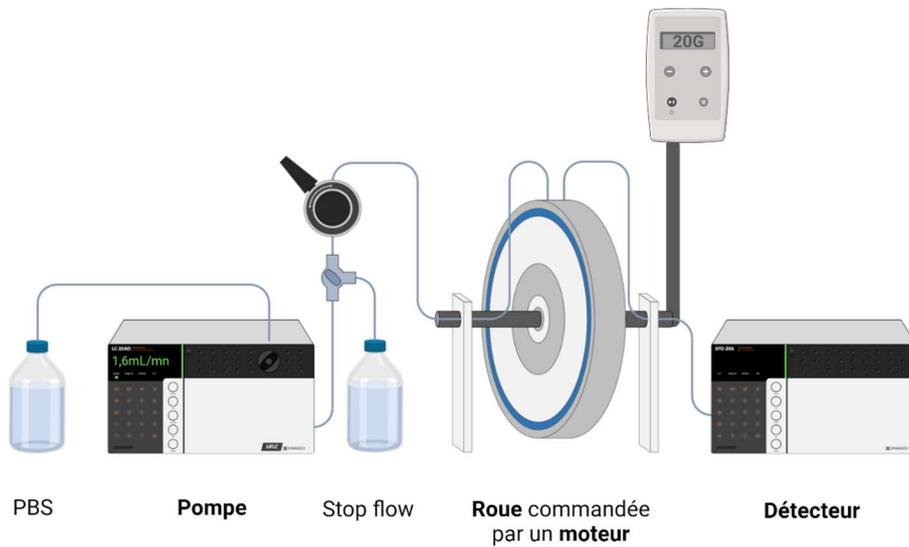


Figure 48 : Schématisation de la machine de SdFFF paramètres classiques

Protocole modifié pour les souches pour lesquelles le signal de SdFFF n'est pas interprétable

Les paramètres ont été déterminés dans une précédente étude (67) qui a permis de conclure à une plus grande résolution des pics grâce à une augmentation de la force gravitationnelle (passant de 20 à 25G) et à une diminution de la vitesse d'écoulement de la phase mobile (de 1,6mL/min à 0,6 mL/min).

III.4.3.3. Injection des échantillons

Préalablement à toute manipulation, l'étalonnage de la machine de SdFFF doit être conforme. Pour cela, 100 μ L de benzoate de sodium dilué à 0,1% sont injectés et la conformité du pic correspondant au volume mort sur le fractogramme est vérifiée (Figure 49).

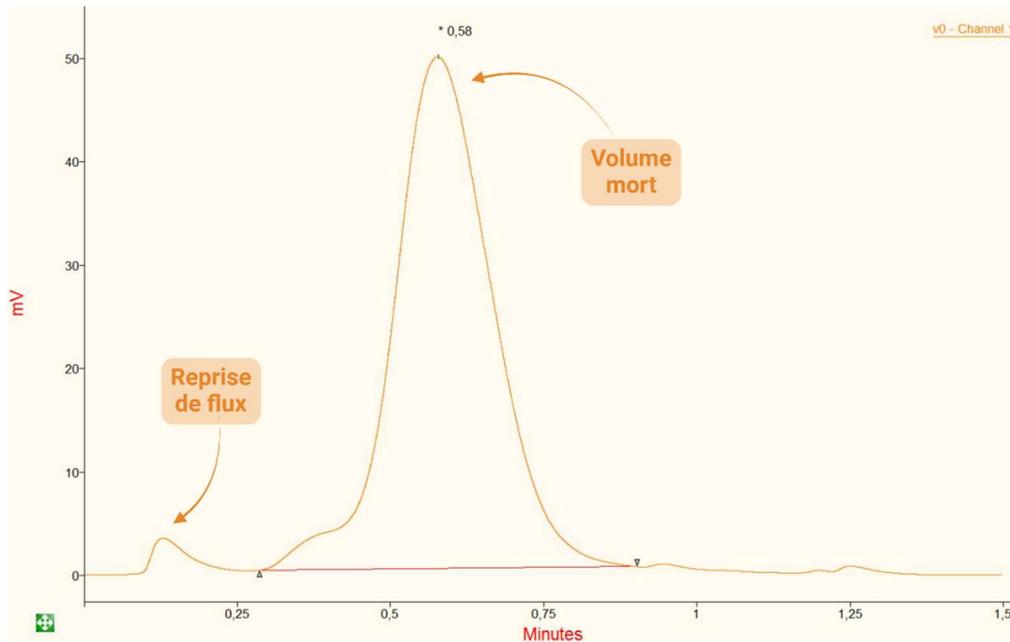


Figure 49 : Fractogramme de l'injection de benzoate de sodium (t_0)

Une fois le volume mort validé, les différents échantillons (100 μL de suspension bactérienne par échantillon) sont injectés dans la boucle d'injection à l'aide d'une seringue. Le liquide est alors en attente dans la boucle, il ne sera injecté et mélangé à la phase mobile que lorsque la gâchette sera tournée vers « inject » (Figure 50). Cette injection « différée » permet de lancer simultanément le chronomètre. La précision du lancement du chronomètre est cruciale car 16 secondes exactement sont nécessaires aux bactéries pour parcourir le chemin jusqu'au canal séparateur, il faut alors enclencher le « stop flow » afin d'avoir des mesures reproductibles.

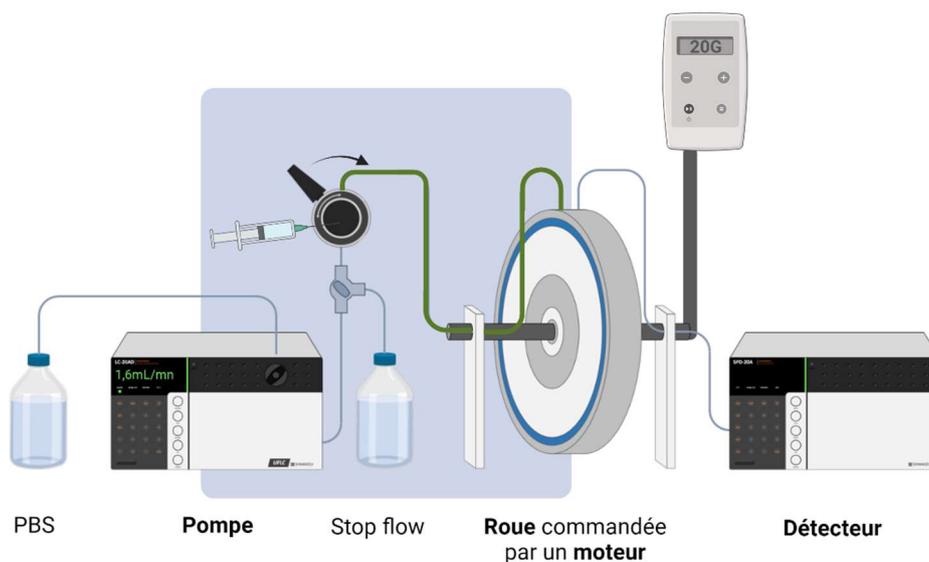


Figure 50 : SdFFF en mode "injection" et tracé du chemin de l'analyte jusqu'au canal de séparation (vert)

Le « stop flow » est une valve que l'on tourne afin que la pompe n'envoie plus la phase mobile dans le circuit mais que celle-ci soit redirigée vers la poubelle (Figure 51). De cette façon, les bactéries ne sont plus soumises au flux mais uniquement au champ multi gravitationnel, leur permettant de « se relaxer » et ainsi de se focaliser sur la paroi d'accumulation. Cette étape de relaxation est cruciale afin qu'elles puissent par la suite se positionner correctement dans la ligne de flux appropriée. Le temps de « stop flow » nécessaire est de 2 minutes.

Protocole modifié pour les souches pour lesquelles le signal de SdFFF n'est pas interprétable

La durée du « stop flow » reste inchangée mais est entamée plus tard, après 26 secondes, du fait du ralentissement de la phase mobile, et donc, du temps nécessaire aux bactéries, pour arriver au niveau de la roue.

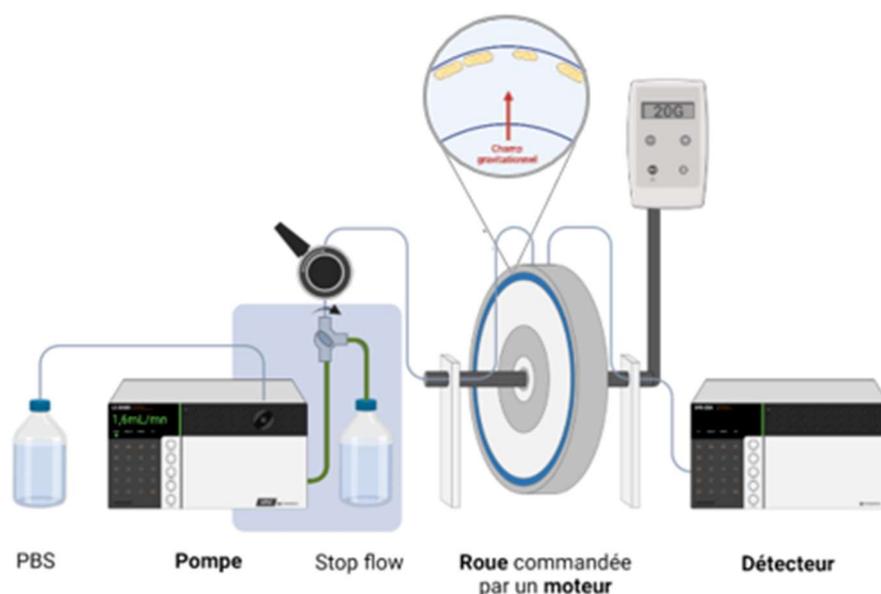


Figure 51 : SdFFF en mode "stop flow" et tracé du chemin de l'analyte vers la poubelle (vert)

Après les 2 minutes de « stop flow », la phase mobile est redirigée vers la roue afin d'ajouter une deuxième contrainte aux bactéries : la force hydrodynamique générée par la réintroduction du flux de phase mobile. L'addition des deux forces va permettre aux bactéries, selon leurs caractéristiques, de circuler dans une ligne de flux qui leur est propre. Selon la ligne de flux dans laquelle elles circuleront, elles sortiront du canal plus ou moins vite pour arriver devant le détecteur avec un temps d'élution précis (Figure 52).

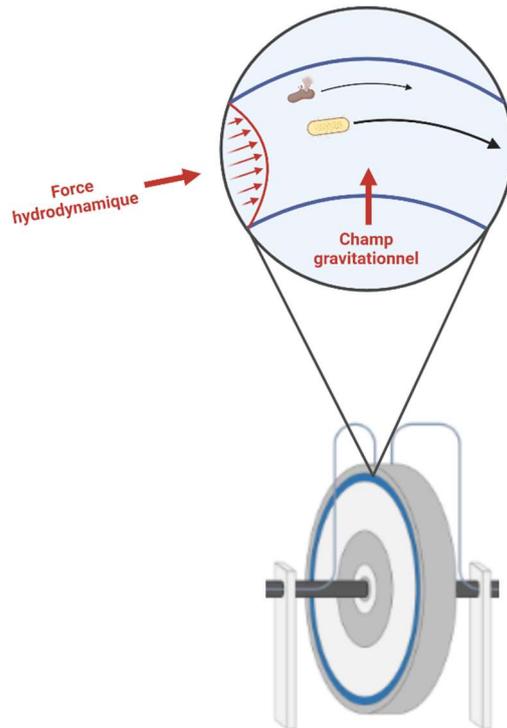


Figure 52 : Schématisation de la séparation bactérienne au sein du canal

III.4.3.4. Détection des bactéries et analyse du signal

Le détecteur est muni d'un spectrophotomètre de longueur d'onde $\lambda = 254 \text{ nm}$, connecté à un ordinateur équipé du logiciel de chromatographie AZUR®. Ce logiciel permet de traduire le signal en un fractogramme (Figure 53). Ce fractogramme indique en ordonnée l'absorbance (millivolts) et en abscisse le temps (minutes). Le logiciel AZUR® permet également d'analyser le signal par intégration des pics représentant les différentes populations éluées. Cette intégration permet de récupérer deux informations sur l'analyse de population : le temps de rétention correspondant au sommet du pic ainsi que l'aire sous la courbe.

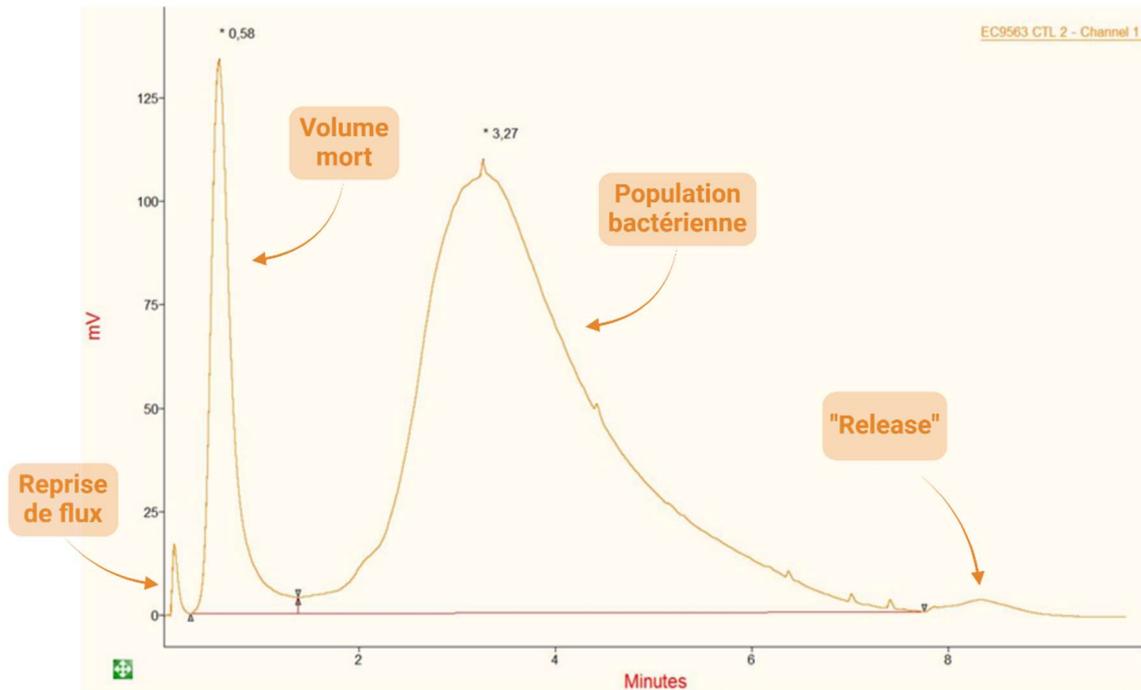


Figure 53 : Fractogramme "contrôle" d'une souche de *E. coli*

Les fractogrammes se divisent en 4 parties (Figure 53) :

- 1 : la reprise de flux après l'arrêt du « stop flow »,
- 2 : le volume mort, c'est-à-dire les molécules non retenues dans le canal. En pratique cela représente le temps mis par ces molécules pour parcourir le canal et arriver jusqu'au détecteur. Il doit être similaire entre chaque injection et est conditionné par la vitesse d'élution de la phase mobile (elle-même contrôlée par la pompe),
- 3 : le troisième pic représente la population bactérienne,
- 4 : le dernier pic du fractogramme est déclenché par l'arrêt du moteur et donc l'arrêt de rotation de la roue. Les espèces restantes dans le canal ne sont alors plus soumises au champ multi gravitationnel et sont entraînées vers le détecteur par l'unique action de la phase mobile.

Différentes données issues des fractogrammes (aire sous la courbe et temps de rétention des différents pics) seront analysées et comparées via plusieurs équations. Celles-ci nous permettent de quantifier les différences entre les fractogrammes des populations bactériennes traitées et des populations bactériennes non traitées, c'est-à-dire contrôles. Ces différences de fractogrammes s'expliquent par des différences de caractéristiques bactériennes causées par les antibiotiques présents dans l'échantillon.

Le facteur de rétention (R_{obs}) de la population bactérienne est le ratio de t_0 , le temps de rétention du volume mort, avec t_r , le temps de rétention des espèces bactériennes. Il permet de déterminer les deux paramètres principaux qui suivent.

$$R_{obs} = \frac{t_0}{t_r}$$

A partir des facteurs de rétention, est calculé le pourcentage de variation du facteur de rétention ($P\Delta R$) avec $R_{obs\text{ contrôle}}$, le facteur de rétention de la population bactérienne contrôle (sans antibiotique), et le $R_{obs\text{ échantillon}}$, le facteur de rétention de la population bactérienne additionnée d'antibiotiques. Ce facteur représente le décalage du pic de la population bactérienne.

$$P\Delta R = \frac{|R_{obs\text{ contrôle}} - R_{obs\text{ échantillon}}|}{R_{obs\text{ contrôle}}} \times 100$$

La différence d'aire sous la courbe de la population traitée appelée pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ($P\Delta AUC$) est également évaluée avec $AUC_{\text{contrôle}}$, l'aire sous la courbe de la population bactérienne sans antibiotique, et $AUC_{\text{échantillon}}$, l'aire sous la courbe de la population bactérienne en présence d'antibiotique.

$$P\Delta AUC = \frac{AUC_{\text{contrôle}} - AUC_{\text{échantillon}}}{AUC_{\text{contrôle}}} \times 100$$

C'est à l'aide de ces deux paramètres : $P\Delta R$ et $P\Delta AUC$, que l'on détermine le profil de sensibilité des souches bactériennes testées grâce à plusieurs algorithmes déterminés par une courbe ROC faite à partir de l'ensemble des données de cette étude (Figures 54 et 55).

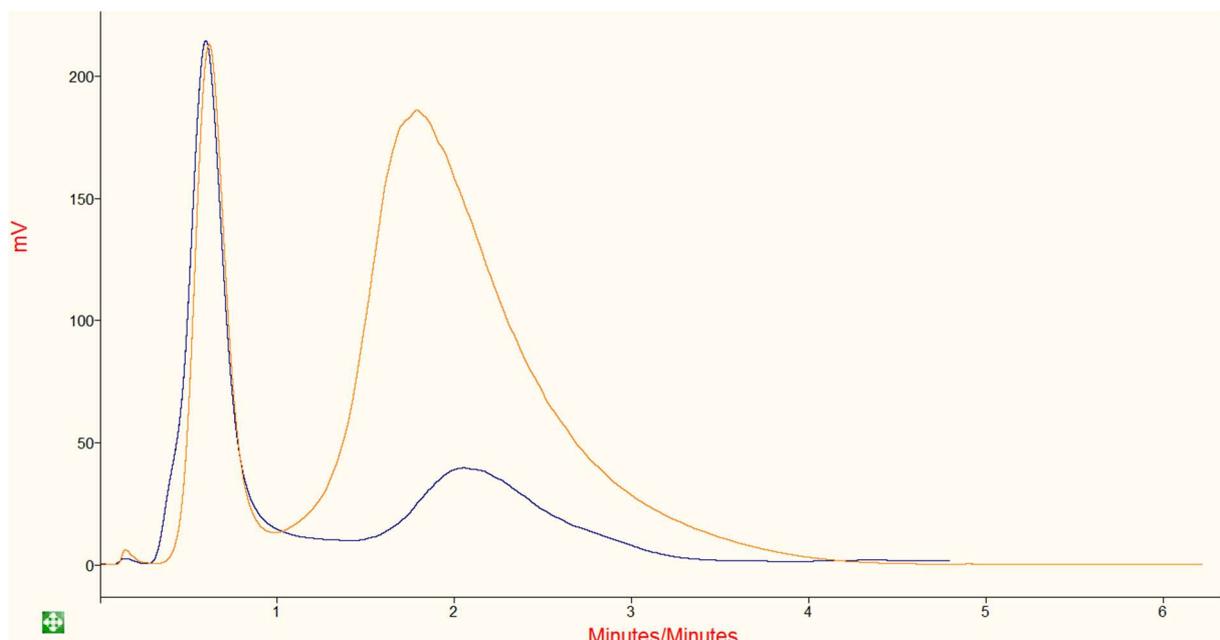


Figure 54 : Fractogramme de la souche DAM-EC003 sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique avec la courbe de la souche contrôle (orange) et la courbe de la souche additionnée d'antibiotique (bleu) qui présente un $P\Delta R$ à 15,50% et un $P\Delta AUC$ à 81,48%

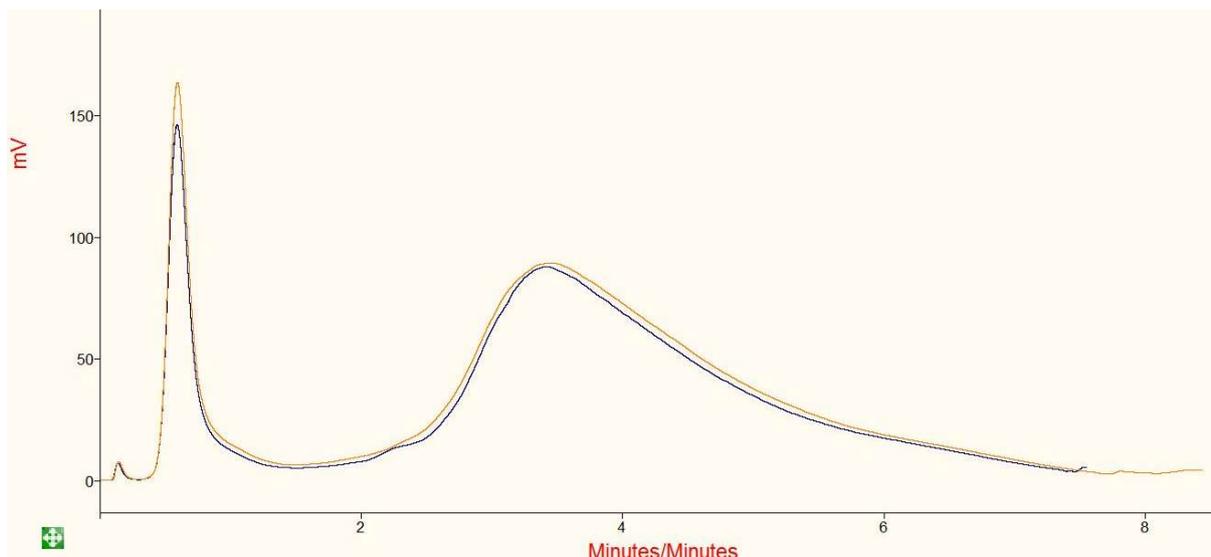


Figure 55 : Fractogramme de la souche DAM-EC055 résistante à l'amoxicilline-acide clavulanique avec la courbe de la souche contrôle (orange) et la courbe de la souche additionnée d'antibiotique (bleu) qui présente un P Δ R à 0% et un P Δ AUC à 5,71%

III.4.4. Analyses statistiques (courbes ROC, seuils)

A partir des valeurs de P Δ R et de P Δ AUC et du résultat sensible/résistant obtenu par méthode conventionnelle (BMD ou E-test), des courbes ROC (fonction d'efficacité du récepteur) propres à chaque antibiotique ont été générées grâce au logiciel easyROC version 1.3.1. Ces courbes ROC permettent d'obtenir des seuils de P Δ R et de P Δ AUC nécessaires à la catégorisation des souches en « sensibles » ou « résistantes » à l'antibiotique testé. La courbe ROC ayant l'index de Youden (Se+Sp-1) le plus élevé a été retenue.

La significativité des seuils obtenus par les courbes ROC est dépendante de l'AUC de cette courbe. Celle-ci permet de classer les tests en excellent ($0,9 \leq AUC$), bon ($0,8 \leq AUC < 0,9$), moyen ($0,7 \leq AUC < 0,8$), médiocre ($0,6 \leq AUC < 0,7$) et en échec ($0,5 \leq AUC < 0,6$). Ces classifications ont permis de déterminer les différents algorithmes afin d'obtenir les résultats de catégorisation clinique les plus fiables possibles (Figure 56).

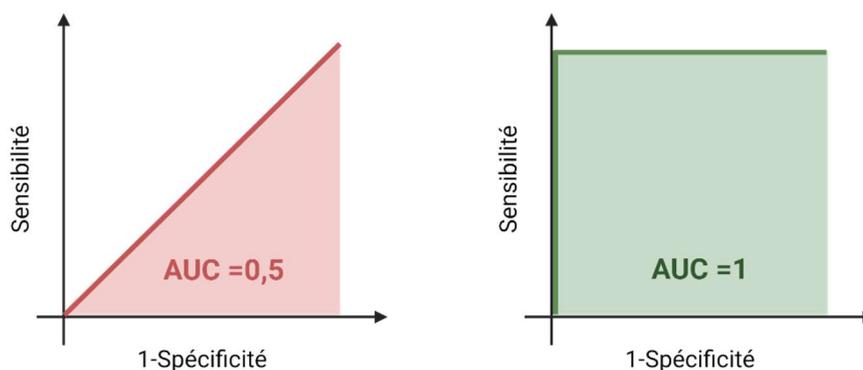


Figure 56 : Représentation d'une courbe ROC associée à un test non prédictif (gauche) et une courbe ROC associée à un test idéal (droite)

III.4.5. Evaluation des performances de la SdFFF selon la norme ISO 20776-2

Les résultats d'antibiogramme obtenus via la méthode de SdFFF ont été comparés à ceux des méthodes conventionnelles (BMD ou E-test) permettant de classer chaque résultat de couple « souche-antibiotique » parmi 4 groupes :

- « S » lorsque le résultat de la méthode SdFFF et de la méthode conventionnelle permettent de classer la souche sensible.
- « R » lorsque le résultat de la méthode SdFFF et de la méthode conventionnelle permettent de classer la souche résistante.
- « VME » (very major error : erreur très majeure) qui correspond à une souche rendue sensible par la méthode SdFFF et résistante par la méthode conventionnelle. Ce sont les erreurs les plus problématiques car elles sont susceptibles d'induire un impact clinique défavorable chez le patient par administration d'un antibiotique non actif.
- « ME » (major error : erreur majeure) qui correspond à une souche rendue résistante par la méthode SdFFF et sensible par la méthode conventionnelle. Ce type d'erreur prive le patient d'un antibiotique potentiellement efficace mais n'induit pas l'introduction d'un traitement inactif sur l'infection, ce qui explique sa moindre gravité en comparaison aux VME.

A partir de ces différents groupes, la méthode de SdFFF a été évaluée en comparaison à la méthode conventionnelle à l'aide de 3 paramètres : l'accord de catégorie (CA) issue du CLSI, ainsi que la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) issues de la norme ISO 20776-2.

$$CA = \frac{S + R}{S + R + VME + ME}$$

$$Se = \frac{R}{R + VME}$$

$$Sp = \frac{S}{S + ME}$$

Afin de permettre leur validation, le CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) indique que l'accord de catégorie de tout dispositif de mesure de sensibilité aux antibactériens doit être $\geq 90\%$. De plus, selon la norme ISO 20776-2, sensibilité et spécificité doivent avoir une valeur $\geq 95\%$ lors de la comparaison à la méthode de référence.

III.5. Mise au point d'un protocole d'antibiogramme rapide par SdFFF directement à partir d'urines

III.5.1. Mise en place d'une collection d'urines

Plusieurs urines de patients du CHU de Limoges ont été recueillies avec pour seul critère de recrutement un ECBU monomicrobien à *E. coli*. La non-opposition des différents patients a été vérifiée par l'unité de recherche clinique du laboratoire. Ces urines ont été conservées dans des tubes boratés en routine et séparées en 7 à 8 aliquotes de 1mL chacune et stockées au congélateur à -80°C afin de conserver les bactéries présentes dans l'échantillon. Nous avons utilisé dans cette étude uniquement les bactériuries > 10⁶ UFC/mL afin d'être dans des conditions optimales.

D'autres urines de patients, toujours monomicrobiennes ont ensuite été recueillies (pour des raisons qui seront détaillées dans les résultats) avec deux critères supplémentaires : une bactériurie > 10⁶ UFC/mL et cette fois-ci en pot stérile. La non-opposition des patients a été vérifiée.

III.5.2. Injection des échantillons urinaires

III.5.2.1. Tests préliminaires

Afin de déterminer la quantité bactérienne nécessaire à l'obtention d'un fractogramme interprétable après 2 heures d'incubation, des tests préliminaires ont été effectués. Une suspension à 1 McFarland de *E. coli* a été préparée dans de l'eau stérile, correspondant théoriquement à une concentration de 10⁸ UFC/mL. Cette suspension a été diluée en cascade au dixième afin d'obtenir une gamme de suspensions allant de 1 McFarland à 10⁻⁵ McFarland, soit de 10⁸ à 10³ UFC/mL. Dans le but ultérieur de déterminer le temps d'incubation nécessaire pour chaque numération bactérienne, la bactériurie des différentes suspensions a été quantifiée avec l'automate de cytométrie en flux UF4000 (Sysmex). En effet, cet automate, couramment utilisé en routine, permet la numération des globules blancs et rouges, la détection éventuelle de levures et une approximation de la quantité de bactéries dans l'urine. Chaque urine arrivant au laboratoire est analysée par cet automate.

Afin de reproduire les conditions classiques du protocole d'injection en SdFFF vues ci-dessus, 1 mL de la suspension bactérienne a été ajouté à 5mL de bouillon MH et incubé à 37°C. Chaque gamme a été effectuée en triple afin que chaque concentration puisse être mise à incuber respectivement 2 heures, 4 heures et 6 heures (Figure 57).

Après chaque temps d'incubation, la DO_{600nm} a été mesurée afin de vérifier si la pousse était suffisante pour obtenir un fractogramme exploitable, en pratique une DO_{600nm} cible supérieure à 0,5 a été choisie afin de bénéficier de conditions optimales (DO_{600nm} target > 0,5).

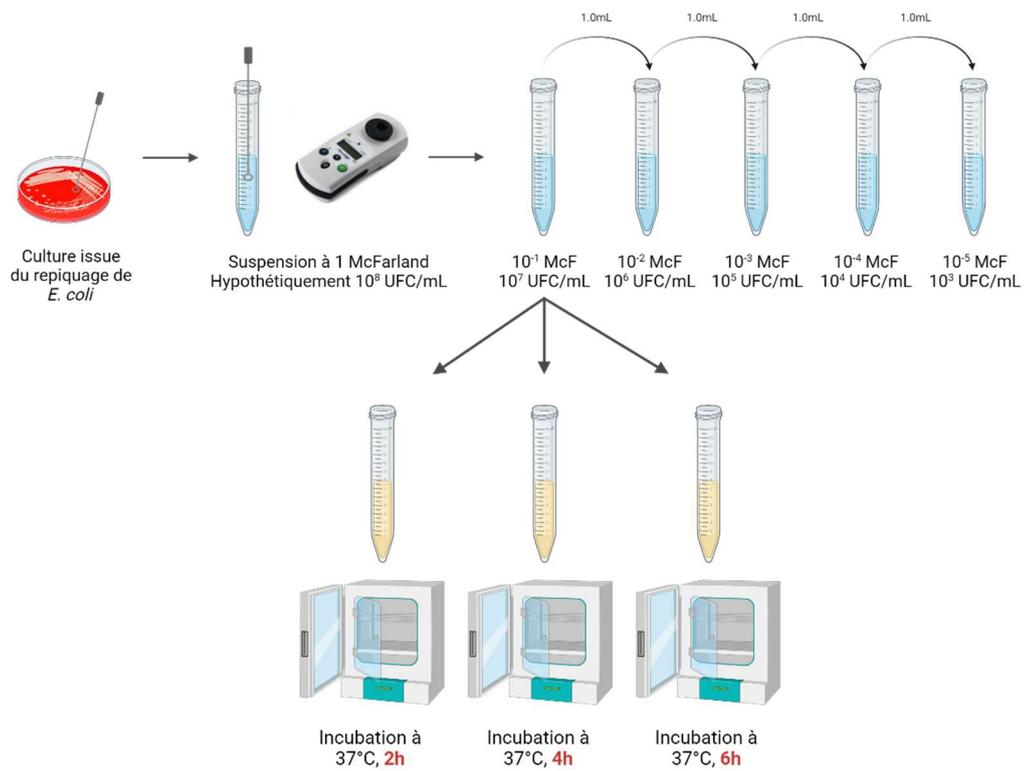


Figure 57 : Détermination de la densité optique en 2h, 4h et 6h selon la concentration bactérienne

III.5.2.2. Test des conditions pré-analytiques

Dans l'optique de tester les conditions pré analytiques, des urines fraîchement émises contenant de l'*E. coli* avec une numération $> 10^6$ UFC/mL ont été testées. Ces urines étaient issues soit de tubes boratés, soit de tubes non boratés afin de mettre en évidence l'impact du borate sur la croissance bactérienne. Les 5 mL de MH ont été additionnés de 1 mL d'urine puis mis à incuber 2 heures et la DO_{600nm} a ensuite été évaluée (Figure 58). Certaines suspensions ont été passées en SdFFF selon le même protocole que celui utilisé pour les souches.

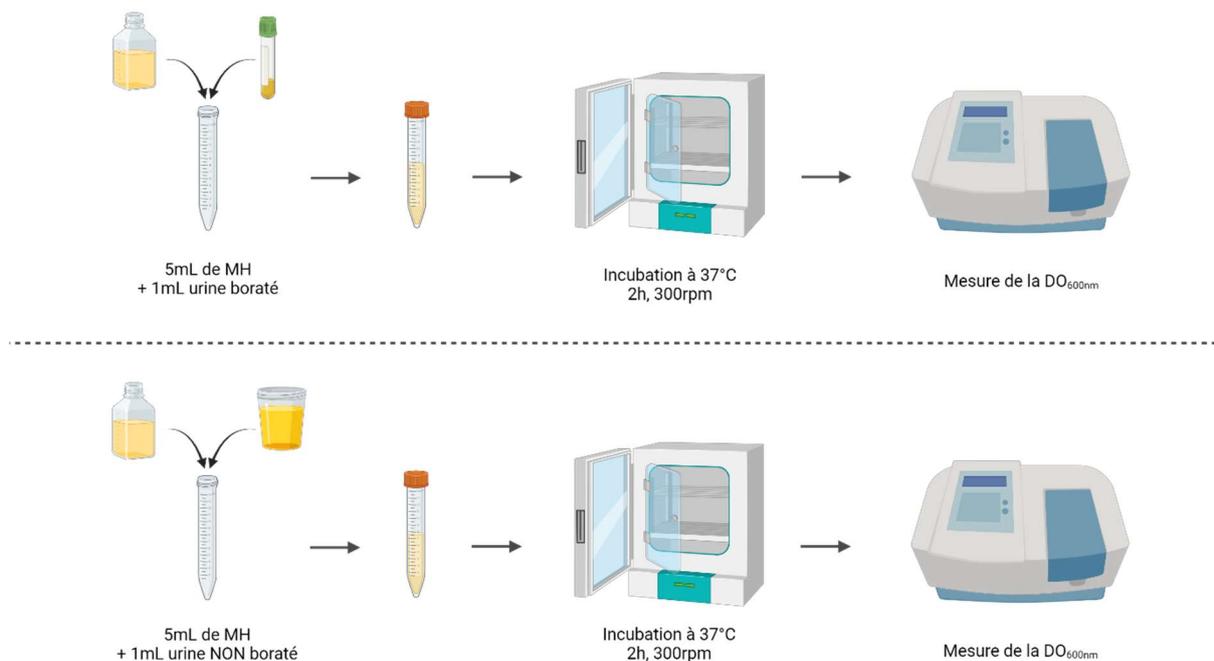


Figure 58 : Test des conditions pré-analytiques

III.5.2.3. Injection d'urines non additionnées d'antibiotiques

Dans un premier temps, des urines non additionnées d'antibiotiques ont été testées afin de vérifier que les fractogrammes étaient exploitables.

Ces urines étaient issues de la collection qui a été constituée par la recherche clinique. Elles ont été sélectionnées sur le critère de la concentration bactérienne déterminée en routine qui devait être $>10^6$ UFC/mL. Il est à noter que les urines de cette collection sont issues de tubes boratés et ont été congelées à -80°C sous forme de plusieurs aliquotes.

Le premier test a été effectué sur cinq urines, dont 1mL a été ajouté aux 5mL de MH. A 2 heures, 4 heures, 5 heures 20 et 6 heures, la densité optique a été vérifiée visuellement et si jugée suffisante, les suspensions ont été sorties d'incubation. La $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a ensuite été vérifiée par le spectrophotomètre et si supérieure à 0,5, passées en SdFFF (Figure 59).

La suspension a ensuite été centrifugée, le culot a été repris dans 500 μL de PBS et 100 μL ont été injectés dans la machine de SdFFF, comme pour les souches bactériennes.

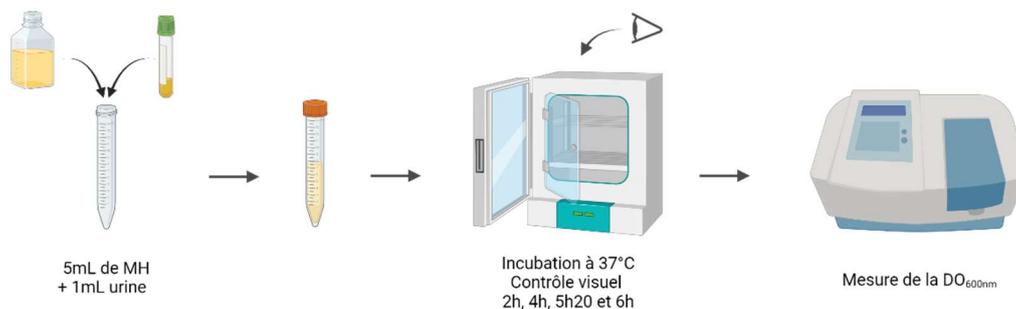


Figure 59 : Protocole de test des urines non traitées

III.5.2.4. Injection des premières urines additionnées d'antibiotiques

Dans un premier temps, deux urines avec des concentrations supérieures à 10^6 UFC/mL ont été testées vis-à-vis de l'amoxicilline : l'une sensible à l'amoxicilline et l'autre résistante. L'amoxicilline a été testé à la concentration de 8mg/L. Le protocole était le même que celui détaillé plus haut : l'amoxicilline a été ajouté aux 5 mL de MH puis 1 mL d'urine a été additionné, les 4 suspensions (2 urines contrôles et 2 urines additionnées d'amoxicilline) ont été mises à incuber pendant 2 heures, la DO_{600nm} a été mesurée, puis les tubes ont été centrifugés et le culot repris dans du PBS. Les différentes suspensions ont ensuite été injectées dans la machine de SdFFF et les fractogrammes analysés grâce aux algorithmes issus d'une étude antérieure.

Dans un second temps, un nombre plus important d'antibiotiques a été testé sur une autre urine. Les 4 antibiotiques ont été testés selon le même protocole que précédemment.

IV. Résultats

IV.1. Profil de résistance des souches étudiées

Dans un premier temps, toutes les souches étudiées dans ce travail ont été testées par la méthode de référence BMD ou par la méthode du gradient de diffusion lorsque le BMD Sensititre™ n'était pas disponible, afin d'obtenir un profil de résistance envers les différents antibiotiques testés dans le « panel urinaire ». La répartition des CMI des souches pour chaque antibiotique permet d'apprécier la fiabilité des seuils déterminés dans cette étude et donc, par extension, de l'antibiogramme obtenu par la méthode de SdFFF.

Dans le but d'étudier la représentativité des souches testées, le pourcentage de souches de *E. coli* résistantes étudiées dans ce travail a été comparé à la prévalence des résistances observées à l'hôpital (mission SPARES) et en ville (PRIMO). Comme précisé en partie I.3.3.2., les pourcentages issus de la mission SPARES sont obtenus à partir de souches de *E. coli* tous prélèvements confondus, le BP de l'amoxicilline-acide clavulanique est alors de 8 mg/L. En revanche, dans la mission PRIMO, les prélèvements urinaires ont été classés à part, permettant de recueillir les données avec un BP à 32 mg/L, ce qui explique la différence de résistances chez ces deux populations. En ce qui concerne le céfixime, la prévalence de souches résistantes n'a pas été étudiée durant la mission SPARES, tout comme pour la témocilline qui n'a été analysée dans aucune des deux études (Figure 60).

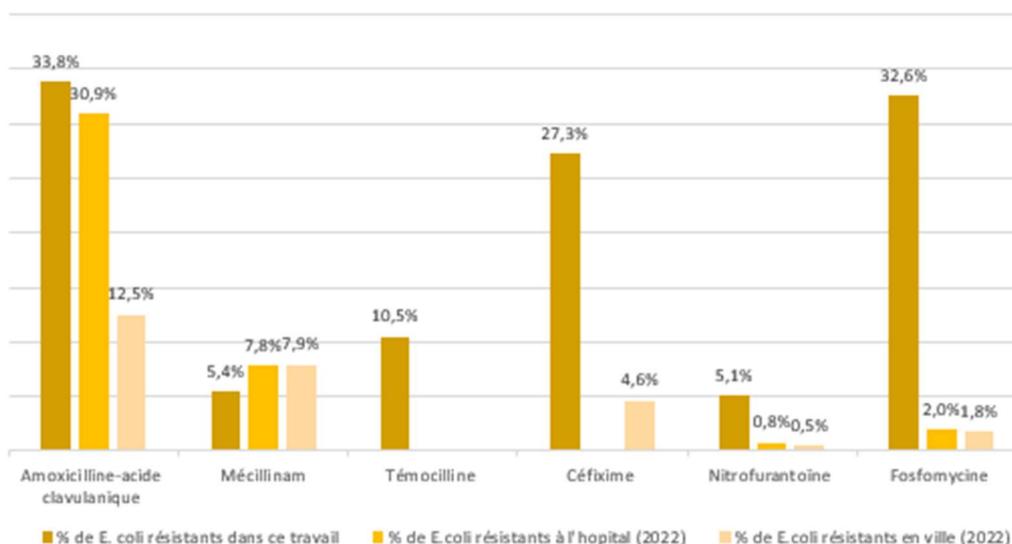


Figure 60 : Pourcentage de souches de *E. coli* résistantes dans notre étude comparé à la prévalence des résistances observée via les missions SPARES et PRIMO

IV.2. Profils d'élutions des souches non traitées

Les 89 souches étudiées dans ce travail présentaient chacune un profil d'élution qui leur est propre avec des temps d'élution différents. Les temps d'élution des souches non traitées ont été analysés afin de déterminer une durée moyenne d'analyse dans le but d'estimer le temps nécessaire à la réalisation d'un antibiogramme par la méthode SdFFF.

Le temps d'élution médian pour l'ensemble des souches testées était de 3,41 minutes. La majorité des souches a été éluee entre 2,42 minutes et 4,09 minutes avec 2 extrêmes : 1,08 minutes pour le minimum et 6,59 minutes pour le maximum (Figure 61). Parmi les 89 souches étudiées, la souche DAM-EC043 a nécessité un protocole modifié, afin de permettre la séparation de la population bactérienne du volume mort. Malgré cela, le temps de rétention de cette souche était de 2,08 minutes et n'entraînait donc pas d'allongement du temps nécessaire à la réalisation de l'antibiogramme.

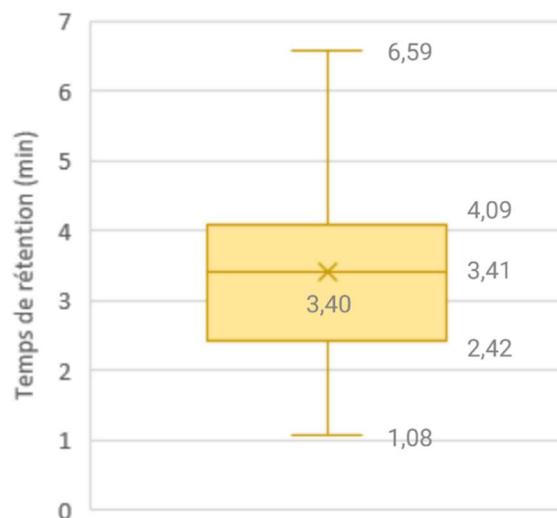


Figure 61 : Dispersion des temps de rétention en minutes des échantillons non traités

IV.3. Antibiogrammes réalisés à partir de souches bactériennes par la méthode SdFFF comparés à la méthode de référence

IV.3.1. Construction des courbes ROC

Afin de catégoriser les souches « sensibles » ou « résistantes » à l'antibiotique testé, des courbes ROC ont été construites à partir des valeurs de P Δ R et de P Δ AUC obtenues grâce aux fractogrammes issus de chaque couple souche-antibiotique (Figure 62).

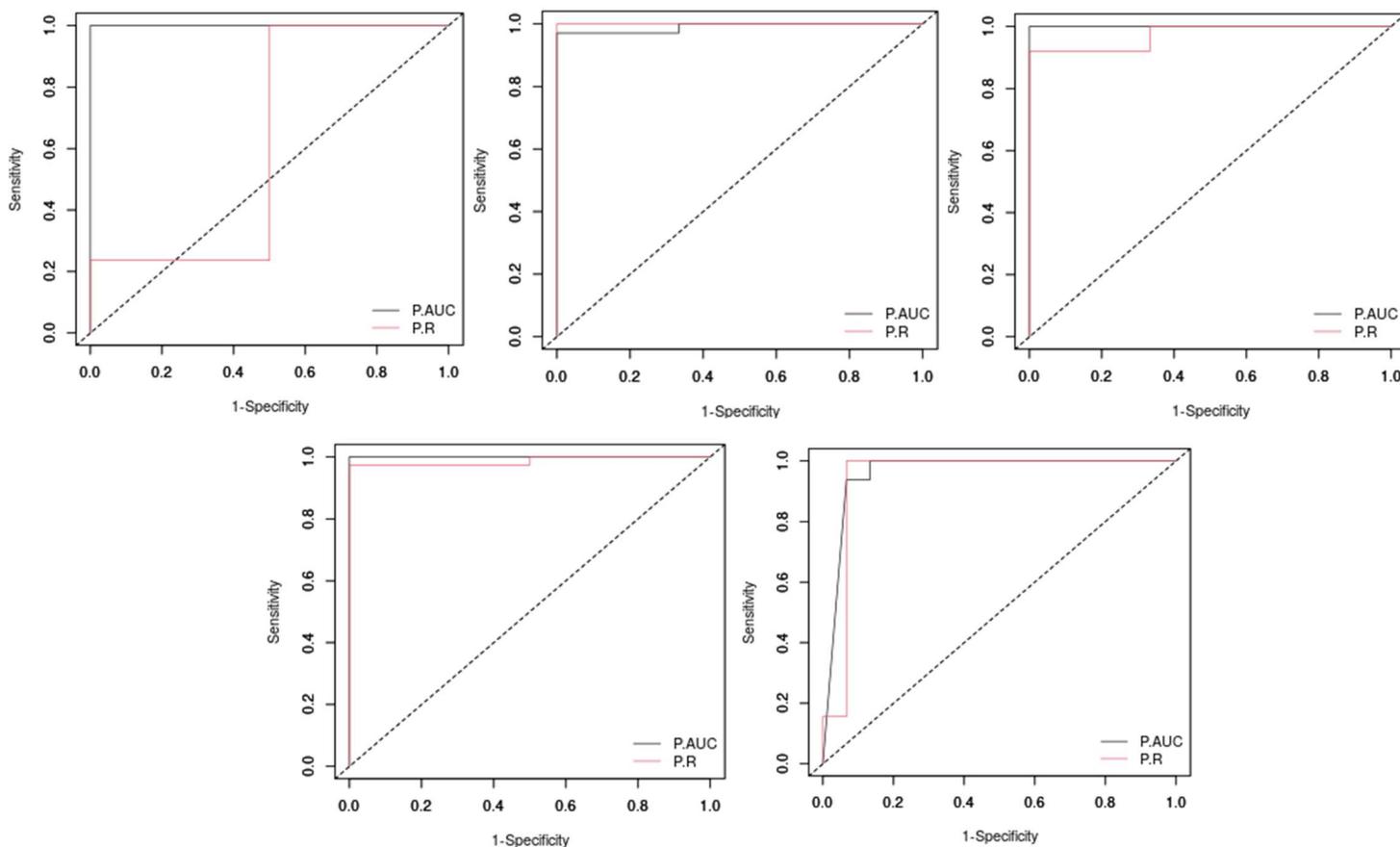


Figure 62 : courbe ROC du mécollinam, de la témocilline, du céfixime, de la nitrofurantoïne et de la fosfomycine (dans l'ordre)

Il est à noter que seules les souches catégorisées résistantes ou sensibles par la méthode de référence vis-à-vis de l'antibiotique testé ont été prises en compte. Une souche a été exclue des statistiques car sa CMI vis-à-vis de la témocilline était de 16 mg/L, ce qui la catégorise SFP ne permettant pas son analyse en SdFFF à l'heure actuelle.

De plus, le mécollinam a posé des soucis de cohérence entre la méthode SdFFF et le BMD. En effet, des courbes plates, caractéristiques des souches totalement sensibles, ont été retrouvées pour des *E. coli* présentant des CMI supérieures à 16 mg/L. Consécutivement à la détection de cette anomalie, toutes les CMI des souches résistantes au mécollinam ont été vérifiées par la méthode du gradient de diffusion en milieu gélosé (E-test), afin de valider les résultats trouvés en BMD. Sur les 15 souches classées résistantes par le BMD Sensititre™, seules 5 souches ont présenté une résistance au mécollinam lors des E-tests. Trois de ces souches ont été exclues car des discordances de catégorisation clinique ont été mises en évidence entre BMD/E-test/disque/Vitek®2, il s'agissait des souches DAM-EC079, DAM-EC041 et DAM-EC047 (Tableau 6).

Tableau 6 : Discordance entre les différentes méthodes utilisées en routine

	<i>BMD Sensititre™</i>	<i>Gradient de diffusion</i>	<i>Méthode des disques</i>	<i>VITEK®2</i>
<i>DAM-EC079</i>	Non fait	S (4 mg/L)	R (14 mm)	R (32 mg/L)
<i>DAM-EC041</i>	R (> 16 mg/L)	S (4 mg/L)	R (14 mm)	S (8 mg/L)
<i>DAM-EC047</i>	R (> 16 mg/L)	S (4 mg/L)	R (13 mm)	S (8 mg/L)

IV.3.2. Construction des algorithmes décisionnels

Des différentes courbes ROC présentées ci-dessus, résultent des seuils de $P\Delta R$ et $P\Delta AUC$ propres à chaque antibiotique permettant la construction d'algorithmes (Tableau 7). La fiabilité de ces seuils est déterminée par l'AUC de leur courbe ROC.

Tableau 7 : Variables de décisions déterminées par courbe ROC

<i>Antibiotique</i>	<i>Nombre de souches testées</i>			<i>Seuil</i>	<i>Seuil</i>	<i>Courbe ROC</i>	<i>Courbe ROC</i>
	Total	Résistantes	Sensibles	<i>PΔR</i>	<i>PΔAUC</i>	<i>Valeur AUC PΔR</i>	<i>Valeur AUC PΔAUC</i>
<i>Méccillinam</i>	37	2	35	1,13	21,25	0,618	1,000
<i>Témocilline</i>	38	4	34	20,92	95,47	1,000	0,990
<i>Céfixime</i>	33	8	25	125,81	90,02	0,973	1,000
<i>Nitrofurantoïne</i>	39	2	37	9,02	53,2	0,987	1,000
<i>Fosfomycine</i>	46	14	32	30,35	100	0,944	0,960

Les algorithmes ont été construits en ne prenant en compte qu'un seul des deux seuils analysés, soit celui du $P\Delta R$, soit celui du $P\Delta AUC$. Dans cette étude, les seuils étaient considérés comme exploitables lorsqu'ils bénéficiaient d'une AUC dite « excellente », c'est-à-dire supérieure à 0,9. Lorsque les deux paramètres présentaient une AUC supérieure à 0,9, seul le meilleur a été retenu pour la construction des algorithmes, afin que ceux-ci soient les plus prédictifs possible. En pratique, la valeur seuil a été comparée au $P\Delta R$ ou $P\Delta AUC$ obtenu à partir du fractogramme (Figure 63).

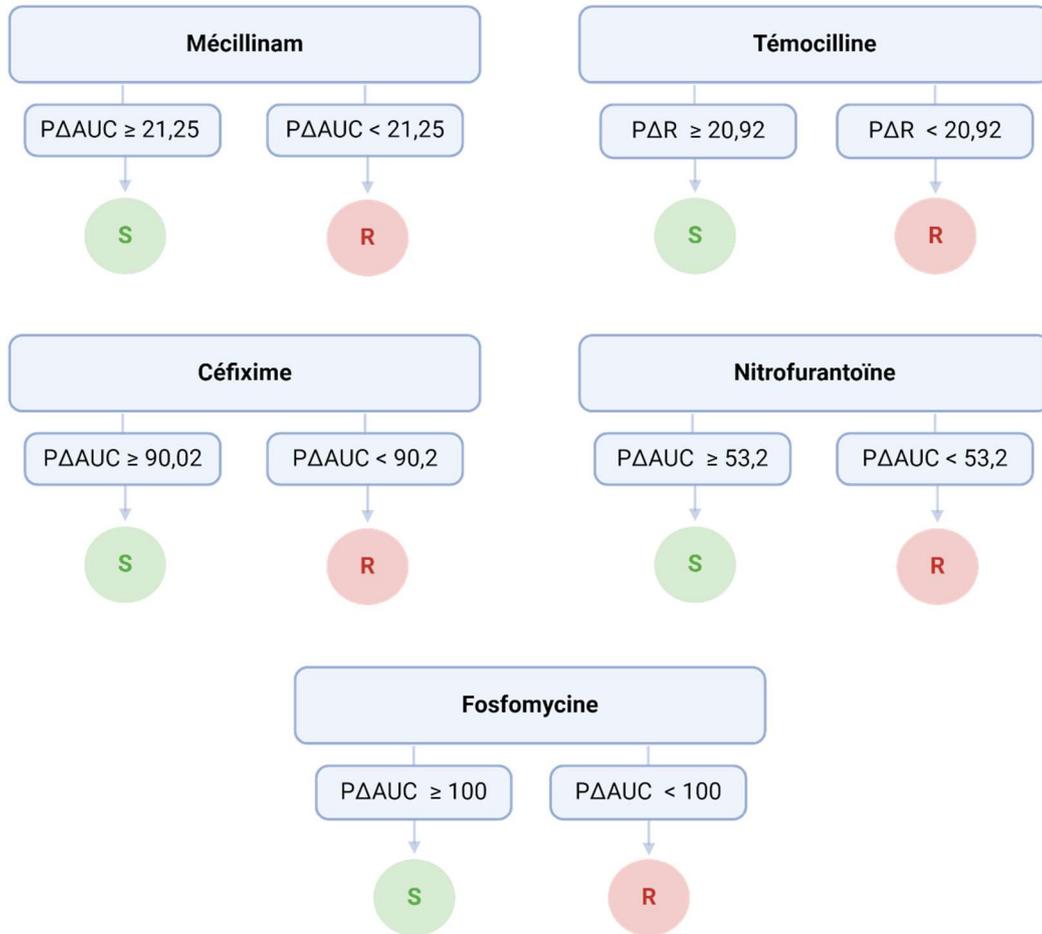


Figure 63 : Algorithmes décisionnels vis-à-vis des différents antibiotiques testés

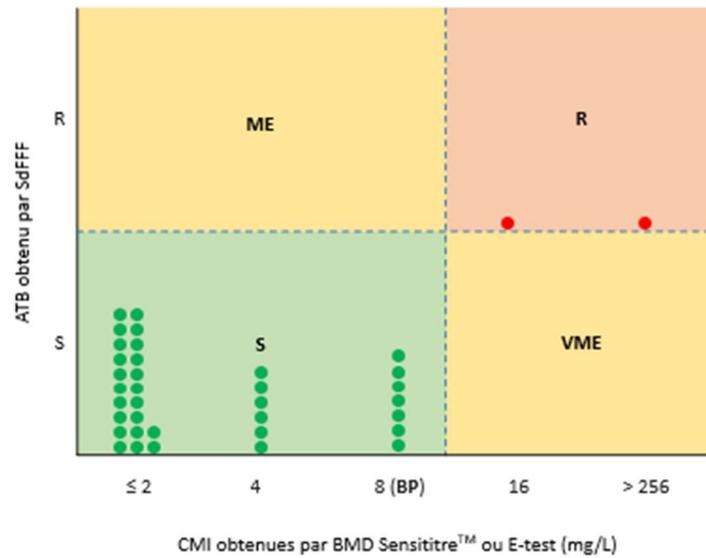
IV.3.3. Résultats obtenus à partir des algorithmes

En utilisant les algorithmes déterminés ci-dessus, chaque souche a pu être classée « sensible » ou « résistante » par la méthode SdFFF vis-à-vis de l'antibiotique testé. Cette catégorisation a ensuite été comparée à celle obtenue par la méthode de référence. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8.

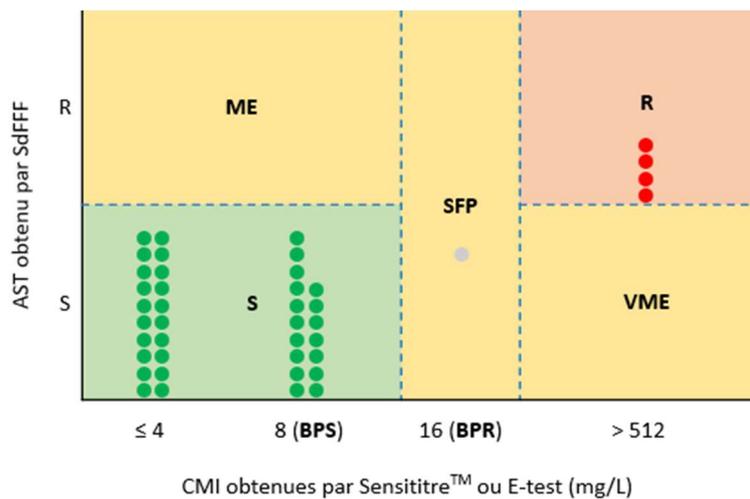
Tableau 8 : Résultats de SdFFF obtenus à partir des algorithmes décisionnels ci-dessus comparés à la méthode de référence

Antibiotique	Nombre de souches testées	R	VME	Se	S	ME	Sp	CA
Mécillinam	37	2	0	100%	35	0	100%	100%
Témocilline	38	4	0	100%	34	0	100%	100%
Céfixime	33	8	0	100%	24	0	100%	100%
Nitrofurantoïne	39	2	0	100%	37	0	100%	100%
Fosfomycine	46	13	1	92,9%	30	2	93,8%	93,4%

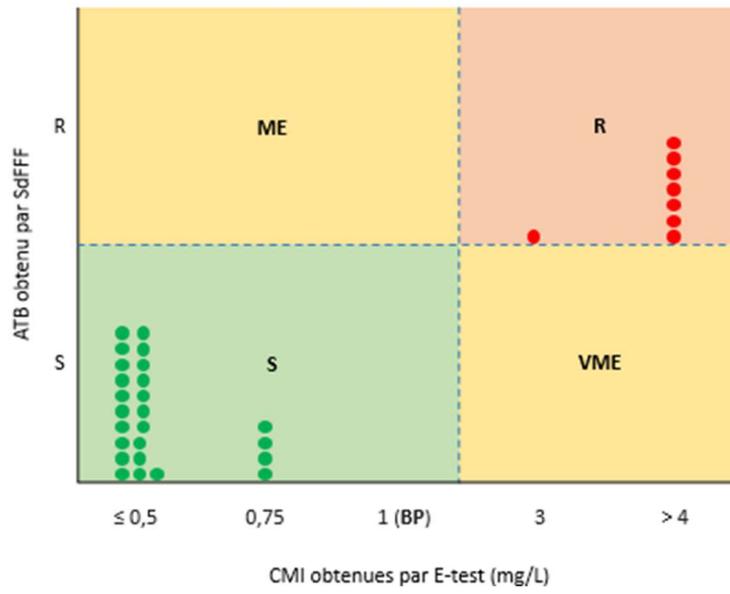
Mécillinam



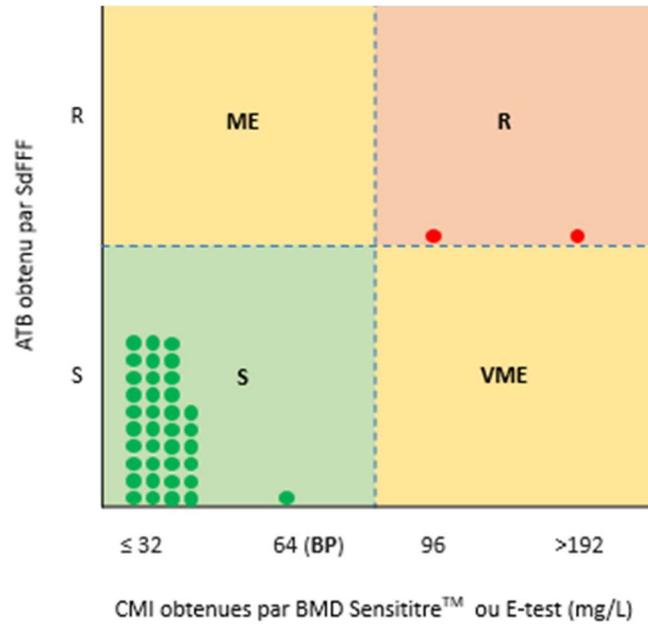
Témocilline



Céfixime



Nitrofurantoïne



Fosfomycine

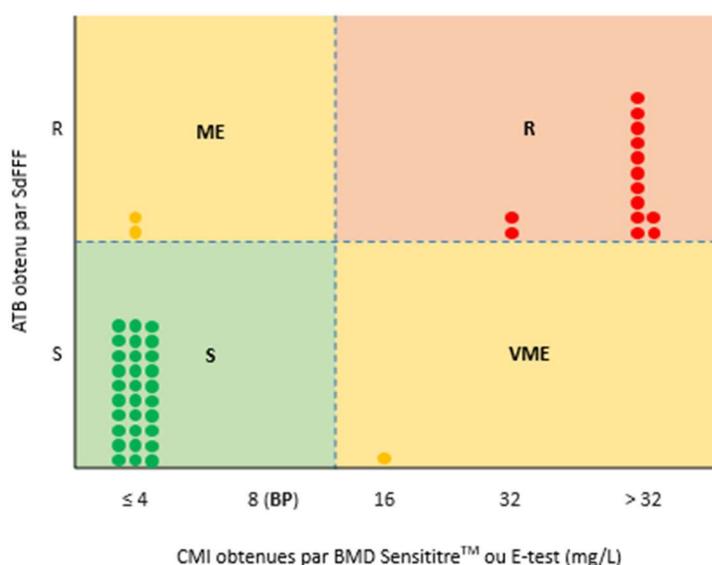


Figure 64 : Répartition des CMI en fonction des antibiogrammes obtenus par SdFFF et de la méthode de référence

Il est à noter que 12 souches sur les 89 étudiées présentaient un fractogramme « double » signifiant la présence de 2 sous-populations (Figure 65). Cependant, les deux pics analysés ont été concordants avec le résultat obtenu par la méthode de référence pour chacune d'entre elles. Cela signifie que, pour les souches catégorisées sensibles en méthode de référence, les deux pics ont été classés sensibles et pour les souches résistantes, les deux pics ont été classés résistants, permettant le rendu d'un résultat correct pour l'ensemble de ces souches.

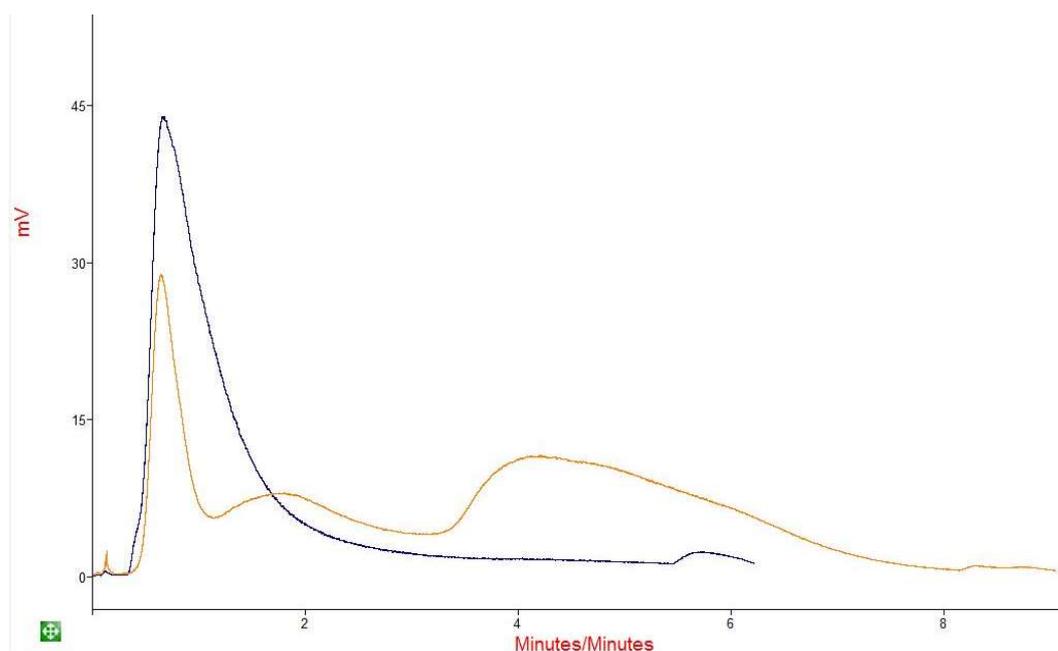


Figure 65 : Fractogramme de la souche DAM-EC026 sensible au céfixime avec la courbe de la souche contrôle (orange) présentant deux pics et la souche additionnée de céfixime (bleu)

IV.4. Résultats obtenus pour l'amoxicilline-acide clavulanique

L'amoxicilline-acide clavulanique testé à la concentration de 32 mg/L d'amoxicilline (traitement des cystites) a nécessité une attention particulière dans ce travail car, contrairement aux antibiotiques précédemment présentés, celui-ci est en cours d'optimisation.

En effet, dans une précédente étude, l'amoxicilline-acide clavulanique a été testée avec la concentration recommandée d'acide clavulanique de 2 mg/L, engendrant un nombre important de VME. L'acide clavulanique, utilisé pour sa capacité à inhiber les bêta-lactamases, possède une activité antibiotique propre qui semble s'exercer dans les conditions de SdFFF. Devant ces résultats, plusieurs tests ont été menés afin de déterminer la concentration d'acide clavulanique diminuant l'activité antibiotique de celui-ci tout en conservant son pouvoir inhibiteur de bêta-lactamases. Le meilleur résultat fut obtenu avec une concentration de 0,35 mg/L d'acide clavulanique, encourageant alors à tester celle-ci à plus grande échelle. Dans ce travail, sont présentés les résultats des tests effectués avec 32 mg/L d'amoxicilline et 0,35 mg/L d'acide clavulanique.

IV.4.1. Stratégie de sélection de souches appliquée dans ce travail pour la validation de la concentration d'acide clavulanique

C'est dans ce contexte que la stratégie appliquée à cet antibiotique a été priorisée, expliquant la quantité plus importante de souches testées comparativement aux autres antibiotiques étudiés. Au total, 69 souches ont été testées pour cet antibiotique, parmi elles : 24 souches résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique (CMI > 32 mg/L), 40 souches résistantes à l'amoxicilline (> 32 mg/L) mais sensibles à l'amoxicilline-acide clavulanique et 5 souches sensibles à l'amoxicilline et, par conséquent, à l'amoxicilline couplée à l'acide clavulanique.

IV.4.2. Construction de la courbe ROC de l'amoxicilline-acide clavulanique

Parmi les 69 souches testées avec de l'amoxicilline-acide clavulanique, l'une d'elles (DAM-EC067) a été exclue pour des raisons techniques et n'a pas pu être re-testée par la suite. L'ensemble des données issues des fractogrammes des 68 souches restantes a permis de construire la courbe ROC vis-à-vis de cet antibiotique (Figure 66).

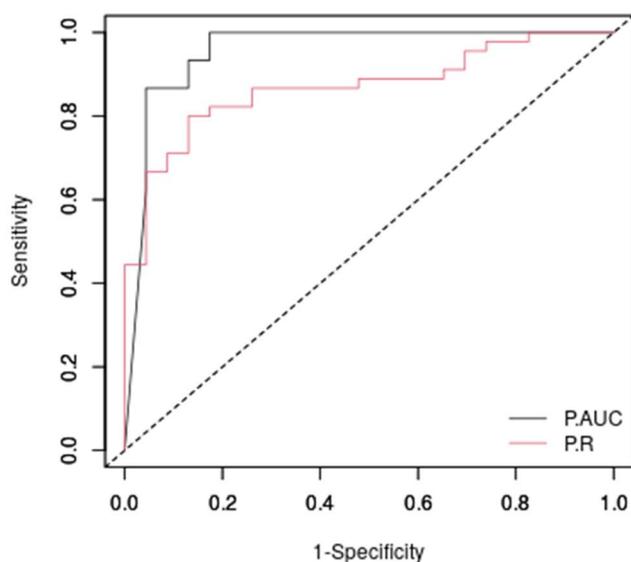


Figure 66 : Courbe ROC pour l'association amoxicilline-acide clavulanique

La courbe ROC a permis d'obtenir des seuils pour PΔR et PΔAUC permettant la catégorisation des souches selon les informations apportées par le fractogramme, de la même façon que pour les antibiotiques précédemment présentés (Tableau 9).

Tableau 9 : Variables de décision déterminées par la courbe ROC vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique

Antibiotique	Nombre de souches testées			Seuil	Seuil	Courbe ROC	Courbe ROC
	Total	Résistantes	Sensibles	PΔR	PΔAUC	Valeur AUC PΔR	Valeur AUC PΔAUC
Amoxicilline-acide clavulanique	68	23	45	8,06	47,26	0,843	0,962

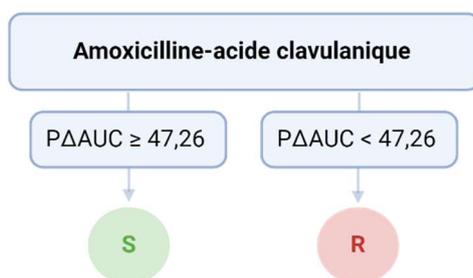


Figure 67 : Algorithme décisionnel concernant l'amoxicilline-acide clavulanique

La catégorisation clinique obtenue grâce à l'algorithme ci-dessus (Figure 67) a été comparée à la méthode de référence. La catégorisation était conforme pour 64 souches, soit un accord de catégorie de 94,1% (Tableau 10). En revanche, 3 ME (DAM-EC068, DAM-

EC077, DAM-EC091) et 1 VME ont été détectées (DAM-EC081) présentant chacune des CMI différentes en méthode de référence (Figure 68).

Il est à noter que parmi les 68 souches analysées, 6 présentaient dans leur fractogramme un double pic. Ces six souches ont présenté des résultats concordants sur les deux pics présents sur les fractogrammes, ce qui a permis de les classer correctement.

Tableau 10 : Résultats de SdFFF obtenus à partir des algorithmes décisionnels ci-dessus comparés à la méthode de référence

Antibiotique	Nombre de souches	R	VME	Se	S	ME	Sp	CA
Amoxicilline-acide clavulanique	68	22	1	95,7%	42	3	93,3%	94,1%

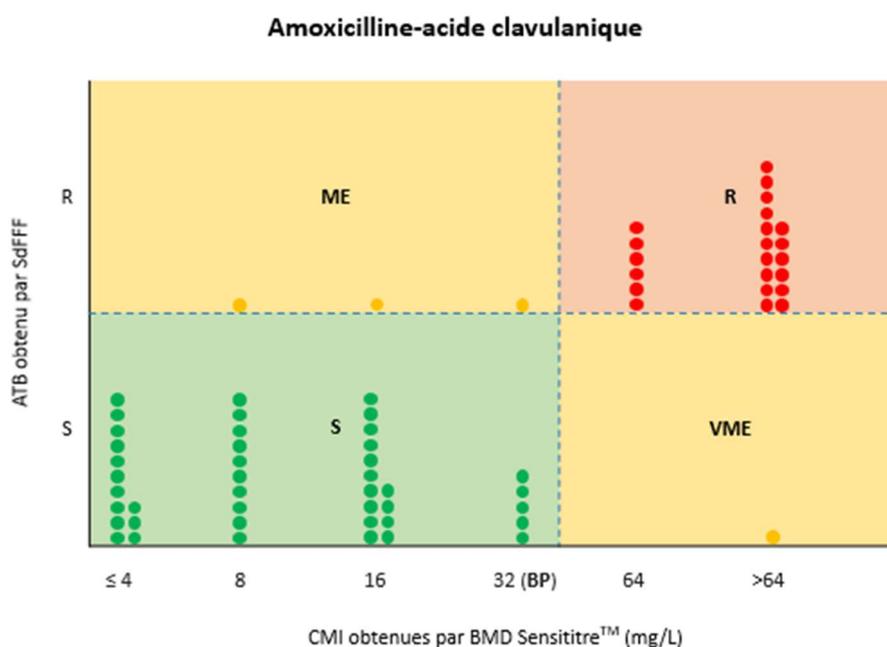


Figure 68 : Répartition des CMI amoxicilline-acide clavulanique des 68 souches de *E. coli* en fonction des antibiogrammes obtenus par SdFFF

IV.5. Performances globales de la méthode de SdFFF

La performance globale de l'antibiogramme urinaire par méthode de SdFFF a été évaluée par comparaison aux méthodes de référence (E-test et BMD). L'accord de catégorie était de 97,3% avec une sensibilité à 96,2% et une spécificité à 97,6% (Tableau 11).

Tableau 11 : Performances globales de la SdFFF en comparaison à la méthode de référence

Paramètres	Performances
CA	97,3% (254/261)
Sensibilité	96,2% (51/53)
Spécificité	97,6% (203/208)
VME	2
ME	5
Détail de l'étude	
Espèce bactérienne testée	1
Antibiotiques testés	6
Nombre de souches	89
Nombre de couples souche-antibiotique	261
Nombre de couples souche-antibiotique S	208
Nombre de couples souche-antibiotique R	53

IV.6. Zoom sur les erreurs de catégorisation clinique

Sur l'ensemble des 261 couples souche-antibiotique testés, deux VME ont été détectées :

- L'une vis-à-vis de la fosfomycine pour une souche résistante présentant une CMI à 16 mg/L (souche DAM-EC005). Cette catégorisation a été confirmée par Vitek[®]2 ainsi que par bandelette E-test mettant en évidence une CMI à 12 mg/L. Le fractogramme obtenu en SdFFF pour la souche additionnée de fosfomycine était plat avec un $P\Delta AUC$ à 100% (Figure 69).

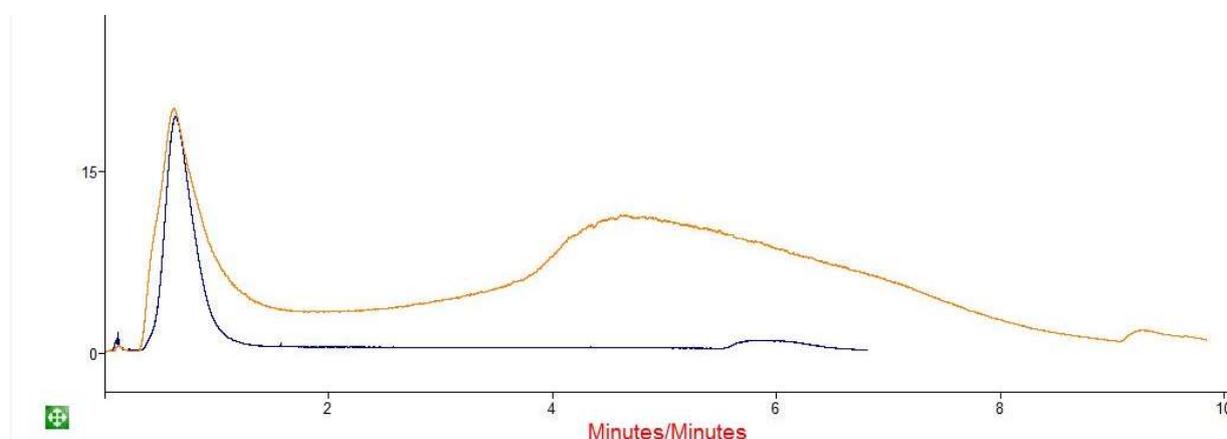


Figure 69 : Fractogramme de la souche DAM-EC005 avec la courbe de la souche contrôle (orange) et la courbe de la souche additionnée de fosfomycine (en bleu)

- La seconde vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique (souche DAM-EC081). Le fractogramme de la souche contrôle présentait un pic peu résolu, rendant son interprétation délicate (Figure 70). La DO_{600nm} présentée par cette souche après les deux heures d'incubation était de 0,314, faisant d'elle la DO_{600nm} la plus faible de l'ensemble des souches testées. Il est à noter que cette souche a été incubée plus longtemps afin de vérifier si la résolution du fractogramme s'améliorait avec une quantité plus grande de bactéries, ce qui n'a pas été le cas.

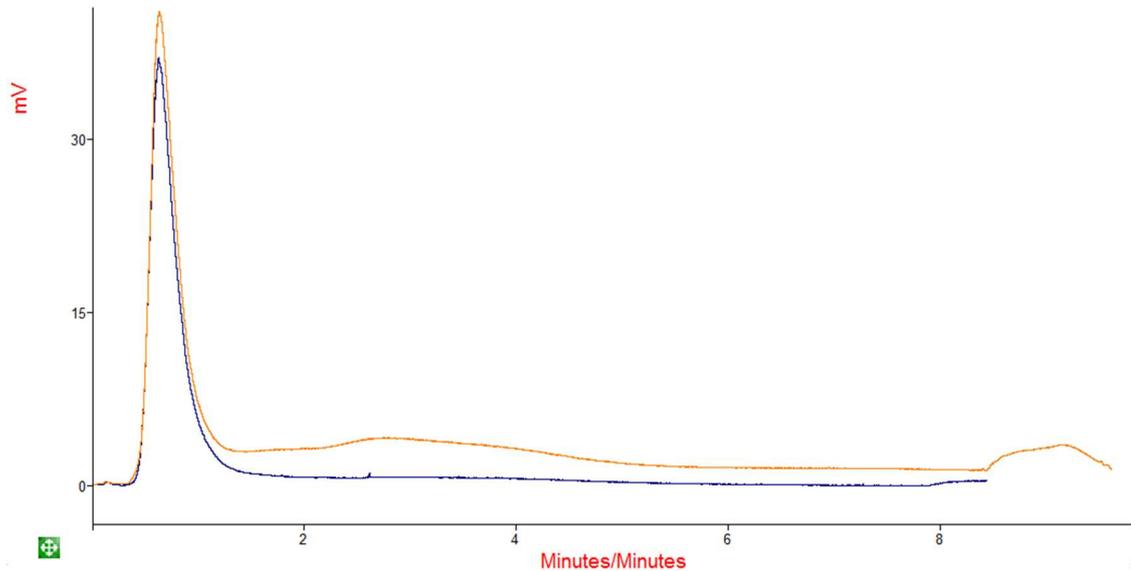


Figure 70 : Fractogramme de la souche DAM-EC081 avec la courbe de la souche non additionnée d'antibiotique (orange) et la courbe de la souche additionnée d'amoxicilline-acide clavulanique (bleu)

Quant aux ME, elles sont au nombre de 5 :

- 2 ME ont été détectées pour la fosfomycine, probablement dues à un algorithme trop peu discriminant. En effet, les 32 souches sensibles testées présentaient des CMI ≤ 4 mg/L dont 30 d'entre elles présentaient des fractogrammes dits « plats » desquels découle le seuil de $P\Delta AUC$ de 100%. Ce seuil de 100% permet une catégorisation correcte des deux souches qui présentent des CMI à 32 mg/L dont les $P\Delta AUC$ sont élevés : 96,15% et 78,58%, et donc évite 2 VME. Cependant cela a eu pour conséquence la mauvaise catégorisation de deux souches sensibles qui ne présentaient pas un fractogramme plat, DAM-EC021 et DAM-EC077 avec des $P\Delta AUC$ respectifs de 95,86% et 94,93%.
- 3 ME ont également été observées avec l'amoxicilline-acide clavulanique pour les souches DAM-EC068, DAM-EC077 et DAM-EC091 présentant des $P\Delta AUC$ respectifs de 32,41%, 29,73% et 37,19% relativement proches du breakpoint qui est à 47,26%. Ces 3 souches présentaient une résistance à l'amoxicilline et une sensibilité à l'amoxicilline-acide clavulanique indiquant qu'elles sont porteuses d'une pénicillinase.

IV.7. Antibiogramme rapide à partir d'échantillons d'urines : preuve de concept

Dans un premier temps, des tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer la durée d'incubation nécessaire selon la densité bactérienne initiale, dans un second temps les conditions pré-analytiques avec notamment l'impact du borate ont été étudiées puis dans un troisième temps des urines non traitées ont été analysées en SdFFF afin de vérifier l'interprétabilité du fractogramme, et enfin des échantillons urinaires ont été directement testés additionnés d'antibiotiques.

IV.7.1. Tests préliminaires avec des suspensions de *E. coli*

A partir d'un isolat bactérien, trois suspensions ont été préparées afin de mesurer la DO_{600nm} à 2 heures, 4 heures et 6 heures. Au total, 19 souches ont été testées pour les 3 temps d'incubation. Les concentrations prises en considération pour les calculs ne sont pas les concentrations bactériennes hypothétiques issues de la dilution en cascade mais les concentrations obtenues par l'automate de cytométrie en flux UF4000 afin d'être au plus proche de la réalité du laboratoire (Tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentage de souches obtenant une $DO_{600nm} \geq 0,5$ selon le temps d'incubation et la concentration bactérienne en bactéries/mL (bact/mL)

Concentration bactérienne initiale (UF4000)	Pourcentage de souches $DO_{600nm} \geq 0,5$ en 2h	Pourcentage de souches $DO_{600nm} \geq 0,5$ en 4h	Pourcentage de souches $DO_{600nm} \geq 0,5$ en 6h
10^7 bact/mL	94,1%	100%	100%
10^6 bact/mL	10,5%	100%	100%
10^5 bact/mL	0%	73,9%	100%
10^4 bact/mL	0%	10%	90%
10^3 bact/mL	0%	0%	36,4%

IV.7.2. Test des conditions pré-analytiques : impact du borate

Dans un premier temps, trois urines différentes fraîchement émises reçues au laboratoire du CHU de Limoges ont été analysées. L'une d'elles, l'urine 1, a été recueillie sur tube boraté et les deux autres, les urines 2 et 3, ont été recueillies dans un pot dépourvu de borate. Après une incubation de 2 heures à 37°C, la DO_{600nm} de l'urine 1, contenue dans le tube boraté, était de 0,32, ne permettant donc pas une analyse en SdFFF. En revanche, les urines 2 et 3 non boratées présentaient respectivement des DO_{600nm} à 0,908 et 0,831 permettant donc une analyse par la méthode de SdFFF.

Dans un second temps, afin de confirmer l'impact du borate, deux urines prélevées en pots dépourvus de borate ont été analysées : urines 4 et 5. Une partie de chaque urine a été transférée dans un tube boraté, afin de tester chaque condition en parallèle sur la même urine (Tableau 13). Ensuite, les 4 suspensions issues des deux urines ont été passées sur la machine de SdFFF afin de comparer les fractogrammes (Figures 71 et 72).

Tableau 13 : Résultats des tests concernant le borate sur les urines 4 et 5

	<i>Conditions pré-analytique</i>	<i>DO_{600nm} après 2 heures d'incubation</i>
<i>Urine 4</i>	Borate	0,038
	Pot sans borate	0,346
<i>Urine 5</i>	Borate	0,308
	Pot sans borate	0,609

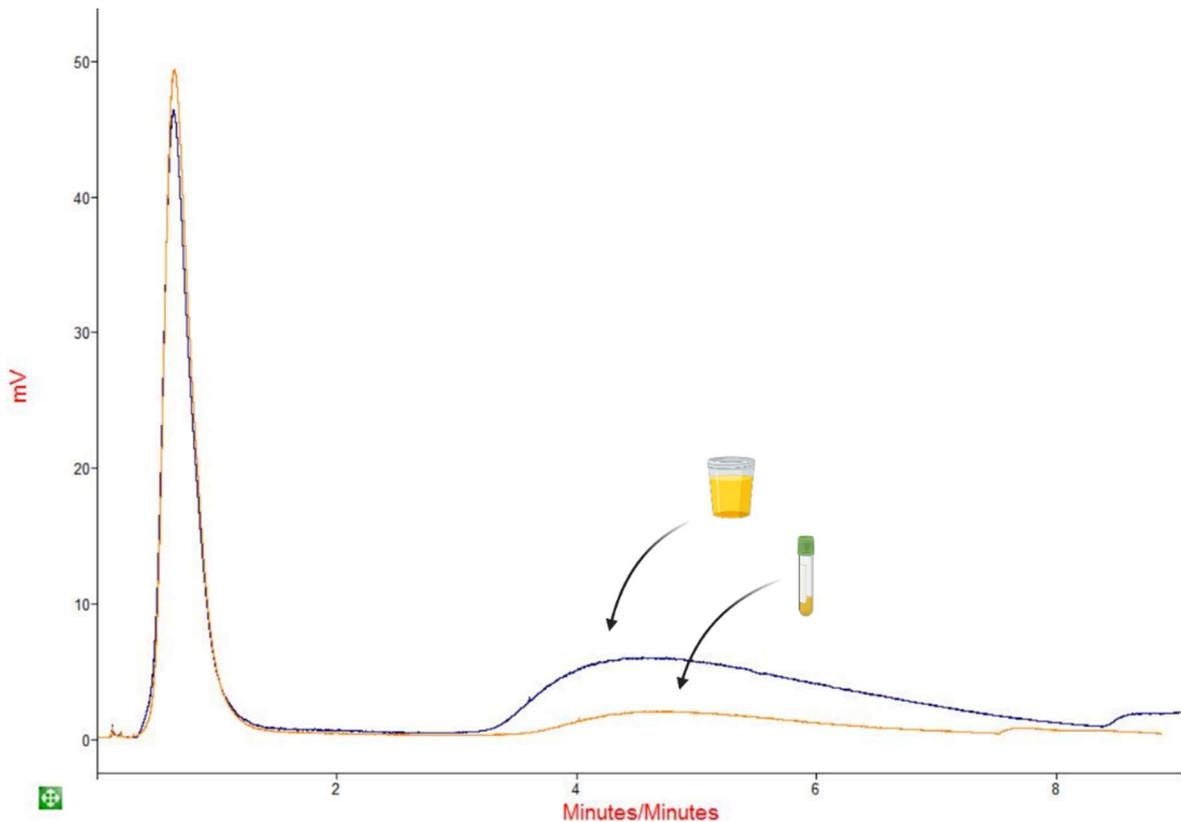


Figure 71 : Fractogramme de l'urine 4

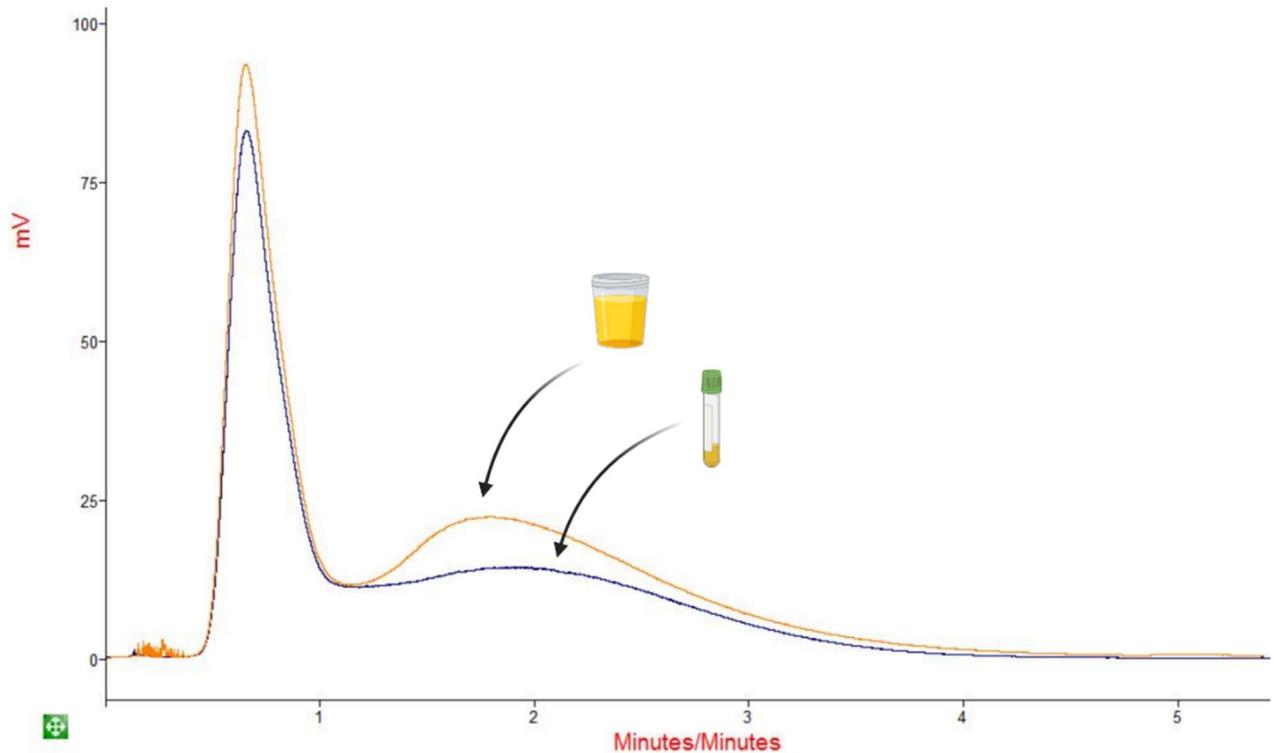


Figure 72 : Fractogramme de l'urine 5

IV.7.3. Injection d'urines non traitées

Cinq urines additionnées de borate (urines 6 à 10) ont été sélectionnées sur le critère d'une numération bactérienne supérieure à 10^6 UFC/mL. Après 2 heures d'incubation, aucune n'a obtenu une $DO_{600nm} > 0,5$ permettant une analyse en SdFFF. L'incubation a donc été prolongée et deux urines ont pu être testées en SdFFF car la DO_{600nm} était suffisante après 4 heures d'incubation, il s'agit des urines 9 et 10. Deux autres urines ont obtenu une croissance acceptable (urines 6 et 8), l'une en 5h20 et l'autre en 6h d'incubation mais le temps de pouce n'était pas compatible avec le passage sur la machine de SdFFF le jour même et elles n'ont donc pas pu être analysées. En revanche une des cinq urines (urine 7) n'a pas obtenu la DO_{600nm} nécessaire malgré une incubation de 6h. Les fractogrammes des deux urines ayant pu être testées sur la machine de SdFFF sont présentés en Figure 73. Les temps de rétention des urines 9 et 10 étaient respectivement de 4,03 minutes et 4,35 minutes (Tableau 14).

Tableau 14 : Résultats du protocole sur les urines non traitées

	<i>Temps de sortie d'incubation (heures)</i>	<i>DO_{600nm} à la sortie d'incubation</i>	<i>SdFFF</i>	<i>Tr (minutes)</i>	<i>AUC Population bactérienne</i>
<i>Urine 6</i>	5,33	0,837	Possible – Non fait	-	-
<i>Urine 7</i>	6	0,3	Impossible	-	-
<i>Urine 8</i>	6	0,587	Possible – Non fait	-	-
<i>Urine 9</i>	4	0,597	Possible – Fait	4,03	2448
<i>Urine 10</i>	4	0,859	Possible - Fait	4,35	2129

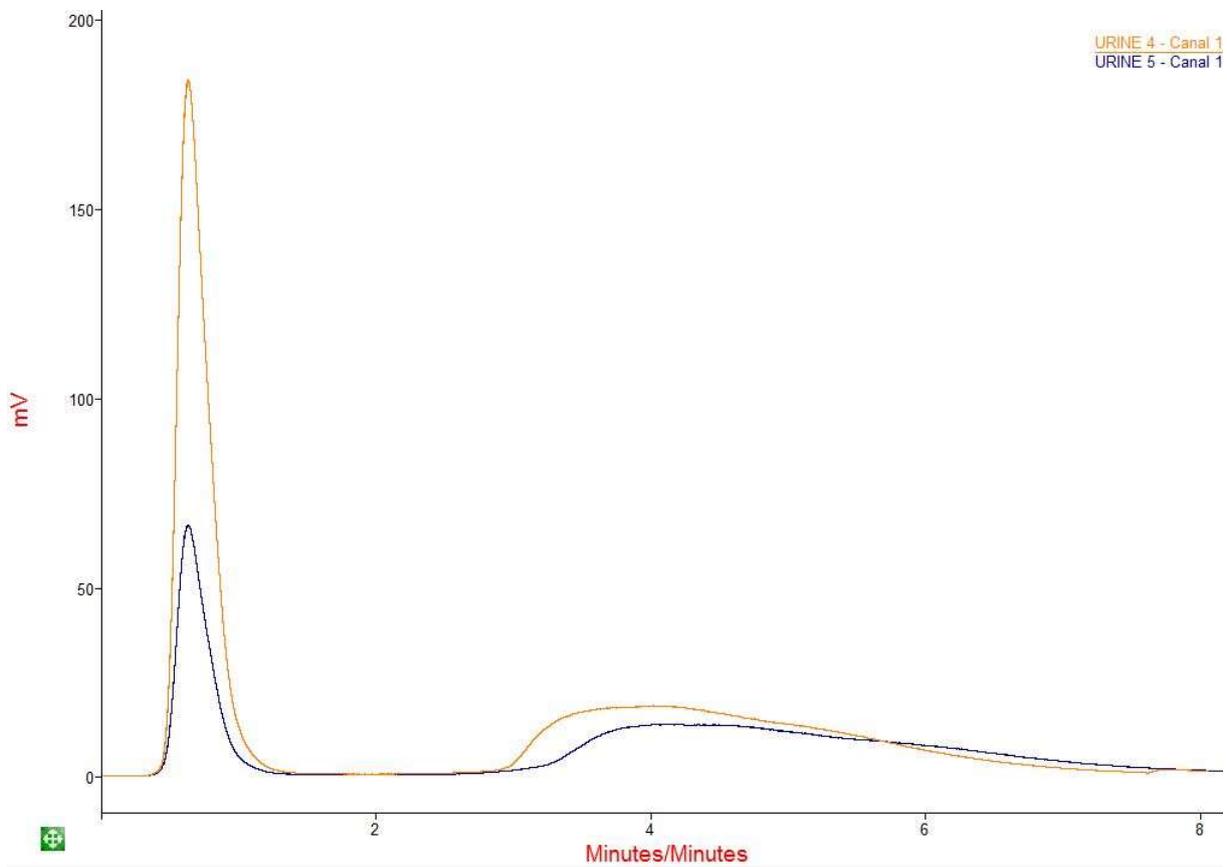
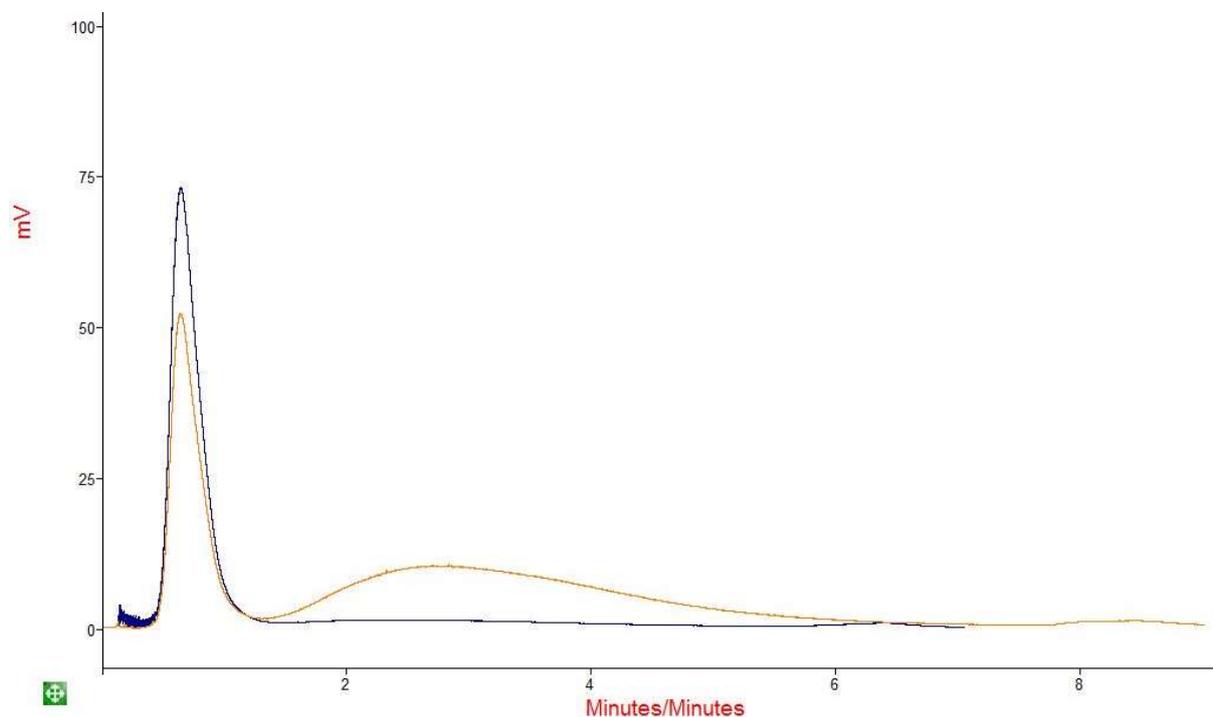


Figure 73 : Fractogramme de l'urine 9 (orange) et de l'urine 10 (bleu)

IV.7.4. Injection d'urines additionnées d'antibiotiques

IV.7.4.1. Test de l'amoxicilline

Le protocole effectué sur les souches a été reproduit sur deux urines : l'urine 11 (boraté) contenant une souche de *E. coli* sensible à l'amoxicilline et l'urine 12 (pot stérile) contenant une souche de *E. coli* résistante à l'amoxicilline. Concernant l'urine 11, le P Δ R obtenu était de 343,75% et le P Δ AUC de 100%. Pour l'urine 12, le P Δ R et le P Δ AUC étaient respectivement de 4,45% et -26,27% (Figures 74, 75 et Tableau 15).



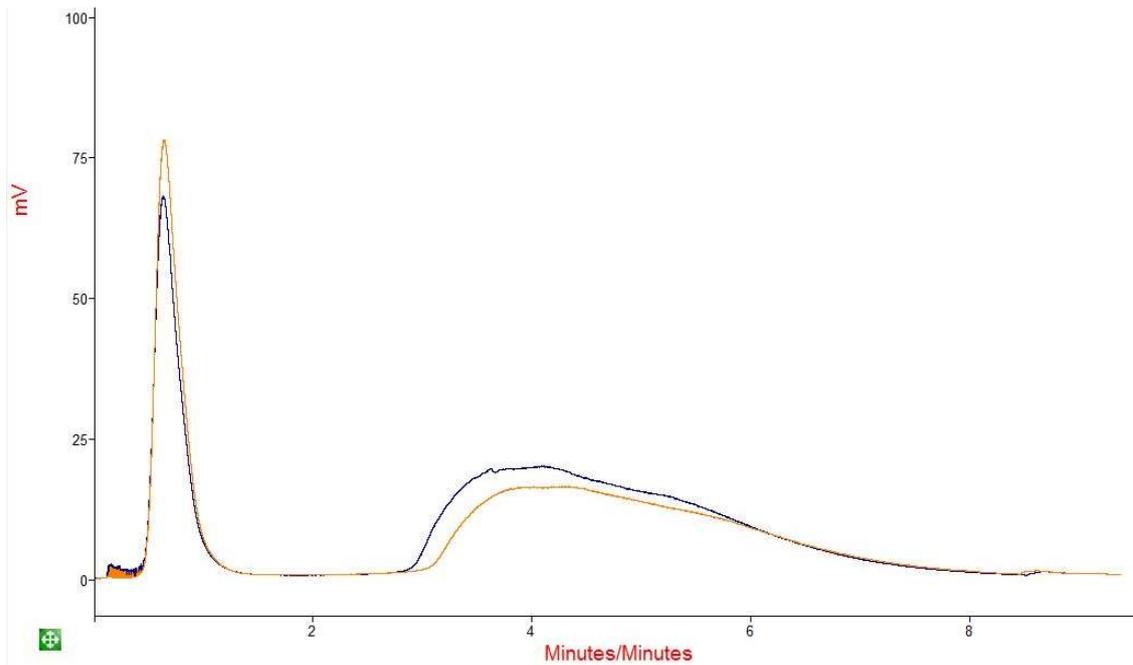


Figure 75 : Fractogramme obtenu à partir de l'urine 12 avec la courbe de l'urine contrôle (orange) et la courbe de l'urine additionnée d'amoxicilline (bleu)

L'algorithme utilisé (Figure 76) a été mis au point dans une précédente étude et permet de catégoriser correctement les souches de *E. coli* présentes dans les deux urines (Tableau 15).

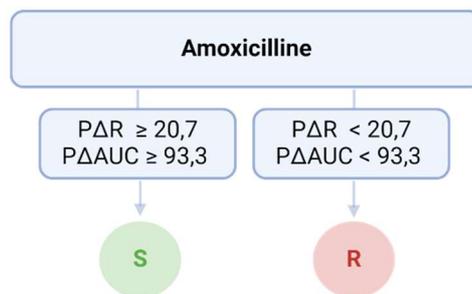


Figure 76 : Algorithme décisionnel concernant l'amoxicilline (67)

Tableau 15 : Résultats issus des fractogrammes des urines 11 et 12

	<i>DO</i> _{600nm} après 2h d'incubation	<i>PΔR</i>	<i>PΔAUC</i>	Antibiogramme routine	Antibiogramme via SdFFF
Urine 11 (borate)	0,782	343,75	100	Sensible amoxicilline	Sensible amoxicilline
Urine 12 (pot stérile)	0,493	4,45	-26,27	Résistant amoxicilline	Résistant amoxicilline

IV.7.4.2. Test d'amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ciprofloxacine et triméthoprim- sulfaméthoxazole

Une seule urine a été testée vis-à-vis de 4 antibiotiques différents : amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique (32 mg/L), ciprofloxacine et triméthoprim-sulfaméthoxazole. Il s'agit de l'urine 13 contenant une souche de *E. coli* résistante à l'amoxicilline et sensible aux trois autres antibiotiques étudiés.

L'interprétation des valeurs de PΔR et de PΔAUC issues du fractogramme (Figure 78) a été effectuée à partir de l'algorithme mis au point dans cette étude concernant l'amoxicilline-acide clavulanique (Figure 68) et à partir des algorithmes issus d'un précédent travail pour l'amoxicilline (Figure 76), la ciprofloxacine et le triméthoprim-sulfaméthoxazole (Figure 77).

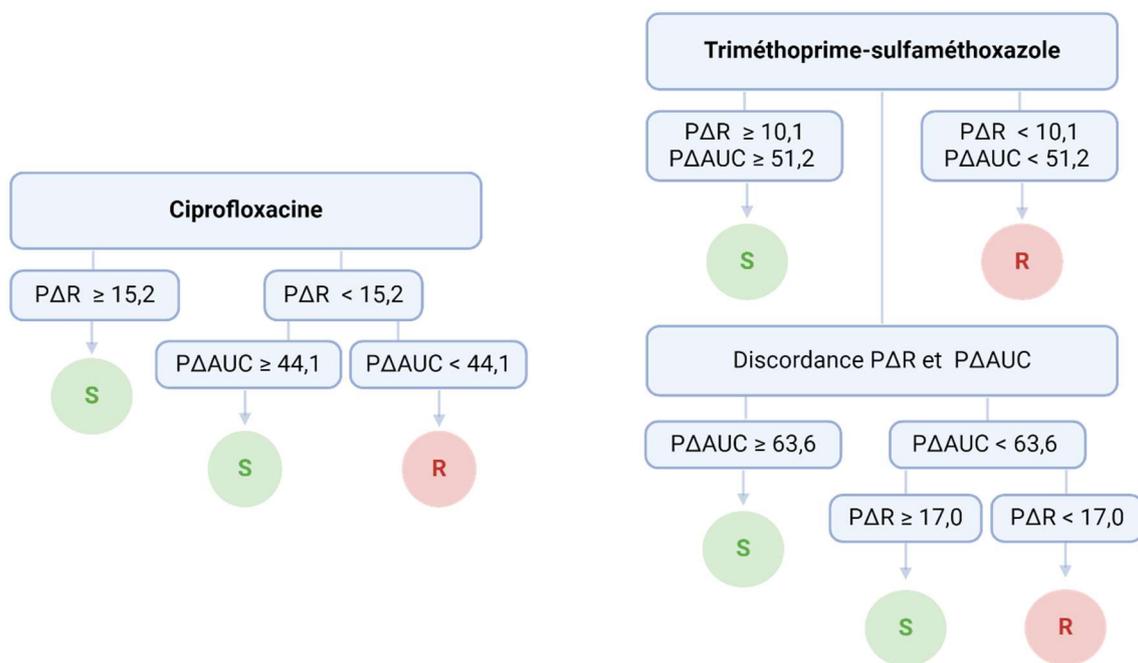


Figure 77 : Algorithmes décisionnels de la ciprofloxacine et du triméthoprim-sulfaméthoxazole (67)

Ces différents algorithmes ont permis de catégoriser correctement la souche de *E. coli* présente dans cette urine vis-à-vis des 4 antibiotiques testés. En effet, la souche a été catégorisée résistante vis-à-vis de l'amoxicilline et sensible vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique, de la ciprofloxacine et du triméthoprim-sulfaméthoxazole (Tableau 16 et Figure 78).

Tableau 16 : Résultats issus du fractogramme de l'urine 13 (boraté)

	$P\Delta R$	$P\Delta AUC$	Antibiogramme routine	Antibiogramme via SdFFF
<i>Amoxicilline</i>	1,27	-14,33	Résistant	Résistant
<i>Amoxicilline-acide clavulanique</i>	4,68	75,15	Sensible	Sensible
<i>Ciprofloxacine</i>	457,14	100,00	Sensible	Sensible
<i>Triméthoprim-sulfaméthoxazole</i>	448,44	100,00	Sensible	Sensible

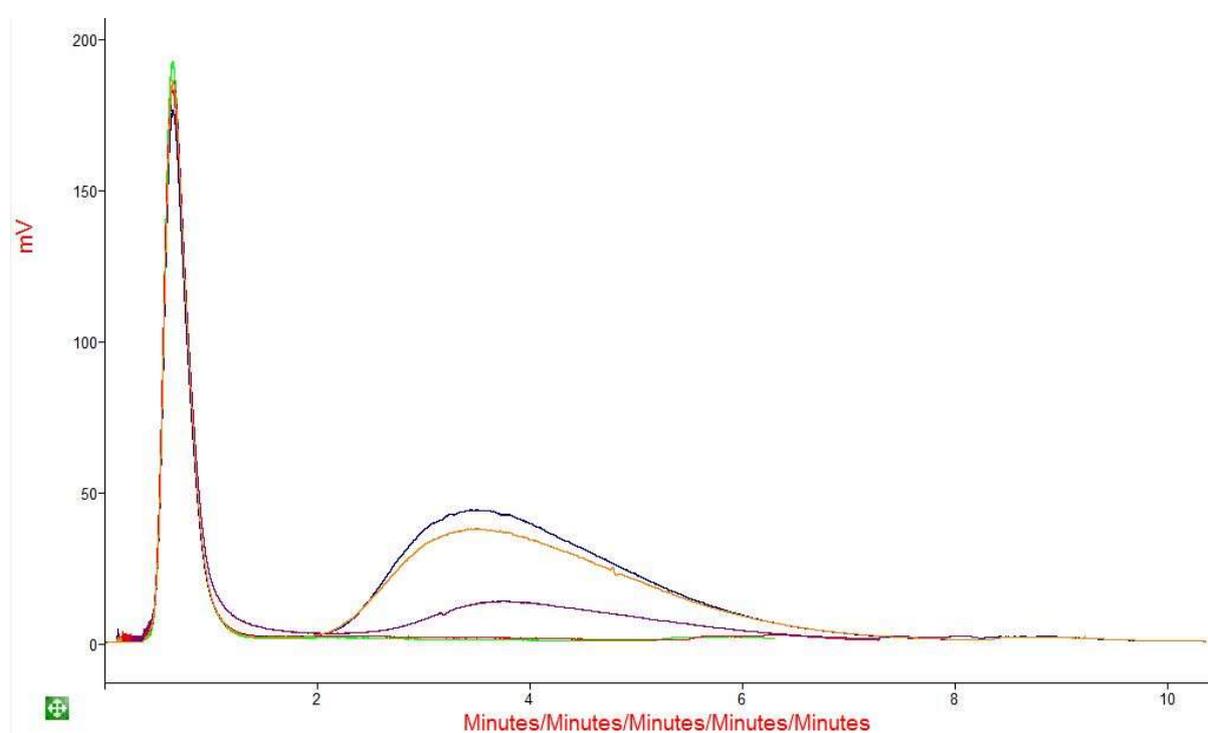


Figure 78 : Fractogramme de l'urine 13 avec le contrôle (orange), l'amoxicilline (bleu), l'amoxicilline acide clavulanique (violet), la ciprofloxacine (rouge) et le triméthoprim-sulfaméthoxazole (vert)

V. Discussion

Dans la première partie de ce travail, un « panel urinaire » composé de l'ensemble des antibiotiques utilisés dans les ITU et n'ayant été testés dans aucune étude antérieure a été mis au point. Ce panel a été testé sur 89 souches de *E. coli* démontrant la capacité de la SdFFF à obtenir, à partir de celles-ci, un antibiogramme urinaire. Bien que cette méthode soit encore en cours de développement, ses performances sont excellentes : sur les 261 couples souche-antibiotique testés, 254 ont été correctement catégorisés permettant d'atteindre un accord de 97,3% avec la méthode de référence. Malgré les 7 erreurs détectées, la sensibilité et spécificité globale sont très bonnes avec des valeurs respectives de 96,2% et de 97,6% conformes à la norme ISO 20776-2.

Seulement 2 VME ont été constatées lors de cette étude. La première concernait la fosfomycine dont la souche bactérienne présentait une CMI envers cet antibiotique à seulement une dilution du break-point, en faisant une souche particulièrement difficile à catégoriser. La seconde, vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique, présentait un fractogramme peu résolutif motivant l'ajout d'un contrôle qualité permettant de repérer ce type de courbe de façon à rendre le résultat ininterprétable et éviter ainsi une catégorisation erronée de ces souches. En plus de ces 2 VME, 5 ME ont été détectées : 2 concernant la fosfomycine et 3 concernant l'amoxicilline-acide clavulanique. Les 2 ME de la fosfomycine seront potentiellement corrigées à l'avenir avec l'amélioration de l'algorithme de catégorisation de la fosfomycine, contenant actuellement un seuil P Δ AUC à 100%, trop peu discriminant. Le défaut de ce seuil est probablement dû au choix des souches testées qui présentent des CMI dites « extrêmes » c'est-à-dire éloignées du breakpoint, même si de telles CMI sont représentatives de l'épidémiologie de la résistance concernant cet antibiotique. En effet, la totalité des 32 souches sensibles testées présentaient des CMI ≤ 4 mg/L à la fosfomycine et 11 souches résistantes sur 14 présentaient des CMI > 32 mg/L. Il en résulte des fractogrammes « caricaturaux » : sur les 32 souches sensibles testées, 30 présentaient un fractogramme complètement plat et donc un P Δ AUC à 100%. Le seuil P Δ AUC à 100% qui en résulte catégorise toutes les souches présentant un fractogramme non plat comme résistantes. C'est ici le cas des 2 ME qui présentent pourtant des P Δ AUC à 95,86% et 94,93%. Ensuite, concernant les 3 ME liées à l'amoxicilline-acide clavulanique, elles sont la conséquence de la diminution de la quantité d'acide clavulanique. En effet, cette baisse de concentration évite l'action antibiotique propre de l'acide clavulanique (source de nombreuses VME) mais diminue également l'activité d'inhibition des bêta-lactamases, ce qui est à l'origine de ces 3 ME. Les trois souches faussement catégorisées résistantes présentaient des valeurs de P Δ AUC proches du seuil ainsi qu'une pénicillinase de bas niveau, qui ne parvient pas à être inhibée par la trop faible concentration d'acide clavulanique. Au total, les 7 erreurs de catégorisations de cette étude sont survenues avec deux antibiotiques du panel : la fosfomycine dont le seuil nécessite une incrémentation de nouvelles données afin d'être plus discriminant et l'amoxicilline-acide clavulanique connue pour sa difficulté de catégorisation (75).

Ces résultats sont cependant à nuancer en raison du faible nombre de souches étudiées ($n < 40$ pour 4 des 6 antibiotiques expérimentés) et des taux de résistance, du moins pour certains des antibiotiques testés. Les tests effectués vis-à-vis de la nitrofurantoïne et du mécillinaam ont effectivement montré un accord de catégorie de 100% mais seules deux souches résistantes ont été étudiées pour chacun de ces deux antibiotiques. Concernant la nitrofurantoïne, la faible prévalence de *E. coli* résistants en France n'a pas permis d'inclure un nombre plus conséquent de souches résistantes dans ce travail. Concernant le mécillinaam, 15

souches initialement catégorisées résistantes avaient été incluses (13 testées par BMD et 2 issues du panel complémentaire testées par E-test). Cependant, lors de la comparaison des résultats obtenus en SdFFF avec ceux issus du BMD, 13 VME ont été constatées. Les deux souches résistantes correctement catégorisées en SdFFF étaient celles testées via E-test. Devant les courbes plates obtenues en SdFFF, des E-tests ont été effectués afin de confirmer que les souches résistantes étaient correctement catégorisées par BMD. Les résultats obtenus par la méthode du gradient de diffusion (E-test) étaient discordants avec le BMD pour 10 des 13 souches et donc concordants avec les catégorisations obtenues par SdFFF, corrigeant ainsi 10 des 13 VME. En ce qui concerne les trois souches discordantes, elles ont été testées de la même façon qu'en routine c'est-à-dire via VITEK®2 et disques et ont présenté des divergences majeures de CMI mais également de catégorisation clinique selon la technique utilisée (Tableau 6). Cette mauvaise classification initiale pourrait être due à l'utilisation du BMD qui n'est pas la méthode de référence. En effet, la méthode de référence recommandée dans le CA-SFM est la dilution en milieu gélosé (76). Celle-ci implique de couler des géloses au laboratoire contenant une quantité croissante d'antibiotique et de compter le nombre de colonies capables de croître aux différentes concentrations d'antibiotique. La complexité de cette méthode mène donc les équipes de recherche à utiliser des alternatives dont les données de corrélation sont limitées. Néanmoins, Plambeck et *al.* ont montré une excellente corrélation de la CMI entre la dilution en milieu gélosé et la méthode du disque sur presque 400 souches d'*Enterobacterales* dont 200 souches de *E. coli*. Aucune erreur de catégorisation clinique n'a été mise en évidence avec la méthode du disque qui semble donc à privilégier (77). Compte tenu du diamètre de nos trois souches discordantes, extrêmement proches du diamètre critique de 15mm (13 mm pour l'une et 14 mm pour les deux autres), il conviendrait de répéter la technique de la méthode du disque, de faire une moyenne et de comparer la catégorisation clinique à celle obtenue en SdFFF. Ces discordances de catégorisation clinique illustrent la difficulté de classification des souches vis-à-vis du mécilinam. Celle-ci peut être consécutive à la capacité de réversion de la résistance lors de la modification du milieu de culture (quantité de cystéine, osmolalité), pouvant expliquer les discordances entre les différentes techniques usuelles (78,79).

La seconde partie de ce travail a permis d'apporter une preuve de concept de la capacité de la SdFFF à réaliser des antibiogrammes directement à partir d'échantillons d'urines. En effet, les fractogrammes obtenus sans isolement préalable de colonies bactériennes étaient résolutifs et similaires à ceux obtenus lors d'injections réalisées à partir de souches. La seule différence notable était l'augmentation de l'AUC du volume mort, probablement due à la quantité de leucocytes urinaires, qui, du fait de leur taille, se positionnent dans des lignes de flux rapides et sont élués sans être retenus. De plus, les fractogrammes obtenus ont été concordants avec les résultats rendus en routine (VITEK®2), permettant une catégorisation correcte vis-à-vis de l'amoxicilline, de l'amoxicilline-acide clavulanique, de la ciprofloxacine et du triméthoprime-sulfaméthoxazole après 2 heures d'incubation à partir d'un prélèvement urinaire sans étape de ré-isolement.

Ce temps d'incubation semble incompressible car fonction de la bactériurie initiale, de la souche bactérienne elle-même ainsi que de la méthode de conservation de l'échantillon urinaire. Le temps d'incubation est le facteur limitant du délai de rendu de l'antibiogramme, il est crucial de déterminer sa durée minimale afin de permettre un rendu de résultats dans les plus brefs délais. Concernant la bactériurie, elle peut être approximée par un automate de cytométrie en flux tel que l'UF4000, ce qui permettrait d'estimer le temps d'incubation minimal

nécessaire avant l'atteinte de la DO_{600nm} target. Dans ce travail, la DO_{600nm} target de 0,5 a été choisie afin de se situer dans des conditions idéales pour l'injection à partir des premières urines sur la machine de SdFFF. Cependant, celle-ci pourrait être abaissée compte tenu des fractogrammes interprétables obtenus pour des souches bactériennes présentant une DO_{600nm} après 2 heures d'incubation comprise entre 0,35 et 0,5. Une comparaison des fractogrammes de souches présentant différentes DO_{600nm} pourrait à l'avenir être effectuée dans le but d'affiner ce seuil cible, ce qui permettrait de raccourcir le temps nécessaire à la réalisation de l'antibiogramme. L'automate de cytométrie UF4000 est susceptible de jouer un double rôle en orientant également sur le caractère Gram positif ou Gram négatif du germe causal de l'ITU. Lors d'une utilisation de la SdFFF en routine, l'identification de la bactérie sera inconnue *a priori* motivant la recherche de méthodes permettant une obtention précoce de l'identification ou une approximation de celle-ci afin de ne pas allonger le délai de rendu de résultats. Cette identification est nécessaire car bien que *E. coli* et les *Enterobacterales* soient les bactéries les plus fréquemment impliquées dans les ITU, d'autres bactéries peuvent être mises en cause. Celles-ci possèdent des breakpoint cliniques différents pouvant modifier la catégorisation clinique, il est donc nécessaire d'avoir cette information avant le rendu de l'antibiogramme. L'attente de l'identification, classiquement obtenue après la culture bactérienne, allonge le délai de rendu du résultat de l'antibiogramme nécessitant des techniques d'identification rapide pour conserver l'avantage de temps des RAST. La coloration de Gram peut également être envisagée mais sa sensibilité est faible : de l'ordre de 10^5 UFC/mL (80). Une autre option qui semble prometteuse est le spectromètre de masse MALDI-TOF qui identifierait la bactérie majoritaire directement à partir de l'échantillon urinaire comme c'est le cas pour les hémocultures positives avec le kit Sepsityper (81,82). Ces différentes techniques pourront également alerter sur la pluralité des microorganismes contenus dans l'urine (urines polymicrobiennes), pour lesquels la catégorisation est impossible à ce jour mais sera étudiée lors de prochains travaux.

Ce travail a aussi montré que le mode de conservation de l'échantillon urinaire était primordial compte tenu de l'impact du borate sur la croissance bactérienne. En effet, lors de l'analyse des conditions pré-analytiques, les urines conservées en milieu boraté ont présenté une croissance bactérienne plus faible que celles conservées en pot stérile. Cela a eu pour conséquence un temps d'incubation accru, et donc un allongement du délai de rendu de l'antibiogramme. Cette lenteur de répllication bactérienne est due à l'effet bactériostatique du borate utilisé en routine pour permettre une plus grande flexibilité pré-analytique de l'ECBU (83). Il est cependant à noter que l'action du borate est limitée dans le temps et s'estompe après 24 heures, entraînant une augmentation notable de la bactériurie après ce délai de stockage (84). Cette notion pourrait expliquer que les urines conservées en tubes boratés et stockées à température ambiante plus de 24 heures avant leur utilisation soient parvenues à atteindre des DO_{600nm} compatibles avec l'obtention d'un fractogramme interprétable après seulement deux heures d'incubation. La majorité des urines étant conservées en tube boraté, il sera nécessaire à l'avenir d'adapter le temps d'incubation ou bien de modifier les pratiques de prélèvement lorsqu'un rendu de résultat rapide sera nécessaire.

Compte tenu de ces différentes données, la SdFFF semble être une méthode prometteuse encore aux prémices du processus de développement. Afin d'être commercialisée, sa standardisation est cruciale et passe par le développement d'un prototype. Celui-ci permettra l'automatisation du processus et les premiers essais en conditions réelles de laboratoire. Les résultats des différentes études menées jusqu'à présent constituent des informations indispensables à son optimisation. Les erreurs de catégorisation, en partie

évitables, ont conduit à imaginer trois contrôles qualités qui pourront être implémentés dans le prototype. Un premier contrôle qualité pourrait porter sur la DO_{600nm} obtenue pour la souche contrôle après incubation. Celle-ci représente la croissance bactérienne et doit être de 0,35 *a minima* pour que le pic représentant la population bactérienne possède une amplitude suffisamment élevée pour permettre sa comparaison. Le second contrôle qualité pouvant améliorer les résultats porte sur l'analyse de la résolution des fractogrammes. En effet, un fractogramme non suffisamment résolutif est susceptible d'engendrer des erreurs de catégorisation comme cela a été le cas pour la souche DAM-EC081 vis-à-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique. Cette piste est actuellement étudiée avec l'utilisation d'une intelligence artificielle permettant d'analyser le fractogramme obtenu pour la souche contrôle et déterminant le caractère résolutif du pic bactérien. Un troisième contrôle qualité pourrait porter sur l'analyse des AUC des différents volumes morts qui doivent être comparables pour une même souche bactérienne. En effet, un problème technique comme l'addition de la mauvaise quantité de bactéries ou une erreur de centrifugation pourrait entraîner une perte du culot bactérien à l'origine de la diminution du volume mort et de la population bactérienne. En cas de variation importante de l'AUC du volume mort, les différents pics du fractogramme ne peuvent pas être comparés, au risque de conduire à un $P\Delta AUC$ faussement effondré menant à une VME. Ce contrôle peut également être intégré à l'analyse par intelligence artificielle, cependant lors de l'automatisation de la méthode, ce type d'erreur devrait disparaître.

La SdFFF présente des avantages majeurs dont les trois principaux sont : le temps de réalisation de l'analyse, la facilité d'utilisation de l'appareil et enfin le coût estimé par échantillon. Le délai de rendu du résultat de l'antibiogramme est le plus gros atout de la SdFFF, il sera inférieur à 3 heures pour les souches bactériennes isolées et reste à déterminer pour les échantillons primaires. En effet, il sera fonction du temps d'incubation nécessaire et donc de la bactériurie et du mode de conservation. Néanmoins, la preuve de concept a été effectuée avec seulement deux heures d'incubation, laissant présager de la possibilité d'un rendu de résultat en 3 heures dès réception de l'échantillon urinaire au laboratoire pour les bactériuries supérieures à 10^6 UFC/mL (à condition d'obtenir dans ce délai une identification du pathogène). Actuellement, plusieurs étapes sont manuelles et demandent un temps technique important. Lors de l'automatisation future de la technique en lien avec la start-up DAMOCLES Diagnostics, toutes les étapes manuelles seront effectuées par l'automate. La réalisation d'antibiogrammes par SdFFF ne nécessitera donc pas de main d'œuvre qualifiée. Cette facilité d'utilisation est un avantage non négligeable compte tenu de la multiplicité des techniques présentes au sein des laboratoires de biologie médicale. Enfin, l'antibiogramme par SdFFF est peu onéreux grâce au faible nombre de consommables nécessaires (PBS de la phase mobile et antibiotiques lyophilisés). Il est estimé à l'heure actuelle aux alentours des 10 euros par antibiogramme contre 9 à 20 euros pour les méthodes conventionnelles (45). L'utilisation de la SdFFF en routine dans un laboratoire d'analyse médicale n'engendrerait donc pas de dépassement, le coût d'un ECBU à la nomenclature des actes de biologie médicale étant actuellement de 15 euros. Au total, l'automatisation de la technique devrait permettre de rendre un antibiogramme en moins de 3 heures. Ce temps comprendrait la préparation automatisée des échantillons, le temps d'incubation, les injections qui seront multiplexées, le temps d'élution ainsi que le temps d'analyse par l'intelligence artificielle. Ce délai de rendu de résultat est un atout considérable pour la SdFFF. Au vu de ses nombreux avantages, la SdFFF semble pouvoir rentrer d'ici quelques années dans la routine diagnostique à grande échelle. En effet, en comparaison à la méthode de référence, la SdFFF permettrait de gagner un temps

considérable sur le rendu des résultats de l'antibiogramme qui seraient potentiellement disponibles dès 3 heures à partir d'un échantillon d'urine contre 36 à 48 heures avec les méthodes conventionnelles, soit un gain de temps de presque 40 heures. La précocité des résultats permettrait alors d'adapter le traitement antibiotique du patient dans les meilleurs délais ou, dans les cas les plus favorables, d'éviter l'utilisation d'un traitement probabiliste à large spectre.

Cependant, comme toute technique, la SdFFF présente quelques limites qui sont en cours d'amélioration telles que l'absence de catégorisation SFP et l'incapacité de fournir des CMI. Concernant la catégorisation en zone SFP, elle est importante afin de conserver un arsenal thérapeutique le plus large possible. Des essais supplémentaires sont prévus sur des souches de *E. coli* présentant une CMI à 16 mg/L vis-à-vis de la témocilline (zone SFP) afin de déterminer si un profil particulier de fractogramme permet de catégoriser ces souches bactériennes. L'absence de CMI peut également être un inconvénient même si dans le contexte des ITU, cette donnée ne semble pas indispensable. En effet, les CMI demandées par les médecins portent majoritairement sur les souches isolées d'hémocultures ou d'autres prélèvements profonds et exceptionnellement sur celles issues d'ECBU. Elles sont utiles en cas de nécessité d'adaptation thérapeutique dans des contextes de choc septiques ou de patients fragiles (neurolésés par exemple) et requièrent une précision importante motivant des tests secondaires tels que les bandelettes E-test. Dans un contexte de cystite, une demande de CMI est rarissime et n'est qu'une aide à l'interprétation de certains phénotypes de résistance. La méthode développée dans ce travail est une technique dite qualitative, capable uniquement de catégoriser une souche sensible ou résistante vis-à-vis de l'antibiotique testé. Un seul test RAST est capable de rendre des CMI directement à partir d'urines, il est développé par iFast et n'est pas encore disponible sur le marché européen, une autorisation de mise sur le marché britannique est attendue fin 2024. Cependant, concernant la SdFFF, la valeur du $P\Delta AUC$ semble être corrélée à la CMI. Les souches résistantes dont la CMI est élevée envers l'antibiotique testé semblent fournir des fractogrammes traités superposés au fractogramme contrôle avec une AUC similaire et donc un $P\Delta AUC$ très faible voir négatif. En revanche, plus la CMI est basse et se rapproche du breakpoint, plus l'AUC est faible et donc plus le $P\Delta AUC$ est important. Cette constatation qui doit être vérifiée statistiquement pour chaque antibiotique sur une population plus conséquente de souches bactériennes et d'antibiotiques, ouvre la voie à une potentielle évaluation calculée de la CMI, à l'image des résultats issus d'un Vitek®2.

La SdFFF semble avoir toute sa place sur le marché des RAST dans la mesure où la seule méthode réalisable directement à partir d'urines est l'Alfred60 AST, les méthodes iFast AST et PA-100 AST n'étant pas encore commercialisées. L'Alfred60 AST, première méthode applicable aux urines à avoir obtenu le marquage CE-IVD, a été testée en conditions réelles par Potvin et *al.* sur des échantillons sanguins dont les résultats sont transposables aux urines (actuellement aucune étude clinique concernant les urines). Ces données ont montré que la technique développée par AliFax est capable de rendre un antibiogramme en 4 à 6 heures, soit une augmentation du délai de rendu de 1 à 3 heures par rapport aux objectifs de la SdFFF. De plus, une augmentation des coûts de 38% a été signalée lors de l'utilisation de l'Alfred60 AST avec un prix par antibiogramme estimé à 31 euros (85). La SdFFF présente l'avantage d'être plus rapide et trois fois moins coûteuse, en faisant un concurrent potentiel à la technologie développée par AliFax. Concernant le système PA-100 AST, une première évaluation clinique montrant sa capacité à fournir un antibiogramme en 45 minutes a été effectuée par Alonso Tarrès et *al.* récemment (86). Celle-ci a été pratiquée au point de service,

c'est-à-dire, au niveau du lieu même du prélèvement (par exemple au cabinet du médecin généraliste). Cette méthode qualitative a été testée sur 278 urines et a montré un accord de catégorie prometteur de 94,6%. En revanche, sa faible sensibilité, allant de 75 à 96,3% selon l'antibiotique étudié, rend cette technique incompatible avec la norme ISO 20776-2. De plus, le prix de cette méthode n'a pas été communiqué mais sera probablement élevé compte tenu de l'optique haute résolution nécessaire afin de visualiser la pousse bactérienne le plus rapidement possible. La SdFFF, bien que moins rapide semble plus fiable et moins coûteuse. Enfin, en ce qui concerne la technique de l'entreprise iFast Diagnostics, elle présente l'avantage par rapport aux deux méthodes sus-citées d'être en mesure de fournir une CMI vis-à-vis des antibiotiques testés. Cette méthode est basée sur les modifications des propriétés électriques des cellules bactériennes. Elle vise à pouvoir réaliser un antibiogramme en moins de 3 heures pour un prix estimé à 23 euros/échantillon. L'obtention du marquage CE-IVD est envisagée dès 2025 après des études complémentaires (87).

Dans ce contexte, la SdFFF semble posséder tous les atouts pour atteindre le marché des RAST et prétendre à l'acquisition du marquage CE-IVD en ce qui concerne l'antibiogramme urinaire à partir de souches isolées. L'adaptation à la matrice urinaire nécessite de plus amples études mais des résultats encourageants ont été obtenus. Plusieurs questions restent en suspens et ouvrent la voie à de nouveaux travaux : le temps d'incubation des urines boratés, la possibilité d'analyse des faibles bactériuries et des urines polymicrobiennes. La méthode de SdFFF est vouée à s'améliorer, dans l'optique qu'un jour, celle-ci permette une amélioration de la prise en charge du patient ainsi que la préservation de l'écologie microbienne.

Conclusion

Le besoin d'avancées technologiques en termes de diagnostic rapide de la sensibilité aux antimicrobiens a conduit à la conception de ce travail. Celui-ci comportait deux objectifs principaux. Le premier était de démontrer la capacité de la SdFFF à rendre un antibiogramme urinaire rapide et fiable. Le second était d'apporter la preuve de concept de la détection par la SdFFF de changements morphologiques précoces induits par les antibiotiques directement à partir d'échantillons urinaires primaires sans étape de ré-isolément des souches bactériennes.

Cette étude a rempli son premier objectif avec l'obtention de résultats très prometteurs vis-à-vis de 6 antibiotiques communément utilisés dans les ITU. Un accord de catégorie de 97,3% a été démontré entre la SdFFF et la méthode de référence sur 261 couples souche-antibiotique. Celui-ci est largement supérieur à celui recommandé par le CLSI (90%) et tend à être encore plus important à l'avenir grâce à l'ajout de contrôles qualité et à l'amélioration du seuil concernant la fosfomycine. Le second objectif visant à obtenir la preuve de concept de la possibilité d'effectuer un antibiogramme par SdFFF à partir d'échantillons urinaires a également été atteint. Trois échantillons urinaires ont été testés et ont montré une concordance totale avec la méthode de référence.

La fiabilité de l'antibiogramme urinaire obtenu par SdFFF combiné à son court délai de rendu de résultat et son faible coût en font un excellent candidat à l'intégration dans le flux du laboratoire pour l'analyse des ECBU. Ses performances et sa technique novatrice font de la SdFFF un réel concurrent aux autres techniques rapides dont les délais de rendu et les coûts engendrés sont peu compatibles avec leur intégration dans un flux de routine pour les échantillons urinaires. De plus, les performances issues de cette étude sont compatibles avec l'obtention du marquage CE-IVD, qui permettrait la commercialisation de la SdFFF sur le marché européen.

Plusieurs défis restent à relever avant la mise sur le marché. Concernant l'antibiogramme urinaire à partir des souches bactériennes, il est nécessaire de tester un nombre plus important d'isolats afin d'optimiser les différents seuils décisionnels dans le but d'améliorer le pouvoir discriminant de la technique et par conséquent, la catégorisation clinique. Puis, à partir de ceux-ci, des souches devront être testées « à l'aveugle » afin de déterminer la fiabilité de la méthode. Enfin, des tests inter-laboratoires devront être effectués. Concernant les urines, la preuve de concept a été établie mais la méthode est encore aux prémices de son développement. De nombreux obstacles restent encore à franchir tels que la modification des étapes pré-analytiques, la durée d'incubation selon la bactériurie, l'association à des tests d'identification rapide ainsi que le caractère polymicrobien des échantillons urinaires.

Pour conclure, la SdFFF pourrait à l'avenir être implémentée dans la routine de prise en charge des ECBU. Son instauration serait un atout majeur dans le parcours de soin, tant du patient hospitalisé que du patient ambulatoire, en permettant l'instauration d'emblée d'un antibiotique spécifique et efficace. L'impact serait d'autant plus grand sur les pyélonéphrites dont l'apparition de complications est prévenue par la précocité d'instauration d'une antibiothérapie efficace. Cette avancée technologique permettrait également de préserver l'écologie microbienne, enjeu crucial du XXI^{ème} siècle.

Références bibliographiques

1. Bentley R, Bennett JW. What is an antibiotic? Revisited. *Adv Appl Microbiol.* 2003;52:303-31.
2. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *J Invest Surg.* 22 mars 2012;25(2):67-77.
3. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* oct 2019;51:72-80.
4. CHABAUD A, MEYER S, PLOY MC. Encyclopædia Universalis. 2021 [cité 8 juill 2024]. ANTIBIOTIQUES. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/antibiotiques/>
5. Universalis E. Encyclopædia Universalis. 2021 [cité 16 juin 2024]. ANTIBIOTIQUES : Principales classes d'antibiotiques. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/antibiotiques/3-principales-classes-d-antibiotiques/>
6. Rogez S. Google Docs. [cité 16 juin 2024]. Bactériologie : antibiotiques 3ème année pharmacie. Disponible sur: https://docs.google.com/document/d/0BwFY3GH8qxtCM0N1NDROVTIFdU0/edit?usp=drive_web&oid=110540277091138613387&resourcekey=0-cQI1N6VQ6xLlo68id_joPA&rtpof=true&usp=embed_facebook
7. Institut Pasteur [Internet]. 2017 [cité 16 juin 2024]. Résistance aux antibiotiques : une chronologie inattendue. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/resistance-aux-antibiotiques-chronologie-inattendue>
8. Geddes AM, Klugman KP, Rolinson GN. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int J Antimicrob Agents.* déc 2007;30 Suppl 2:S109-112.
9. Ouvrage du Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales. E. PILLY Maladies Infectieuses et Tropicales. 27ème édition. 2020.
10. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2015;21(10):899-905.
11. HAS : Commission de la Transparence NEGABAN - 01 avril 2015 [Internet]. [cité 16 juin 2024]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-14132_NEGABAN_PIC_INS_Avis2_CT14132.pdf
12. SIMON M. Cours Pharmacie. 2008 [cité 17 juin 2024]. Réplication de l'ADN. Disponible sur: <https://www.cours-pharmacie.com/biologie-moleculaire/replication-de-ladn.html>
13. Bianchi V, El Anbassi S. Médicament. 2ème édition. (Deboeck).
14. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* juin 2010;8(6):423-35.
15. Muller AE, Verhaegh EM, Harbarth S, Mouton JW, Huttner A. Nitrofurantoin's efficacy and safety as prophylaxis for urinary tract infections: a systematic review of the literature and

- meta-analysis of controlled trials. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juin 2017;23(6):355-62.
16. Squadrito FJ, del Portal D. Nitrofurantoin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 18 juin 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470526/>
 17. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One.* 2012;7(4):e34953.
 18. Résistance aux antibiotiques [Internet]. [cité 19 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
 19. Comprendre les enjeux - Pour les usagers - GILAR [Internet]. [cité 9 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.gilar.org/fr/comprendre-les-enjeux.html>
 20. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis.* août 2014;14(8):742-50.
 21. Antimicrobial resistance (AMR) [Internet]. [cité 19 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.healthdata.org/research-analysis/health-risks-issues/antimicrobial-resistance-amr>
 22. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet.* févr 2022;399(10325):629-55.
 23. Répias, Mission SPARES. Surveillance de la consommation d'antibiotiques et de résistances bactériennes en établissements de santé - Résultats 2022. 2024.
 24. Inserm [Internet]. [cité 19 juin 2024]. Résistance aux antibiotiques · Inserm, La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/>
 25. AMARA M, AUBIN G, CARON F, CATTOIR V, DORTET L, GOUTELLE S, et al. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Recommandations 2023 V.1.0 Juin.
 26. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* avr 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
 27. Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. [cité 19 juin 2024]. Bêta-lactamines - Maladies infectieuses. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bactéries-et-médicaments-antibactériens/bêta-lactamines>
 28. Pantel A. Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131.
 29. HERA factsheet - HEALTH UNION: Identifying top 3 priority health threats - European Commission [Internet]. [cité 23 juin 2024]. Disponible sur: https://health.ec.europa.eu/publications/hera-factsheet-health-union-identifying-top-3-priority-health-threats_en

30. OMSA - Organisation mondiale de la santé animale [Internet]. [cité 22 juin 2024]. Une seule santé. Disponible sur: <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/initiatives-mondiales/une-seule-sante/>
31. Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire. Plan national Ecoantibio 3 : réduire les risques d'antibiorésistance et promouvoir le bon usage des antimicrobiens en médecine vétérinaire. 2023.
32. Résistance aux antibiotiques [Internet]. [cité 22 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
33. Bianchi V, El Anbassi S, Duployez C. Bactériologie-Virologie. DeBoeck; (Prépa pharma).
34. KOT B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic Escherichia coli. *Pol J Microbiol.* déc 2019;68(4):403-15.
35. Molecular Factors and Mechanisms Driving Multidrug Resistance in Uropathogenic Escherichia coli—An Update - PMC [Internet]. [cité 29 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9407594/>
36. Rigsby RE, Fillgrove KL, Beihoffer LA, Armstrong RN. Fosfomycin Resistance Proteins: A Nexus of Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolases in a Metalloenzyme Superfamily. In: Sies H, Packer L, éditeurs. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2005 [cité 27 juin 2024]. p. 367-79. (Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases; vol. 401). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687905010232>
37. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 1995;39(2):279-89.
38. SPF. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en soins de ville et en établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes. Mission Primo : Résultats 2022 [Internet]. [cité 1 août 2024]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/surveillance-de-la-resistance-bacterienne-aux-antibiotiques-en-soins-de-ville-et-en-etablissements-d-hebergement-pour-personnes-agees-dependantes>
39. SPF. Surveillance de la consommation des antibiotiques et des résistances bactériennes en établissement de santé. Mission Spares. Résultats synthétiques, année 2022 [Internet]. [cité 19 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/surveillance-de-la-consommation-des-antibiotiques-et-des-resistances-bacteriennes-en-etablissement-de-sante.-mission-s pares.-resultats-synthetiques>
40. Tabasi M, Karam MRA, Habibi M, Mostafavi E, Bouzari S. Genotypic Characterization of Virulence Factors in Escherichia coli Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *J Clin Diagn Res JCDR.* déc 2016;10(12):DC01-7.
41. SPILF. DIAGNOSTIC ET ANTIBIOTHERAPIE DES INFECTIONS URINAIRES BACTERIENNES COMMUNAUTAIRES DE L'ADULTE. 2015.
42. DENIS F, PLOY MC, MARTIN C, CATTOIR V. Bactériologie médicale - Techniques usuelles. 3ème édition. Elsevier Masson;

43. Sladana P. Antibiogrammes ciblés pour les infections urinaires à Entérobactéries dans la population féminine adulte (à partir de 12 ans). 2023;
44. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cité 25 mai 2024]. Choix et durée de l'antibiothérapie : Cystite aiguë simple, à risque de complication ou récidivante, de la femme. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2722827/fr/choix-et-duree-de-l-antibiotherapie-cystite-aigue-simple-a-risque-de-complication-ou-recidivante-de-la-femme
45. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 déc 2009;49(11):1749-55.
46. Patrice COURVALIN RL. Antibiogramme. 3ème édition.
47. van Belkum A, Burnham CAD, Rossen JWA, Mallard F, Rochas O, Dunne WM. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol*. mai 2020;18(5):299-311.
48. eucast: fichiers d'étalonnage [Internet]. [cité 13 août 2024]. Disponible sur: <https://www.eucast.org/rapid-ast-in-bloodcultures/calibration-files>
49. Masson E. EM-Consulte. [cité 13 août 2024]. Impact clinique de l'antibiogramme rapide MHR-SIR (i2a) directement à partir des urines. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1291730/impact-clinique-de-l-antibiogramme-rapide-mhr-sir>
50. Charnot-Katsikas A, Tesic V, Love N, Hill B, Bethel C, Boonlayangoor S, et al. Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. *J Clin Microbiol*. 26 déc 2017;56(1):e01166-17.
51. Doern CD. The Slow March toward Rapid Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing: Are We There Yet? *J Clin Microbiol*. 26 mars 2018;56(4):e01999-17.
52. QuickMIC® [Internet]. Gradientech. [cité 8 juill 2024]. Disponible sur: <https://gradientech.se/quickmic/>
53. Cupaiolo R, Cherkaoui S, Serrano G, Dauby N, Georgala A, Blumental S, et al. Antimicrobial susceptibility testing determined by Alfred 60/AST (Alifax®) in a multi-sites lab: performance's evaluation and optimization of workflow. *J Microbiol Methods*. mars 2022;194:106433.
54. Spencer DC, Paton TF, Mulroney KT, Inglis TJJ, Sutton JM, Morgan H. A fast impedance-based antimicrobial susceptibility test. *Nat Commun*. 21 oct 2020;11(1):5328.
55. bioMérieux France [Internet]. [cité 4 juill 2024]. VITEK® REVEAL™. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/fr/diagnostic-clinique/vitekr-reveal>
56. Lim SH, Mix S, Xu Z, Taba B, Budvytiene I, Berliner AN, et al. Colorimetric sensor array allows fast detection and simultaneous identification of sepsis-causing bacteria in spiked blood culture. *J Clin Microbiol*. févr 2014;52(2):592-8.
57. Sysmex. How to perform real-time Antimicrobial Susceptibility Testing (AST). 2022.
58. Détails du produit Sysmex [Internet]. [cité 12 août 2024]. Disponible sur: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/pa-100-ast-system/>

59. Silva-Dias A, Pérez-Viso B, Martins-Oliveira I, Gomes R, Rodrigues AG, Cantón R, et al. Evaluation of FASTinov Ultrarapid Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. 59(10):e00544-21.
60. Sturm A, Józwiak G, Verge MP, Munch L, Cathomen G, Vocat A, et al. Accurate and rapid antibiotic susceptibility testing using a machine learning-assisted nanomotion technology platform. *Nat Commun*. 18 mars 2024;15(1):2037.
61. Correa-Martínez CL, Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) and AmpC β -Lactamases in Enterobacterales: Development of a Screening Panel Using the MALDI-TOF MS-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. *Front Microbiol*. 2019;10:13.
62. Novikov A, Sayfutdinova A, Botchkova E, Kopitsyn D, Fakhrullin R. Antibiotic Susceptibility Testing with Raman Biosensing. *Antibiotics*. 14 déc 2022;11(12):1812.
63. Avesar J, Rosenfeld D, Truman-Rosentsvit M, Ben-Arye T, Geffen Y, Bercovici M, et al. Rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing using nanoliter arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 juill 2017;114(29):E5787-95.
64. Baltekin Ö, Boucharin A, Tano E, Andersson DI, Elf J. Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 août 2017;114(34):9170-5.
65. La F.F.F. - Technique de Fractionnement par Couplage Flux – Force [Internet]. [cité 5 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/2000/49fff.htm>
66. Giordani S, Marassi V, Placci A, Zattoni A, Roda B, Reschiglian P. Field-Flow Fractionation in Molecular Biology and Biotechnology. *Molecules* [Internet]. sept 2023 [cité 4 juill 2024];28(17). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10488451/>
67. GAUTHIER A. Étude de la méthode de Fractionnement par couplage Flux-Force de Sédimentation comme nouvelle technique d'antibiogramme rapide. Université de Limoges; 2023.
68. Contado C. Field flow fractionation techniques to explore the « nano-world ». *Anal Bioanal Chem*. avr 2017;409(10):2501-18.
69. Reschiglian P, Zattoni A, Roda B, Michelini E, Roda A. Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends Biotechnol*. sept 2005;23(9):475-83.
70. Saenton S, Lee H, GAO YS, Ranville J, WILLIAMS S. Evaluation of Different Field-Flow Fractionation Techniques for Separating Bacteria. *Sep Sci Technol - SEPAR SCI TECHNOL*. 10 janv 2000;35:1761-75.
71. Bégaud-Grimaud G, Battu S, Liagre B, Léger DY, Beneytout JL, Cardot PJP. Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation. The effect of channel thickness on sorting performance. *J Chromatogr A*. 22 sept 2006;1128(1-2):194-202.
72. Gauthier A, Tlili L, Battu S, Delebassée S, Duval RE, Cardot PJP, et al. Sedimentation Field-Flow Fractionation: A Diagnostic Tool for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing. *Anal Chem*. 21 nov 2023;95(46):16950-7.

73. Gauthier A, Tlili L, Battu S, Le Moan C, Ploy MC, Lalloue F, et al. Sedimentation field-flow fractionation for rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing: a pilot study. *J Antimicrob Chemother.* 3 juin 2024;79(6):1450-5.
74. Tlili L, Gauthier A, Delagnes C, Battu S, Begaud G, Barraud O. Rapid antimicrobial susceptibility testing by SdFFF directly from positive blood cultures (ESCMID 2024). *ESCMID 2024*; 2024.
75. Soares A, Pestel-Caron M, Leysour de Rohello F, Bourgoïn G, Boyer S, Caron F. Area of technical uncertainty for susceptibility testing of amoxicillin/clavulanate against *Escherichia coli*: analysis of automated system, Etest and disk diffusion methods compared to the broth microdilution reference. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2020;26(12):1685.e1-1685.e6.
76. Vong O. ? Les nouvelles recommandations du CA-SFM sont arrivées ! [Internet]. Société Française de Microbiologie. 2023 [cité 19 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/2023/06/02/le-nouveau-communique-du-ca-sfm-juin2023/>
77. Plambeck L, Fuchs F, Sattler J, Hamprecht A. In vitro activity of mecillinam, temocillin and nitroxoline against MDR Enterobacterales. *JAC-Antimicrob Resist.* 16 juin 2022;4(3):dlac059.
78. Frimodt-Moller N. Mecillinam – Reversion of Resistance and How to Test It. *EBioMedicine.* 26 août 2017;23:4-5.
79. Thulin E, Thulin M, Andersson DI. Reversion of High-level Mecillinam Resistance to Susceptibility in *Escherichia coli* During Growth in Urine. *EBioMedicine.* 24 août 2017;23:111-8.
80. SFM, SFMM, SFP. Référentiel en microbiologie Médicale 7ème édition 2022 (Rémic 7.1) [Internet]. Société Française de Microbiologie. [cité 21 août 2024]. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/boutique/remic-v7-2022/>
81. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2011;17(7):1007-12.
82. Sánchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregón F, Criado González M, Hernández Egido S, de Frutos Serna M, et al. Pretreatment of Urine Samples with SDS Improves Direct Identification of Urinary Tract Pathogens with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* janv 2014;52(1):335-8.
83. Lum KT, Meers PD. Boric acid converts urine into an effective bacteriostatic transport medium. *J Infect.* janv 1989;18(1):51-8.
84. Daley P, Gill Y, Midodzi W. Comparison of clinical performance of commercial urine growth stabilization products. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 nov 2018;92(3):179-82.
85. Potvin M, Larranaga Lapique E, Hites M, Martiny D. Implementing Alfred60AST in a clinical lab: Clinical impact on the management of septic patients and financial analysis. *Ann Pharm Fr.* mai 2023;81(3):466-74.

86. Alonso-Tarrés C, Benjumea Moreno C, Navarro F, Habison AC, González-Bertran E, Blanco F, et al. Bacteriuria and phenotypic antimicrobial susceptibility testing in 45 min by point-of-care Sysmex PA-100 System: first clinical evaluation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. août 2024;43(8):1533-43.
87. IFAST – Test de sensibilité aux antimicrobiens [Internet]. [cité 21 août 2024]. Disponible sur: <https://ifastdiagnostics.com/>

Annexes

Annexe 1. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 37 souches de <i>E. coli</i> testées avec le mécillinam à une concentration de 8 mg/L.....	135
Annexe 2. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 38 souches de <i>E. coli</i> testées avec la témocilline à une concentration de 8 mg/L.....	137
Annexe 3. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence E-test pour les 33 souches de <i>E. coli</i> testées avec le céfixime à une concentration de 1 mg/L.	139
Annexe 4. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 39 souches de <i>E. coli</i> testées avec la nitrofurantoïne à une concentration de 64 mg/L.....	140
Annexe 5. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 46 souches de <i>E. coli</i> testées avec la fosfomycine à une concentration de 8 mg/L.....	142
Annexe 6. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) pour les 68 souches de <i>E. coli</i> testées avec l'amoxicilline-acide clavulanique à une concentration de 32:0,35 mg/L.	144

Annexe 1. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 37 souches de *E. coli* testées avec le mécillinam à une concentration de 8 mg/L.

Souche	PΔR	PΔAUC	AST SdFFF	AST référence	SdFFF vs référence
DAM-EC001	255,88	100,00	S	S	C
DAM-EC003	10,74	47,46	S	S	C
DAM-EC005	2,34	36,95	S	S	C
DAM-EC007	550,00	100,00	S	S	C
DAM-EC010	16,42	64,92	S	S	C
DAM-EC011	29,79	96,73	S	S	C
DAM-EC012	1,66	71,94	S	S	C
DAM-EC013	30,87	85,08	S	S	C
DAM-EC014	10,36	23,70	S	S	C
DAM-EC014	2,83	38,60	S	S	C
DAM-EC021	13,79	100,00	S	S	C
DAM-EC023	5,59	38,75	S	S	C
DAM-EC024	39,62	52,05	S	S	C
DAM-EC026	1,52	52,34	S	S	C
DAM-EC027	18,88	78,48	S	S	C
DAM-EC028	38,53	21,25	S	S	C
DAM-EC031	1,13	57,35	S	S	C
DAM-EC032	3,68	73,45	S	S	C
DAM-EC033	13,25	54,52	S	S	C
DAM-EC034	18,97	76,65	S	S	C
DAM-EC043	23,63	24,89	S	S	C
DAM-EC046	14,98	75,46	S	S	C
DAM-EC052	1,36	56,37	S	S	C
DAM-EC053	36,26	30,85	S	S	C
DAM-EC054	4,28	31,62	S	S	C
DAM-EC056	13,92	59,58	S	S	C
DAM-EC057	14,26	48,40	S	S	C
DAM-EC062	12,32	50,24	S	S	C
DAM-EC063	20,41	70,19	S	S	C
DAM-EC069	14,53	39,96	S	S	C
DAM-EC070	19,73	67,77	S	S	C
DAM-EC073	14,09	78,12	S	S	C
DAM-EC077	11,04	64,99	S	S	C
DAM-EC098	14,60	65,52	S	S	C
DAM-EC099	6,56	42,92	S	S	C
DAM-EC102	37,63	50,00	S	S	C
DAM-EC102	32,21	33,94	S	S	C
DAM-EC082	26,63	3,38	R	R	C
DAM-EC092	0,76	1,43	R	R	C

DAM-EC091	4,65	41,66	S	S	C
DAM-EC091	3,56	54,01	S	S	C

* Avec $P\Delta R$: pourcentage de variation du facteur de rétention ; $P\Delta AUC$: pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ; S : sensible ; R : résistant ; C : concordant et NF : non fait.

Annexe 2. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 38 souches de *E. coli* testées avec la témocilline à une concentration de 8 mg/L.

Souche	PΔR	PΔAUC	AST SdFFF	AST référence	SdFFF vs référence
DAM-EC001	201,13	100,00	S	S	C
DAM-EC003	20,92	95,47	S	S	C
DAM-EC005	631,75	100,00	S	S	C
DAM-EC007	560,00	100,00	S	S	C
DAM-EC010	846,97	100,00	S	S	C
DAM-EC011	661,33	100,00	S	S	C
DAM-EC012	436,07	100,00	S	S	C
DAM-EC013	83,05	100,00	S	S	C
DAM-EC014	522,22	100,00	S	S	C
DAM-EC023	913,85	100,00	S	S	C
DAM-EC024	409,09	100,00	S	S	C
DAM-EC026	161,19	100,00	S	S	C
DAM-EC027	495,45	100,00	S	S	C
DAM-EC028	337,66	100,00	S	S	C
DAM-EC031	407,46	100,00	S	S	C
DAM-EC032	823,53	100,00	S	S	C
DAM-EC033	409,52	100,00	S	S	C
DAM-EC041	489,16	100,00	S	S	C
DAM-EC043	26,63	8,14	S	S	C
DAM-EC046	118,75	100,00	S	S	C
DAM-EC047	231,31	100,00	S	S	C
DAM-EC052	276,56	100,00	S	S	C
DAM-EC053	171,88	100,00	S	S	C
DAM-EC054	312,31	100,00	S	S	C
DAM-EC056	110,34	100,00	S	S	C
DAM-EC057	606,76	100,00	S	S	C
DAM-EC062	488,02	100,00	S	S	C
DAM-EC063	503,41	100,00	S	S	C
DAM-EC069	528,13	100,00	S	S	C
DAM-EC070	486,89	100,00	S	S	C
DAM-EC073	596,83	100,00	S	S	C
DAM-EC077	504,69	100,00	S	S	C
DAM-EC098	437,14	100,00	S	S	C
DAM-EC100	453,85	100,00	S	S	C
DAM-EC102	6,36	37,01	R	R	C
DAM-EC102	6,30	2,04	R	R	C
DAM-EC116	0,92	-9,41	R	R	C
DAM-EC118	0,43	-2,68	R	R	C
DAM-EC119	2,5	5,32	R	R	C

DAM-EC119	5,31	26,21	R	R	C
-----------	------	-------	---	---	---

* Avec $P\Delta R$: pourcentage de variation du facteur de rétention ; $P\Delta AUC$: pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ; S : sensible ; R : résistant ; C : concordant

Annexe 3. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence E-test pour les 33 souches de *E. coli* testées avec le céfixime à une concentration de 1 mg/L.

Souche	PΔR	PΔAUC	AST SdFFF	AST référence	SdFFF vs référence
DAM-EC001	209,06	100,00	S	S	C
DAM-EC003	184,05	100,00	S	S	C
DAM-EC005	598,48	100,00	S	S	C
DAM-EC007	1,69	-24,20	R	R	C
DAM-EC010	861,54	100,00	S	S	C
DAM-EC011	2,41	-3,93	R	R	C
DAM-EC012	454,24	100,00	S	S	C
DAM-EC014	532,26	100,00	S	S	C
DAM-EC021	435,09	100,00	S	S	C
DAM-EC023	453,16	100,00	S	S	C
DAM-EC024	356,25	100,00	S	S	C
DAM-EC026	168,66	100,00	S	S	C
DAM-EC028	356,25	100,00	S	S	C
DAM-EC031	431,25	100,00	S	S	C
DAM-EC032	748,65	100,00	S	S	C
DAM-EC033	426,23	100,00	S	S	C
DAM-EC041	469,85	100,00	S	S	C
DAM-EC046	125,81	100,00	S	S	C
DAM-EC047	227,63	100,00	S	S	C
DAM-EC052	22,96	-24,50	R	R	C
DAM-EC053	38,52	-42,65	R	R	C
DAM-EC054	339,34	100,00	S	S	C
DAM-EC056	0,81	28,67	R	R	C
DAM-EC057	626,39	100,00	S	S	C
DAM-EC062	488,33	100,00	S	S	C
DAM-EC063	398,75	100,00	S	S	C
DAM-EC069	491,18	100,00	S	S	C
DAM-EC070	468,25	100,00	S	S	C
DAM-EC073	15,84	55,87	R	R	C
DAM-EC077	11,09	90,02	S	S	C
DAM-EC098	0,10	-12,45	R	R	C
DAM-EC100	15,16	97,46	S	S	C
DAM-EC102	4,48	37,79	R	R	C
DAM-EC102	1,61	3,52	R	R	C

* Avec PΔR : pourcentage de variation du facteur de rétention ; PΔAUC : pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ; S : sensible ; R : résistant ; C : concordant

Annexe 4. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 39 souches de *E. coli* testées avec la nitrofurantoïne à une concentration de 64 mg/L.

Souche	PΔR	PΔAUC	AST SdFFF	AST référence	SdFFF vs référence
DAM-EC001	250,57	100,00	S	S	C
DAM-EC003	175,18	100,00	S	S	C
DAM-EC005	7,78	98,46	S	S	C
DAM-EC007	560,00	100,00	S	S	C
DAM-EC010	876,56	100,00	S	S	C
DAM-EC011	739,71	100,00	S	S	C
DAM-EC012	445,00	100,00	S	S	C
DAM-EC013	77,05	100,00	S	S	C
DAM-EC014	542,62	100,00	S	S	C
DAM-EC021	425,86	100,00	S	S	C
DAM-EC023	929,69	100,00	S	S	C
DAM-EC024	416,92	100,00	S	S	C
DAM-EC026	169,23	100,00	S	S	C
DAM-EC027	514,06	100,00	S	S	C
DAM-EC028	426,56	100,00	S	S	C
DAM-EC031	466,67	100,00	S	S	C
DAM-EC032	837,31	100,00	S	S	C
DAM-EC033	453,45	100,00	S	S	C
DAM-EC041	469,85	100,00	S	S	C
DAM-EC043	102,51	100,00	S	S	C
DAM-EC046	129,51	100,00	S	S	C
DAM-EC047	283,08	100,00	S	S	C
DAM-EC052	276,56	100,00	S	S	C
DAM-EC053	46,85	93,08	S	S	C
DAM-EC054	29,12	86,69	S	S	C
DAM-EC056	14,69	92,21	S	S	C
DAM-EC057	680,60	100,00	S	S	C
DAM-EC062	488,33	100,00	S	S	C
DAM-EC063	513,85	100,00	S	S	C
DAM-EC069	538,10	100,00	S	S	C
DAM-EC070	496,67	100,00	S	S	C
DAM-EC073	596,83	100,00	S	S	C
DAM-EC077	524,19	100,00	S	S	C
DAM-EC098	10,75	89,56	S	S	C
DAM-EC100	29,41	94,89	S	S	C
DAM-EC102	96,72	100,00	S	S	C
DAM-EC115	8,53	22,87	R	R	C
DAM-EC114	0,79	12,18	R	R	C
DAM-EC119	22,88	53,2	S	S	C

DAM-EC119	9,02	54,02	S	S	C
-----------	------	-------	---	---	---

* Avec $P\Delta R$: pourcentage de variation du facteur de rétention ; $P\Delta AUC$: pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ; S : sensible ; R : résistant ; C : concordant

Annexe 5. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) ou E-test pour les 46 souches de *E. coli* testées avec la fosfomycine à une concentration de 8 mg/L.

Souche	PΔR	PΔAUC	AST SdFFF	AST référence	SdFFF vs référence
DAM-EC001	250,57	100,00	S	S	C
DAM-EC003	179,54	100,00	S	S	C
DAM-EC005	631,75	100,00	S	R	VME
DAM-EC007	580,95	100,00	S	S	C
DAM-EC010	861,54	100,00	S	S	C
DAM-EC011	752,24	100,00	S	S	C
DAM-EC012	445,00	100,00	S	S	C
DAM-EC013	80,00	100,00	S	S	C
DAM-EC014	542,62	100,00	S	S	C
DAM-EC021	30,35	95,86	R	S	ME
DAM-EC023	929,69	100,00	S	S	C
DAM-EC024	416,92	100,00	S	S	C
DAM-EC026	173,44	100,00	S	S	C
DAM-EC027	514,06	100,00	S	S	C
DAM-EC028	418,46	100,00	S	S	C
DAM-EC031	457,38	100,00	S	S	C
DAM-EC032	851,52	100,00	S	S	C
DAM-EC033	2,19	-45,54	R	R	C
DAM-EC041	489,16	100,00	S	S	C
DAM-EC043	107,73	100,00	S	S	C
DAM-EC046	129,51	100,00	S	S	C
DAM-EC047	283,08	100,00	S	S	C
DAM-EC052	282,54	100,00	S	S	C
DAM-EC053	185,25	100,00	S	S	C
DAM-EC054	339,34	100,00	S	S	C
DAM-EC057	680,60	100,00	S	S	C
DAM-EC062	497,66	100,00	S	S	C
DAM-EC063	533,33	100,00	S	S	C
DAM-EC069	528,13	100,00	S	S	C
DAM-EC070	506,78	100,00	S	S	C
DAM-EC073	585,94	100,00	S	S	C
DAM-EC077	147,25	94,33	R	S	ME
DAM-EC098	461,19	100,00	S	S	C
DAM-EC100	480,65	100,00	S	S	C
DAM-EC102	3,45	35,58	R	R	C
DAM-EC102	5,58	-1,16	R	R	C
DAM-EC103	2,16	-0,60	R	R	C
DAM-EC104	5,65	-18,29	R	R	C
DAM-EC105	2,17	-1,61	R	R	C

DAM-EC106	1,98	-0,29	R	R	C
DAM-EC107	1,61	9,40	R	R	C
DAM-EC108	3,37	4,73	R	R	C
DAM-EC109	6,91	96,15	R	R	C
DAM-EC110	2,13	5,05	R	R	C
DAM-EC111	8,79	78,58	R	R	C
DAM-EC112	2,72	13,82	R	R	C
DAM-EC113	1,59	25,22	R	R	C

* Avec $P\Delta R$: pourcentage de variation du facteur de rétention ; $P\Delta AUC$: pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ; S : sensible ; R : résistant ; C : concordant ; VME : very major error (en rouge) ; ME : major error (en orange)

Annexe 6. Résultats détaillés des AST obtenus en SdFFF et avec la méthode de référence BMD (Sensititre™) pour les 68 souches de *E. coli* testées avec l'amoxicilline-acide clavulanique à une concentration de 32:0,35 mg/L.

Souche	PΔR	PΔAUC	AST SdFFF	AST référence	SdFFF vs référence
DAM-EC001	250,57	100,00	S	S	C
DAM-EC003	15,50	81,48	S	S	C
DAM-EC005	643,55	100,00	S	S	C
DAM-EC007	560,00	100,00	S	S	C
DAM-EC008	64,33	69,04	S	S	C
DAM-EC008	31,17	93,2	S	S	C
DAM-EC010	7,94	-5,57	R	R	C
DAM-EC012	436,07	100,00	S	S	C
DAM-EC013	7,64	-180,07	R	R	C
DAM-EC013	4,36	-26,05	R	R	C
DAM-EC014	87,93	100,00	S	S	C
DAM-EC014	591,38	100,00	S	S	C
DAM-EC015	20,98	-305,84	R	R	C
DAM-EC015	5,15	23,18	R	R	C
DAM-EC021	416,95	100,00	S	S	C
DAM-EC023	3,06	88,69	S	S	C
DAM-EC024	409,09	100,00	S	S	C
DAM-EC026	169,23	100,00	S	S	C
DAM-EC027	504,62	100,00	S	S	C
DAM-EC028	410,61	100,00	S	S	C
DAM-EC031	466,67	100,00	S	S	C
DAM-EC032	866,15	100,00	S	S	C
DAM-EC033	426,23	100,00	S	S	C
DAM-EC034	214,56	100,00	S	S	C
DAM-EC035	3,72	28,32	R	R	C
DAM-EC037	8,17	94,22	S	S	C
DAM-EC041	0,40	9,59	R	R	C
DAM-EC043	2,14	20,13	R	R	C
DAM-EC045	15,57	96,85	S	S	C
DAM-EC045	24,86	-135,33	R	R	C
DAM-EC047	7,34	18,03	R	R	C
DAM-EC050	377,59	100,00	S	S	C
DAM-EC051	642,86	100,00	S	S	C
DAM-EC052	276,56	100,00	S	S	C
DAM-EC053	171,88	100,00	S	S	C
DAM-EC054	84,43	79,46	S	S	C
DAM-EC055	0,00	5,71	R	R	C
DAM-EC056	1,56	2,46	R	R	C
DAM-EC058	282,26	100,00	S	S	C

DAM-EC060	550,00	100,00	S	S	C
DAM-EC061	1,71	1,87	R	R	C
DAM-EC062	6,04	93,52	S	S	C
DAM-EC064	4,02	13,03	R	R	C
DAM-EC068	20,10	32,41	R	S	ME
DAM-EC069	528,13	100,00	S	S	C
DAM-EC070	733,87	100,00	S	S	C
DAM-EC071	385,48	100,00	S	S	C
DAM-EC072	2,74	17,06	R	R	C
DAM-EC073	23,63	48,06	S	S	C
DAM-EC074	2,61	85,78	S	S	C
DAM-EC075	7,22	17,14	R	R	C
DAM-EC076	18,75	47,26	S	S	C
DAM-EC077	1,88	29,73	R	S	ME
DAM-EC078	19,38	-7,41	R	R	C
DAM-EC079	16,75	13,65	R	R	C
DAM-EC079	7,13	34,99	R	R	C
DAM-EC080	0,18	46,23	R	R	C
DAM-EC081	348,39	100,00	S	R	VME
DAM-EC082	7,92	7,69	R	R	C
DAM-EC084	5,21	2,90	R	R	C
DAM-EC089	1,30	49,67	S	S	C
DAM-EC090	16,23	97,24	S	S	C
DAM-EC091	2,63	37,19	R	S	ME
DAM-EC092	8,06	69,15	S	S	C
DAM-EC093	15,35	97,46	S	S	C
DAM-EC094	9,43	-5,94	R	R	C
DAM-EC094	6,75	-0,04	R	R	C
DAM-EC095	488,89	100,00	S	S	C
DAM-EC096	206,56	100,00	S	S	C
DAM-EC097	498,44	100,00	S	S	C
DAM-EC098	6,25	7,41	R	R	C
DAM-EC098	4,69	-4,50	R	R	C
DAM-EC099	424,62	100,00	S	S	C
DAM-EC101	545,31	100,00	S	S	C

* Avec $P\Delta R$: pourcentage de variation du facteur de rétention ; $P\Delta AUC$: pourcentage de variation de l'aire sous la courbe ; S : sensible ; R : résistant ; C : concordant ; VME : very major error (en rouge) ; ME : major error (en orange)

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Antibiogramme rapide et fractionnement par couplage flux - force de sédimentation (SdFFF) : panel urinaire et preuve de concept à partir d'échantillons d'urines

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel accru par l'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques. Ce mésusage est une des conséquences de la lenteur diagnostique actuelle motivant l'instauration d'antibiothérapies probabilistes. Les principaux patients bénéficiaires de ces antibiothérapies empiriques sont les patients atteints d'infections du tractus urinaire, du fait de leurs fréquences et leurs récurrences. Le développement de nouvelles techniques d'antibiogrammes rapides est, dans ce contexte, devenu un enjeu majeur de santé publique. Cette étude avait un double objectif : confirmer la capacité de la SdFFF à réaliser un antibiogramme urinaire rapide à partir d'isolats de *E. coli* et apporter une preuve de concept de la possibilité d'exécution d'un antibiogramme par SdFFF à partir d'échantillons urinaires sans étape de ré-isolément préalable. La SdFFF est une méthode novatrice qui permet la séparation des bactéries selon leurs caractéristiques physico-chimiques. Celle-ci est capable de détecter précocement les changements induits par les antibiotiques sur la cellule bactérienne et donc *in fine* de déterminer la catégorisation clinique de la bactérie étudiée. Dans un premier temps, la capacité de la SdFFF à fournir un antibiogramme urinaire de *E. coli* fiable et rapide a été prouvée avec un accord de catégorie de 97,3%, une sensibilité de 96,2% et une spécificité de 97,6%, conformément à la norme ISO 20776-2. Dans un second temps, une preuve de concept de faisabilité d'antibiogramme à partir d'échantillons urinaires primaires a été apportée. Cette méthode, encore en cours de développement, semble posséder les atouts pour concurrencer les méthodes phénotypiques actuellement utilisées en routine.

Mots-clés : *Antibiogramme rapide – SdFFF – E. coli – ITU – Antibiorésistance*

Rapid antibiotic susceptibility testing using Sedimentation Field Flow Fractionation (SdFFF): urine panel and proof of concept using urine samples

Antibiotic resistance is a natural phenomenon which is exacerbated by the massive and inappropriate use of antibiotics. This misuse is one of the consequences of the current slowness of diagnosis, prompting the introduction of probabilistic antibiotic therapies. The main patients to benefit from these empirical antibiotic therapies are those suffering from urinary tract infections, due to their frequency and recurrence. In this context, the development of new rapid antibiotic susceptibility testing techniques has become a major public health challenge. The aim of this study was twofold: to confirm the ability of SdFFF to perform a rapid urinary antibiotic susceptibility test on *E. coli* isolates, and to provide a proof of concept of the possibility of performing a rapid antibiotic susceptibility test using SdFFF directly from urine samples. SdFFF is an innovative method for separating bacteria according to their physico-chemical characteristics. It is capable of early detection of antibiotic-induced changes in the bacterial cell and *in fine* of determining the clinical categorisation of the bacteria studied. Firstly, the ability of the SdFFF to provide a reliable and rapid *E. coli* urinary antibiotic susceptibility test was demonstrated with a categorical agreement of 97.3%, a sensitivity of 96.2% and a specificity of 97.6%, in accordance with the ISO 20776-2 standard. Secondly, a proof of concept of the feasibility of antibiotic susceptibility testing using primary urine samples was provided. This method, which is still under development, appears to have the potential to compete with the phenotypic methods currently used routinely.

Keywords: Rapid antimicrobial susceptibility testing – SdFFF – *E. coli* – UTI – Antimicrobial resistance

