



**HAL**  
open science

# Modélisation de la diffusion des antibiotiques dans un milieu gélosé pour établir une cartographie des concentrations actives

Kévin Petitcolas

► **To cite this version:**

Kévin Petitcolas. Modélisation de la diffusion des antibiotiques dans un milieu gélosé pour établir une cartographie des concentrations actives. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297934

**HAL Id: hal-03297934**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297934>**

Submitted on 23 Jul 2021

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



FACULTÉ  
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2019

---

FACULTE DE PHARMACIE

**T H E S E**

Présentée et soutenue publiquement

le 26/08/2019, sur un sujet dédié à :

**Modélisation de la diffusion des antibiotiques dans un milieu gélosé pour établir une cartographie des concentrations actives**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Kévin PETITCOLAS

né le 27/07/1993

**Membres du Jury**

Président : Dr. Raphaël DUVAL, Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine, Pharmacien

Directeur de Thèse : Dr. Cécile LEMAITRE, Enseignant-Chercheur, Université de Lorraine

Co-Directeur : Dr. Christophe MERLIN, Enseignant-Chercheur, Université de Lorraine

Juges : Dr. Marie-Noëlle PONS, Directeur de Recherches CNRS, Université de Lorraine

Dr. Michel BOISBRUN, Enseignant-Chercheur, Université de Lorraine, Pharmacien

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2018-2019**

**DOYEN**

Raphaël DUVAL

**Vice-Doyen**

Julien PERRIN

**Directrice des études**

Marie SOCHA

**Conseil de la Pédagogie**

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Présidente, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Présidente, Caroline GAUCHER

**Chargés de Mission**

**Communication**

**Innovation pédagogique**

**Référente ADE**

**Référente dotation sur projet (DSP)**

Marie-Paule SAUDER

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

**Responsabilités**

**Filière Officine**

**Filière Industrie**

**Filière Hôpital**

**Pharma Plus ENSIC**

**Pharma Plus ENSAIA**

**Pharma Plus ENSGSI**

**Cellule de Formation Continue et Individuelle**

**Commission d'agrément des maîtres de stage**

**ERASMUS**

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Pierre LEROY

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

**PROFESSEURS HONORAIRES (suite)**

Vincent LOPPINET  
 Alain NICOLAS  
 Janine SCHWARTZBROD  
 Louis SCHWARTZBROD

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
 Annie PAVIS

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES (suite)**

Marie-Claude FUZELLIER  
 Françoise HINZELIN  
 Marie-Hélène LIVERTOUX  
 Bernard MIGNOT  
 Blandine MOREAU  
 Dominique NOTTER  
 Francine PAULUS  
 Christine PERDICAKIS  
 Marie-France POCHON  
 Anne ROVEL  
 Gabriel TROCKLE  
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU  
 Colette ZINUTTI

**ENSEIGNANTS**

Section CNU

\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPÉL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine CAPIZZI BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT <sup>H</sup>	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER <sup>H</sup>	85	Chimie Physique
Cédric BOURA <sup>H</sup>	86	Physiologie
Joël COULON <sup>H</sup>	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS <sup>H</sup>	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER <sup>H</sup>	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD <sup>H</sup>	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT <sup>H</sup>	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN <sup>H</sup>	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	86	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL <sup>H</sup>	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET <sup>H</sup>	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT <sup>H</sup>	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU <sup>H</sup>	87	Biochimie et Biologie moléculaire

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

<sup>H</sup> *Maître de conférences titulaire HDR*

\* *Disciplines du Conseil National des Universités :*

*80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

# **SERMENT DE GALIEN**

**En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances**

**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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité**

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

**De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession**

**De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens**

**De coopérer avec les autres professionnels de santé**

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

**Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT  
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR  
AUTEUR ».

## REMERCIEMENTS

### **Je tiens à remercier :**

Ma directrice de thèse, le Docteur **Cécile LEMAITRE**, de m'avoir confié ce travail et de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour m'initier aux simulations numériques.

Mon co-directeur de thèse, le Docteur **Christophe MERLIN**, de m'avoir encadré lors des manipulations réalisées au laboratoire et de m'avoir poussé dans mes retranchements durant la rédaction de cette thèse.

Le Docteur **Marie-Noëlle PONS** d'avoir accepté d'être juge dans mon jury de thèse ainsi que pour ses conseils et ses réponses à mes diverses interrogations.

Le Docteur **Raphaël DUVAL** et le Docteur **Michel BOISBRUN** d'avoir accepté d'être respectivement président de jury et juge.

**Mon père** qui a toujours été présent pour moi et m'a transmis toutes ces valeurs qui me sont chères.

**Ma belle-mère** qui m'a toujours traité comme son fils.

**Mes frères et sœur** pour tous ces moments passés ensemble et ces fous rires.

Toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à la Faculté de Pharmacie de Nancy et qui m'ont laissé un très bon souvenir de ces études. Plus particulièrement **Benjamin, Maxime, Maximilien et Merwan** qui sont devenus de très bons amis.

**Allison** de m'avoir appris à prendre la vie du bon côté.

Tous ceux que j'ai pu rencontrer à l'ENSIC et qui m'ont laissé de très bons souvenirs de mes études d'ingénieur. Plus particulièrement **Karen** pour tous ces moments passés ensemble, son aide et son soutien dans les instants difficiles. Mais aussi **Audrey, Élise, Estelle, Loïc, Marie et Vincent** pour les moments que nous avons partagés.

**Mes collègues** de l'équipe support et de l'équipe transferts de m'avoir soutenu moralement dans l'écriture de cette thèse et pour cette ambiance de travail conviviale que vous créez au quotidien.

## TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION.....	10
A. LES ANTIBIOTIQUES .....	10
1. Définitions .....	10
2. Utilisation des antibiotiques en thérapeutique.....	10
3. Impact des antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices .....	11
B. L'ANTIBIORÉSISTANCE .....	12
1. Définitions .....	12
2. Mécanismes de résistance .....	12
3. Conséquences du développement des résistances aux antibiotiques et solutions apportées .....	13
C. CONCENTRATIONS SUB-INHIBITRICES EN ANTIBIOTIQUES ET DISSÉMINATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE .....	15
1. Transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques .....	15
2. ICE de la famille SXT/R391 .....	15
D. ACTIVITÉS DE RECHERCHE SUR L'ANTIBIORÉSISTANCE AU LCPME .....	19
E. SIMULATIONS NUMÉRIQUES DES PHÉNOMÈNES DE DIFFUSION .....	22
1. Équation de conservation de la masse .....	22
2. Équations de conservation de la quantité de mouvement.....	23
3. Utilisation des simulations numériques.....	24
4. Diffusion .....	25
F. ÉTAT DE L'ART SUR LA DIFFUSION D'ANTIBIOTIQUES DANS L'AGAR (MANIPULATIONS ET SIMULATIONS NUMÉRIQUES).....	28
1. Caractérisation de la Nisine.....	28
2. Simulation de deux processus de diffusion successifs .....	28
3. Détermination des diffusivités aux deux températures d'étude .....	29
4. Détermination de la CMI de la nisine contre <i>Micrococcus luteus</i> .....	30
5. Détermination du temps critique (Tc) pour la croissance de <i>M. luteus</i> .....	30
6. Détermination du rayon d'inhibition .....	31
G. BUT DU TRAVAIL ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE .....	32

II.	MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	33
A.	MANIPULATIONS EN MICROBIOLOGIE (RÉALISÉES AU LCPME) .....	33
1.	Préparation des milieux LB liquide, top agar et agar.....	33
2.	Souche bactérienne <i>E. coli</i> CM996 utilisée .....	33
3.	Préparation d'une solution de ciprofloxacine .....	33
4.	Étude de la diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu LB gélosé inoculé par <i>E. coli</i> CM996 .....	34
5.	Détermination de la CMI et de la concentration inductrice maximale en milieu liquide	36
B.	SIMULATIONS NUMÉRIQUES (RÉALISÉES AU LRGP) .....	40
1.	D'un domaine continu à discret .....	40
2.	ANSYS Fluent® et méthode de résolution des volumes finis .....	40
3.	Validation des simulations numériques réalisées sur ANSYS Fluent® .....	41
4.	Simulations numériques de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu gélosé .....	44
III.	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	47
A.	DÉTERMINATION DE LA CMI EN CIPROFLOXACINE VIS-A-VIS DE <i>E. COLI</i> CM996	47
B.	DÉTERMINATION DU FACTEUR D'INDUCTION ET DE LA CONCENTRATION D'INDUCTION MAXIMALE DU PROMOTEUR P <sub>S086</sub> .....	47
C.	ÉTUDE DE LA DIFFUSION DE LA CIPROFLOXACINE DANS UN MILIEU LB GÉLOSÉ INOCULÉ PAR <i>E. COLI</i> CM996 .....	49
1.	Détermination des rayons d'inhibition et d'induction du promoteur P <sub>S086</sub> après exposition à la ciprofloxacine (5 µg à 0,0003 µg).....	49
2.	Détermination des rayons d'inhibition et d'induction du promoteur P <sub>S086</sub> après exposition à des quantités pertinentes de ciprofloxacine (5 µg à 0,04 µg) .....	62
3.	Bilan de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu LB gélosé inoculé par <i>E. coli</i> CM996 (séries d'expériences 1 et 2).....	68
D.	SIMULATIONS NUMÉRIQUES DE LA DIFFUSION DE LA CIPROFLOXACINE DANS UN MILIEU GÉLOSÉ .....	71
1.	Concentrations en ciprofloxacine configurées dans les corps des disques.....	71

2.	Diffusivités testées dans les différentes simulations .....	71
3.	Domaine spatial choisi pour la représentation des profils de concentration .....	72
4.	Temps de diffusion choisi et impact de ce paramètre sur les profils de concentration 73	
5.	Profils de concentration et diamètres d'inhibition bactérienne obtenus suite aux simulations numériques.....	75
6.	Comparaison des rayons d'inhibition bactérienne numériques et expérimentaux ...	79
IV.	CONCLUSION.....	82
A.	APPORT DU TRAVAIL RÉALISÉ .....	82
B.	PISTES D'AMÉLIORATION.....	82
1.	Diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu LB gélosé inoculé par <i>E. coli</i> CM996	82
2.	Simulations numériques de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu gélosé .....	84
C.	OBJECTIFS ENVISAGEABLES POUR LA SUITE .....	85
V.	PERSPECTIVES.....	86
A.	CONCENTRATIONS EN CIPROFLOXACINE DANS L'ORGANISME HUMAIN A LA SUITE D'UNE ANTIBIOTHÉRAPIE ET POTENTIEL D'INDUCTION DU PROMOTEUR P <sub>S086</sub> 86	
B.	CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LES ANTIBIOTIQUES .....	87
C.	CONCENTRATIONS EN CIPROFLOXACINE RETROUVÉES DANS LES EAUX ENVIRONNEMENTALES ET POTENTIEL D'INDUCTION DU PROMOTEUR P <sub>S086</sub> .....	87
D.	BILAN SUR LA LOCALISATION DES CONCENTRATIONS EN CIPROFLOXACINE POUVANT INDUIRE DES PROMOTEURS BACTÉRIENS.....	88

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Recette de préparation de la gamme de dilution en ciprofloxacine .....	37
Tableau II : Plan de dépôt des dilutions de ciprofloxacine dans les puits .....	38
Tableau III : Visualisation ou non des phénomènes d'inhibition et d'induction sur les graphiques tracés dans l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu LB gélosé.....	52
Tableau IV : Temps requis pour pouvoir interpréter le facteur d'induction du promoteur P <sub>S086</sub> dans l'étude de la diffusion en milieu gélosé pour des quantités de ciprofloxacine allant de 0,024 à 0,0003 µg (disques 12 à 15) .....	57
Tableau V : Comparaison des rayons d'inhibition bactérienne mesurés et issus de l'analyse automatisée de la photographie pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 0,0098 µg (disque 10) et différents temps d'incubation .....	60
Tableau VI : Visualisation ou non des phénomènes d'inhibition et d'induction sur les graphiques tracés dans l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu LB gélosé .....	64
Tableau VII : Comparaison des rayons d'inhibition bactérienne mesurés et issus de l'analyse automatisée des photographies pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 0,06 µg (disque 14) et différents temps d'incubation .....	67
Tableau VIII : Rayons moyens d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur P <sub>S086</sub> pour les disques 0 à 11 (série d'expériences 2) .....	69
Tableau IX : Concentrations en ciprofloxacine imposées initialement dans les disques (mol/m <sup>3</sup> ) .....	71
Tableau X : Correspondance entre les fractions du temps total de diffusion (7,5 heures) et les temps de diffusion réels.....	73
Tableau XI : Diamètres d'inhibition bactérienne obtenus autour des disques 8 à 15 pour une diffusivité de 10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> /s .....	78
Tableau XII : Écarts entre rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux et numériques pour un temps de diffusion de 7,5 heures.....	79

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure génétique modulaire d'un ICE <sup>17</sup> .....	16
Figure 2 : Mécanisme de transfert conjugatif des ICE <sup>19</sup> .....	16
Figure 3 : Exposition de bactéries biosenseurs à des gradients de concentration en antibiotique obtenus par diffusion en milieu gélosé (crédit : C. Merlin, LCPME) .....	20
Figure 4 : AntibioGramme à la lumière visible (a) et luminogramme mesuré à l'aide d'une caméra CCD à haute sensibilité (b) (crédit : C. Merlin, LCPME) .....	20
Figure 5 : Exemple de traitement de données permettant d'obtenir l'induction de luminescence émise en fonction de la distance par rapport au disque (crédit : C. Merlin, LCPME) .....	21
Figure 6 : Volume infinitésimal dans un repère cartésien .....	22
Figure 7 : Flux de diffusion en fonction du gradient de concentration pour un mélange binaire (a) <sup>31</sup> et variation de la concentration d'une espèce en fonction de la distance pour différents temps de diffusion (b) <sup>32</sup> .....	26
Figure 8 : Schéma de l'emplacement des disques imbibés de ciprofloxacine sur le tapis bactérien .....	34
Figure 9 : Volume de contrôle rectangulaire .....	40
Figure 10 : Géométrie (a) et maillage (b) de la boîte de Petri (paramètres de l'article de Chandrasekar et al.) .....	43
Figure 11 : Simulation des profils de concentration en fonction de la position x dans la boîte obtenue sur Matlab <sup>®</sup> et ANSYS Fluent <sup>®</sup> .....	43
Figure 12 : Modélisation de la boîte de Petri (de face et de biais) et des disques sur Fluent <sup>®</sup> .....	45
Figure 13 : Maillage de la boîte de Petri modélisée .....	45
Figure 14 : Facteur d'induction après 6 heures d'exposition en fonction de la concentration en ciprofloxacine .....	47
Figure 15 : Quantités de ciprofloxacine initialement imbibées dans les disques pour la première étude de diffusion .....	49
Figure 16 : Exemple de photographie obtenue à la lumière visible après 7 heures d'incubation (répétition 3) .....	50
Figure 17 : Exemple d'image de luminescence obtenue après 7 heures d'incubation (répétition 3) (cps : coup par seconde) .....	51
Figure 18 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur P <sub>S086</sub> en fonction du temps d'incubation pour un disque commercial (témoin) chargé avec 5 µg de ciprofloxacine (répétition 2) .....	53

Figure 19 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur $P_{S086}$ en fonction du temps d'incubation pour un disque non commercial chargé avec 5 $\mu\text{g}$ de ciprofloxacine (répétition 2) .....	54
Figure 20 : Exemple d'inhibition bactérienne et d'induction du promoteur $P_{S086}$ en fonction du temps d'incubation pour un disque non commercial chargé avec 0,0003 $\mu\text{g}$ de ciprofloxacine (répétition 3) .....	55
Figure 21 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur $P_{S086}$ en fonction du temps d'incubation pour le disque chargé avec 0,0098 $\mu\text{g}$ de ciprofloxacine (répétition 3).....	58
Figure 22 : Photographies à la lumière visible pour 2 (a) et 7 heures d'incubation (b) dans l'étude de diffusion de la ciprofloxacine en milieu gélosé (répétition 3) .....	59
Figure 23 : Quantités de ciprofloxacine initialement imbibées dans les disques pour la seconde étude de diffusion .....	62
Figure 24 : Exemple de photographie obtenue à la lumière visible après 7,5 h d'incubation (seconde répétition).....	63
Figure 25 : Exemple d'image de luminescence obtenue après 7,5 heures d'incubation (répétition 2) (cps : coup par seconde) .....	63
Figure 26 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur $P_{S086}$ en fonction du temps d'incubation pour un disque commercial (témoin) chargé avec 5 $\mu\text{g}$ de ciprofloxacine (répétition 1).....	65
Figure 27 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur $P_{S086}$ en fonction du temps d'incubation pour un disque non commercial chargé avec 5 $\mu\text{g}$ de ciprofloxacine (répétition 1) .....	65
Figure 28 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur $P_{S086}$ en fonction du temps d'incubation pour un disque chargé avec 0,06 $\mu\text{g}$ de ciprofloxacine (répétition 2) .....	66
Figure 29 : Photographies à la lumière visible pour 2 (a) et 7,5 heures d'incubation (b) dans l'étude de diffusion de la ciprofloxacine en milieu gélosé (répétition 2) .....	66
Figure 30 : Évolution des rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur $P_{S086}$ en fonction de la quantité de ciprofloxacine.....	70
Figure 31 : Orientation de la boîte de Petri simulée selon le repère cartésien .....	72
Figure 32 : Profils de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (avec $y = 0,6 \text{ cm}$ et $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures (disques 0 à 3) .....	74
Figure 33 : Profils de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (avec $y = 0,6 \text{ cm}$ et $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures (disques 12 à 15) .....	74
Figure 34 : Profil de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri ( $y = 0,6 \text{ cm}$ ) pour différentes diffusivités (disques 0 à 3).....	75

Figure 35 : Profil de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour différentes diffusivités (disques 12 à 15).....	76
Figure 36 : Profil de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour une diffusivité de $10^{-10}$ m <sup>2</sup> /s (disques 12 à 15) .....	77
Figure 37 : Évolution des rayons d'inhibition bactérienne expérimental et numérique en fonction de la quantité de ciprofloxacine.....	80

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATB	Antibiotique
CCD	« Charge Coupled Device » (récepteurs à transferts de charge)
CFD	« Computational Fluid Dynamics » (dynamique des fluides numérique)
CIP	Ciprofloxacine
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPS	Coup Par Seconde
D	Diffusivité
DO	Densité Optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-G	« Elongation Factor G »
EF-Tu	« Elongation Factor Thermo Unstable »
GEMICO	Génie Chimique des Milieux Rhéologiquement Complexes
ICE	« Integrative Conjugative Element » (élément conjugatif et intégratif)
LB	« Lysogeny Broth » (bouillon lysogène)
LCPME	Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
Lux	Intensité de luminescence

MIC	Équipe Microbiologie Environnementale
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Mob	Relaxase Mobile
...N	Valeur normalisée
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>oriT</i>	« Origin of Transfer » (origine du transfert)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PLP	Protéines Liant les Pénicillines
R <sup>2</sup>	Coefficient de détermination
RC replication	« Rolling-Circle replication » (réplication en cercle roulant)
Rpm	Rotation par minute
Tc	Temps critique
T4CP	« Type IV Coupling Protein » (protéine de couplage de type IV)
T4SS	« Type IV Secretion System » (système de sécrétion dit « de type IV »)
UDS	« User-Defined Scalar » (scalaire définie par l'utilisateur)
UFC	Unité Formant Colonie

# I. INTRODUCTION

## A. LES ANTIBIOTIQUES

### 1. Définitions

Les antibiotiques sont des médicaments utilisés pour traiter et prévenir les infections bactériennes.<sup>1</sup> Ils peuvent être d'origine naturelle lorsqu'ils sont produits par des micro-organismes, synthétiques quand ils sont synthétisés au laboratoire ou même semi-synthétiques lorsqu'ils sont produits de façon naturelle puis modifiés chimiquement.<sup>2</sup> Les antibiotiques présentent deux types d'effets thérapeutiques : bactériostatiques quand ils inhibent la croissance bactérienne et bactéricides lorsqu'ils détruisent les bactéries. Ces effets ont lieu à des concentrations supérieures ou égales à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) qui est définie comme étant « la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber *in vitro* toute culture visible de la souche étudiée pendant une période de temps définie ».<sup>3</sup> Si les antibiotiques sont bien connus pour leurs utilisations en thérapeutique, leurs effets en concentrations sub-inhibitrices sont moins évidents. Après avoir décrit les différents modes d'action des antibiotiques en thérapeutique, leurs effets en doses sub-inhibitrices seront abordés.

### 2. Utilisation des antibiotiques en thérapeutique

Au niveau thérapeutique, les antibiotiques ont différents modes d'action tels que l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, l'inhibition de la synthèse des protéines, l'inhibition du métabolisme de l'ADN, ou encore l'altération de l'intégrité de la membrane plasmique.<sup>4</sup> Pour chaque mode d'action, différentes familles d'antibiotiques sont utilisées. Tout d'abord, les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne sont constitués des  $\beta$ -lactamines, des glycopeptides et de la fosfomycine. Ces molécules peuvent entraîner la destruction de la bactérie en inhibant la synthèse du peptidoglycane, un des éléments constitutifs de la paroi bactérienne.<sup>2,4</sup> Les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines sont composés des aminosides, des macrolides et apparentés, des tétracyclines, des rifamycines, de l'acide fusidique et des oxazolidinones.<sup>4</sup> Selon les antibiotiques, les cibles peuvent varier. À titre d'exemple, les rifamycines inhibent la transcription, c'est-à-dire la copie de l'ADN sous forme d'un simple brin d'ARN messager (ARNm) et les aminosides altèrent la traduction à partir de l'ARNm en s'attaquant aux ribosomes (complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la synthèse protéique).<sup>2,4</sup> Les antibiotiques inhibant le métabolisme de l'ADN sont, quant à eux, représentés par les quinolones, les imidazolés, les sulfamides antibactériens et les nitrofuranes.<sup>4</sup> Par exemple, les quinolones empêchent la réplication de l'ADN (production de

deux molécules d'ADN à partir d'une seule) et l'association sulfamides/triméthoprimine entraîne une diminution de la fabrication des acides nucléiques (ADN et ARN) aboutissant à un ralentissement de la croissance bactérienne.<sup>2,4</sup> Enfin, les antibiotiques altérant la membrane cytoplasmique sont les polymyxines (dont la plus connue est la colistine).<sup>4</sup> Ces antibiotiques altèrent la membrane plasmique après avoir désorganisé la membrane externe de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif. Une présentation plus détaillée des mécanismes d'action des différents antibiotiques retrouvés dans ces familles est présentée en annexe I.

### 3. Impact des antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices

Les progrès de la recherche montrent que des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques peuvent induire des effets majeurs sur le métabolisme bactérien, notamment en modulant la transcription des gènes.<sup>5</sup> Dans ces conditions, les antibiotiques peuvent induire ou réprimer toute une variété de fonctions :

- Formation de biofilms : amas structurés de cellules bactériennes attachés à une surface et résistants à des conditions environnementales hostiles.<sup>6</sup> La tobramycine, par exemple, induit la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>7</sup>
- Répression des fonctions de locomotion bactérienne.<sup>8</sup> À titre d'exemple, la mupirocine inhibe la formation des flagelles bactériens et rend non mobiles des bactéries telles que *P. aeruginosa* et *Proteus mirabilis* (point de départ de la formation des biofilms bactériens).
- Réponse SOS : mécanisme de régulation permettant la réparation de l'ADN à la suite d'un stress génotoxique causant des dommages à l'ADN.<sup>9</sup> Outre les systèmes de réparation de l'ADN, cette réponse au stress induit aussi des fonctions impliquées dans la virulence bactérienne, le déclenchement de la phase lytique de prophage ou encore le transfert de certains éléments conjuguatifs par exemple.
- Stimulation de certains éléments génétiques mobiles impliqués dans le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques.<sup>10</sup>

Si les exemples cités ci-dessus montrent que les antibiotiques peuvent stimuler certaines fonctions bactériennes, notamment en influençant la transcription des gènes correspondants, les concentrations sub-inhibitrices en antibiotique sont inactives d'un point de vue thérapeutique. Cependant, à faible dose, les antibiotiques peuvent entraîner l'adaptation des bactéries vers des formes résistantes en stimulant, par exemple, le transfert de gènes d'antibiorésistance.

## B. L'ANTIBIORÉSISTANCE

### 1. Définitions

L'usage excessif des antibiotiques et la mauvaise prévention des infections contribuent au développement de résistances liées à l'évolution des bactéries.<sup>1</sup> Ces résistances peuvent être naturelles lorsqu'elles sont liées à une caractéristique propre à une espèce bactérienne (phénotype sauvage) ou acquises quand elles nécessitent une modification génétique par mutation ou acquisition de matériel génétique étranger (phénotype résistant).<sup>4</sup> Dans tous les cas, l'usage des antibiotiques dans le traitement des infections a tendance à sélectionner les variants résistants au détriment des formes bactériennes sensibles aux antibiotiques utilisés.

### 2. Mécanismes de résistance

Les résistances aux antibiotiques, qu'elles soient naturelles ou acquises, peuvent se manifester via différents mécanismes tels que l'imperméabilité et/ou l'efflux, le défaut d'affinité (modification de la cible), la résistance par modification enzymatique de l'antibiotique et la protection de la cible.<sup>4</sup>

#### a. Imperméabilité et/ou efflux

Un des moyens possibles de résistance aux antibiotiques consiste à ne pas accumuler l'antibiotique au sein de la bactérie.<sup>4</sup> Ce phénomène peut être naturel lorsque la paroi, la membrane externe ou la membrane plasmique ne sont pas perméables à l'antibiotique. Des résistances acquises existent également telle que celle rencontrée chez *P. aeruginosa* vis-à-vis de l'imipénème qui est consécutive à la disparition d'une porine impliquée dans les phénomènes de perméabilité de la membrane externe.<sup>11</sup> L'efflux actif des antibiotiques par la bactérie est un autre moyen utilisé pour éviter l'accumulation de l'antibiotique dans la bactérie.<sup>4</sup> Après être entré dans la bactérie, l'antibiotique est pris en charge par des protéines de l'enveloppe cellulaire permettant son évacuation. C'est le cas chez *P. aeruginosa* qui est naturellement résistant vis-à-vis de nombreux antibiotiques. La première résistance acquise par efflux identifiée date, quant à elle, de 1980 avec l'excrétion de la tétracycline par *Escherichia coli*.

#### b. Défaut d'affinité

Une autre résistance possible est l'altération de la reconnaissance de la cible.<sup>4</sup> Les bactéries à Gram positif et anaérobies strictes sont naturellement résistantes contre l'aztréonam qui a peu d'affinité pour les Protéines Liant les Pénicillines (PLP) impliquées dans la synthèse du

peptidoglycane et qui sont retrouvées dans la membrane plasmique de ces bactéries. La résistance acquise se traduit, quant à elle, par une modification de la cible et une perte de l'affinité des antibiotiques pour cette cible. Certains staphylocoques sont devenus résistants contre les  $\beta$ -lactamines à la suite de l'acquisition de matériel génétique (gène *mecA*) codant pour la synthèse d'une nouvelle PLP ayant une mauvaise affinité pour ces antibiotiques.

#### c. Résistance par modification enzymatique de l'antibiotique

La résistance par modification enzymatique est le mécanisme de résistance le plus important car il concerne de nombreuses classes d'antibiotiques et pratiquement toutes les espèces bactériennes.<sup>4</sup> Il consiste en une modification de l'antibiotique par des enzymes présentes dans la bactérie et aboutissant à une perte de l'activité de l'antibiotique. Les  $\beta$ -lactamases, qui détruisent le cycle  $\beta$ -lactame et rendent l'antibiotique inactif, peuvent être d'origine naturelle ou acquise via des plasmides ou des segments d'ADN chromosomiques.

#### d. Protection de la cible

La protection de la cible de l'antibiotique est un phénomène réversible réalisé par des protéines.<sup>12</sup> A titre d'exemple, l'une des résistances acquises les plus fréquentes pour *Listeria monocytogenes* vis-à-vis des tétracyclines est la protection ribosomale.<sup>13</sup> Les protéines de protection ribosomale sont des protéines cytoplasmiques qui ont une homologie avec les facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G.<sup>14</sup> En se liant au ribosome, ces protéines de protection vont causer une altération de la conformation ribosomale empêchant ainsi la fixation des tétracyclines.

### 3. Conséquences du développement des résistances aux antibiotiques et solutions apportées

L'antibiorésistance constitue une réelle menace pour la santé mondiale car les infections deviennent de plus en plus difficiles à traiter et la mortalité augmente.<sup>1</sup> De plus, les interventions de la médecine moderne telles que les transplantations d'organe et la chimiothérapie deviennent plus risquées en l'absence de prévention des infections. Les résistances aux antibiotiques entraînent également une augmentation des dépenses de santé qui sont liées à l'utilisation de médicaments plus coûteux en alternative aux antibiotiques de première intention devenus inefficaces mais aussi à l'augmentation de la durée du traitement et de l'hospitalisation.

Considérant le problème posé par l'antibiorésistance, il est urgent de changer notre comportement vis-à-vis des antibiotiques en améliorant la prescription et l'utilisation de ces

médicaments mais également en réduisant la propagation des infections. Améliorer la compréhension des mécanismes de résistance est indispensable pour mieux utiliser les antibiotiques : être actif sur les bactéries impliquées dans les infections, limiter l'émergence des souches résistantes et éviter l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance.<sup>4</sup> La prévention peut se faire via différents moyens tels que la vaccination, le lavage des mains régulier, la protection lors des rapports sexuels, une bonne hygiène alimentaire, etc.<sup>1</sup> Dans le secteur agricole, il serait bénéfique de ne plus utiliser les antibiotiques en tant que facteurs de croissance ou pour prévenir des maladies mais uniquement sous contrôle vétérinaire dans le cas d'une infection avérée. Enfin, il est important de continuer à développer de nouveaux antibiotiques, vaccins et outils de diagnostic. Pour faire face à l'antibiorésistance, l'Organisation Mondiale de la Santé a mis en place un plan d'action mondiale qui a été approuvé par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2015. Ses objectifs stratégiques sont d'augmenter la sensibilisation et la compréhension des résistances, de renforcer la surveillance et la recherche, de réduire les incidences des infections, d'optimiser l'utilisation des antibiotiques et d'investir de manière durable pour combattre les résistances aux antibiotiques.

## C. CONCENTRATIONS SUB-INHIBITRICES EN ANTIBIOTIQUES ET DISSÉMINATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE

### 1. Transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques

Dans un nombre relativement limité de cas, il a été montré qu'en concentrations sub-inhibitrices, certains antibiotiques pouvaient favoriser le processus de transfert horizontal de gènes (notamment les gènes de résistance aux antibiotiques) qui se définit comme l'échange de matériel génétique entre des organismes non apparentés.<sup>15</sup> À titre d'exemple, dans une étude publiée en 2005, Ubeda et al. ont montré que le transfert de gènes est favorisé par la réponse SOS, elle-même induite par des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques comme évoqué précédemment.<sup>16</sup> Globalement, trois étapes sont nécessaires pour que le transfert de gène horizontal ait lieu : un contact entre la bactérie et de l'ADN exogène, l'entrée de ce dernier dans la cellule bactérienne et son maintien ainsi que sa transmission à la descendance.<sup>17</sup> On distingue trois grands mécanismes de transfert horizontal :

- Transformation : capture, internalisation et intégration d'ADN libre exogène par la bactérie.<sup>18</sup> La transformation requière un état de compétence de la bactérie vis-à-vis de ces trois étapes.
- Transduction : transfert d'ADN entre bactéries par l'intermédiaire de phages (virus infectant les bactéries)<sup>17</sup>. La transduction résulte d'une erreur d'encapsulation au cours de laquelle de l'ADN bactérien a été empaqueté et véhiculé par une structure virale jusqu'à une nouvelle bactérie hôte.
- Conjugaison : transfert d'ADN d'une cellule bactérienne à une autre par l'intermédiaire d'un contact direct entre les cellules. L'ADN acquis par conjugaison doit être capable de se répliquer de manière autonome ou être intégré au chromosome de la bactérie réceptrice pour être conservé et transmis à la descendance. Parmi les éléments génétiques transférés par conjugaison, on retrouve notamment les plasmides et les éléments intégratifs et conjuguatifs (ICE). Au cours de ce travail nous nous sommes particulièrement intéressés aux ICE de la famille SXT/R391.

### 2. ICE de la famille SXT/R391

Les ICE forment le groupe d'éléments génétiques mobiles le plus représenté au sein du monde bactérien. Ils se définissent comme des éléments chromosomiques mobiles qui peuvent avoir une taille allant de 18 à 600 kilobases.<sup>17</sup> Ils ont la capacité de s'exciser du chromosome de la

cellule donneuse, de se circulariser et de se transférer vers une cellule réceptrice par conjugaison. Une intégration de l'ICE dans le chromosome de la cellule réceptrice permet ensuite de garantir son maintien dans la descendance. Les ICE contiennent de nombreux gènes qui s'organisent en différents modules fonctionnels comme le montre la figure 1.

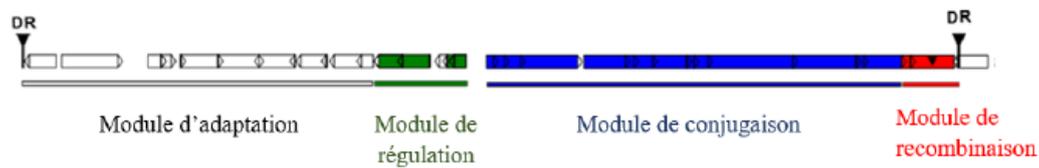


Figure 1 : Structure génétique modulaire d'un ICE<sup>17</sup>

Le module de recombinaison est dédié à la mobilité intracellulaire en codant notamment pour une intégrase qui permet l'excision et l'intégration de l'élément génétique au génome de son hôte. Le module de conjugaison code pour toutes les protéines nécessaires au transfert conjugatif de l'ICE. Le module de régulation exerce, quant à lui, un contrôle sur le processus de conjugaison en fonction des stimuli extérieurs. Enfin, le module d'adaptation contient des gènes auxiliaires qui confèrent un avantage à la cellule hôte comme par exemple la résistance aux antibiotiques. Les différentes étapes du transfert conjugatif des ICE sont présentées sur la figure 2.

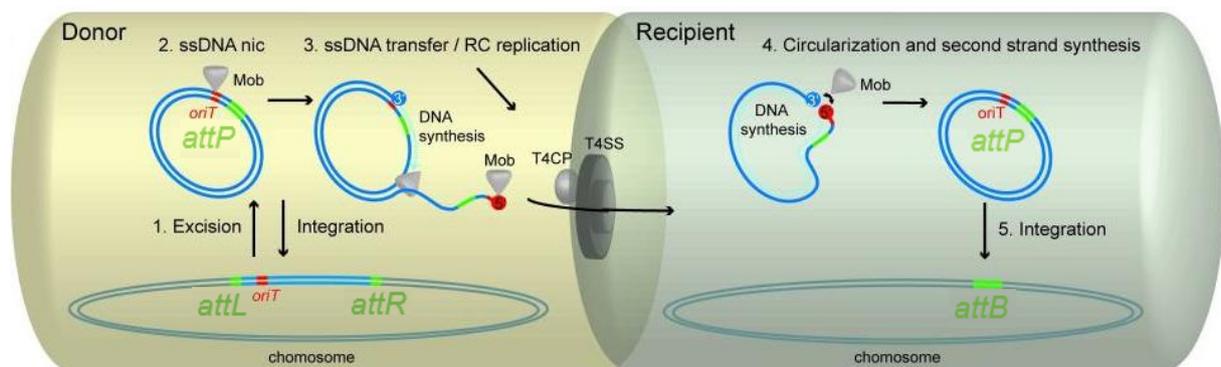


Figure 2 : Mécanisme de transfert conjugatif des ICE<sup>19</sup>

Le transfert d'un ICE d'une bactérie à une autre fait intervenir plusieurs étapes. Tout d'abord, une recombinaison site-spécifique entre les sites *attL* et *attR* permet l'excision de l'ICE du chromosome dans la cellule donneuse. Ensuite, une relaxase mobile (Mob), faisant partie d'un complexe multiprotéique nommé relaxosome, reconnaît l'origine du transfert (*oriT* : « *origin of Transfer* ») de l'ICE. La protéine Mob génère ensuite une coupure dans un des brins et se lie de manière covalente à l'extrémité 5' du brin coupé. Au cours d'une étape de réplication en

cercle roulant (RC répllication : « Rolling-Circle replication »), un complexe nucléoprotéique à un brin d'extrémité 5' se forme et s'étend tout en s'éloignant du modèle circulaire dont l'extrémité 3' s'allonge au fur et à mesure par le biais de l'ADN polymérase. Le complexe nucléoprotéique interagit ensuite avec une protéine de couplage de type IV (T4CP : « Type IV Coupling Protein ») qui va générer l'énergie nécessaire à sa translocation à travers un système de sécrétion dit « de type IV » (T4SS : « Type IV Secretion System ») et dédié au transfert du brin d'ADN vers la bactérie réceptrice. Après transfert dans la cellule réceptrice, la protéine Mob entraîne une ligature entre les deux extrémités de la molécule d'ADN simple brin alors que le brin complémentaire est synthétisé. L'intégration dans le chromosome de la cellule réceptrice est ensuite médiée par recombinaison entre les sites de recombinaison *attP* de l'ICE circulaire et *attB* du chromosome.

Les ICE de la famille SXT/R391 sont des éléments génétiques mobiles autotransmissibles capables de conférer des gènes de résistance aux antibiotiques et autres fonctionnalités adaptatives à des hôtes bactériens tels que *Vibrio cholerae*, l'agent du choléra.<sup>20</sup> SXT et R391 sont des ICE étroitement apparentés dérivés d'isolats cliniques de *Vibrio cholerae* et *Providencia rettgeri*, respectivement.<sup>21</sup> Comme évoqué précédemment, le transfert conjugatif des ICE de cette famille peut être stimulé à travers la réponse SOS, elle-même activée par plusieurs antibiotiques tels que la ciprofloxacine ou le triméthoprime.<sup>9</sup> Ces derniers induisent la réponse SOS de façon directe (via un dommage à l'ADN) chez diverses bactéries et lorsqu'ils se retrouvent à des concentrations sub-inhibitrices. Ainsi, l'utilisation de certains agents antimicrobiens peut stimuler la dissémination des gènes de résistance portés par les ICE de la famille SXT/R391 vers un large rang d'espèces via le transfert horizontal.

L'effet stimulateur des antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices sur la dissémination de certains éléments génétiques mobiles vecteurs d'antibiorésistance a été décrit à plusieurs reprises. Ce phénomène est particulièrement préoccupant car il signifie que si les antibiotiques sont responsables de la sélection de résistances à hautes concentrations, ils continuent d'exercer des effets à basses concentrations en favorisant la dissémination de résistances. Cependant, la notion de concentrations sub-inhibitrices est relativement vague car elle ne précise pas dans quelle gamme de concentrations ces antibiotiques restent effectifs. Définir ces concentrations effectives est cependant de première importance car cela permettrait d'identifier où ces stimulations d'éléments génétiques mobiles sont susceptibles d'avoir lieu. S'agit-il de concentrations rencontrées dans l'organisme immédiatement après une antibiothérapie ou s'agit-il de concentrations relativement faibles telles que celles rencontrées dans l'environnement ? On sait aujourd'hui que la production des médicaments par l'industrie pharmaceutique et l'excrétion partielle des médicaments consommés par les humains et les animaux sont à l'origine d'une dissémination des antibiotiques dans l'environnement.<sup>22</sup> Si les

concentrations rencontrées dans l'environnement s'avéraient être effectives, alors les rejets d'origine anthropique participeraient aussi à la dissémination de la résistance. Dans le but de renforcer notre contrôle de la dissémination des résistances aux antibiotiques, il serait intéressant de déterminer les concentrations en antibiotiques effectives pour la stimulation du transfert de gènes de résistance et de les comparer à celles rencontrées dans l'environnement.

## D. ACTIVITÉS DE RECHERCHE SUR L'ANTIBIORÉSISTANCE AU LCPME

Le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (LCPME) centre ses recherches sur l'étude des interfaces minérales et biologiques en milieux aqueux.<sup>23</sup> L'équipe de Microbiologie Environnementale (MIC) s'intéresse aux interactions entre micro-organismes du milieu hydrique et leur environnement. Les objectifs de cette équipe sont notamment de comprendre les phénomènes expliquant la persistance de virus ou d'éléments génétiques mobiles (vecteurs d'antibiorésistance) dans l'environnement mais aussi de s'intéresser à l'action des antibiotiques sur le transfert d'éléments génétiques mobiles tels que les ICE dont ceux de la famille SXT/R391 sont étudiés comme modèle.

Nous avons vu précédemment que le transfert conjugatif de l'élément mobile SXT peut être activé par le système SOS via certains antibiotiques. Plus précisément, le système SOS induit des promoteurs de gènes bactériens qui favorisent le transfert conjugatif de cet ICE. Au LCPME, 48 antibiotiques ont été testés sur l'activité de différents promoteurs de l'ICE SXT.<sup>10</sup> L'objectif était de savoir si ces antibiotiques pouvaient stimuler le transfert de l'élément SXT. Pour cela, une approche a consisté à voir si les promoteurs de l'ICE SXT étaient activés ou non en présence de ces antibiotiques. En partant du principe que tous les antibiotiques ne sont pas nécessairement inducteurs de ces promoteurs, il a été nécessaire de commencer l'étude par un criblage destiné à identifier les antibiotiques stimulateurs. Un tel criblage nécessite de connaître les concentrations actives. Or elles sont *a priori* indéterminées au moment du criblage. Pour tenir compte d'un ensemble de concentrations, il est possible de réaliser une gamme de concentrations et d'étudier les niveaux d'induction pour chacune de ces concentrations. Mais une telle approche ne permet pas d'étudier de manière exhaustive toutes les concentrations en antibiotique, ni d'identifier une induction de promoteur qui aurait lieu entre deux valeurs des concentrations étudiées. Pour s'affranchir de ce problème et étudier un ensemble exhaustif de concentrations possibles, l'idée a alors été de travailler sur un gradient de diffusion sur gélose. Il restait à disposer d'un moyen efficace pour détecter l'activation des promoteurs de SXT.

Pour cela, des bactéries génétiquement modifiées (biosenseurs bactériens) portant des fusions transcriptionnelles promoteur-*luxCDABE* ont d'abord été préparées. Avec de telles constructions, l'induction des promoteurs bactériens peut être observable en mesurant l'intensité de luminescence émise par ces bactéries génétiquement modifiées. Ces bactéries ont été ensemencées sur un milieu gélosé. Puis, un disque contenant une concentration initiale donnée en antibiotique a été déposé sur le tapis bactérien. En diffusant, l'antibiotique génère un gradient de concentration qui permet alors d'étudier l'ensemble des concentrations inférieures ou égales à la concentration initiale imbibée dans le disque (figure 3).

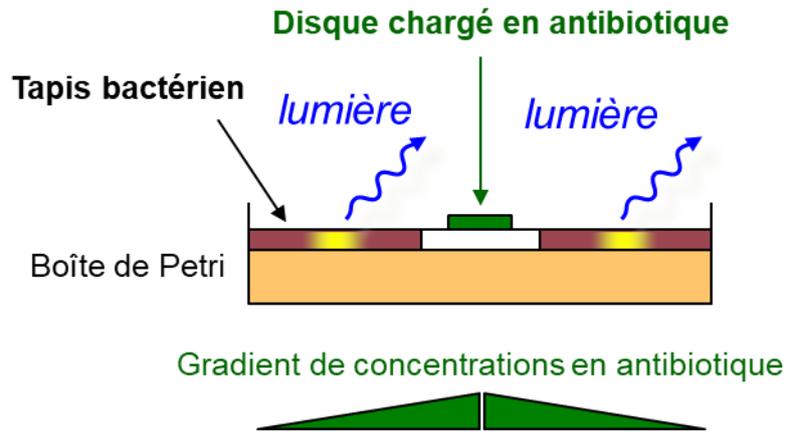


Figure 3 : Exposition de bactéries biosenseurs à des gradients de concentration en antibiotique obtenus par diffusion en milieu gélosé (crédit : C. Merlin, LCPME)

La présence d'une concentration inductrice au sein du gradient de concentration étudié peut être visualisée par l'émission d'une lumière localisée au niveau de cette concentration. La lumière émise étant somme toute de faible intensité, une caméra CCD à haute performance est alors utilisée afin de pouvoir réaliser un luminogramme (figure 4.b). Un logiciel informatique est ensuite utilisé pour traiter les intensités de luminescence mesurées et des facteurs d'induction ainsi que des rayons d'induction maximale du promoteur bactérien sont obtenus. Le type d'imagerie obtenue est présenté sur la figure 4.

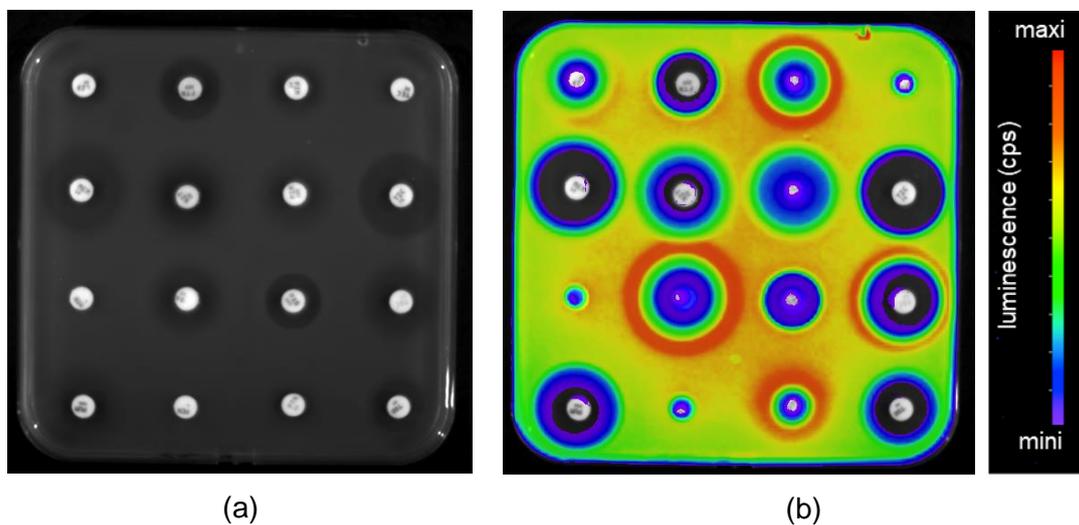


Figure 4 : AntibioGramme à la lumière visible (a) et luminogramme mesuré à l'aide d'une caméra CCD à haute sensibilité (b) (crédit : C.Merlin, LCPME)

Le rayon d'induction maximale du promoteur bactérien peut être déterminé en mesurant la distance entre le centre du disque et l'endroit sur la gélose pour lequel l'intensité de

luminescence est maximale. Il est aussi possible de tracer le facteur d'induction en fonction de la distance par rapport au disque (figure 5).

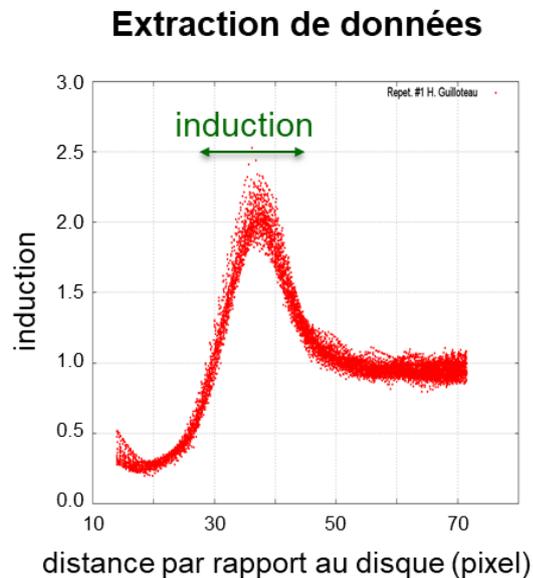


Figure 5 : Exemple de traitement de données permettant d'obtenir l'induction de luminescence émise en fonction de la distance par rapport au disque (crédit : C. Merlin, LCPME)

Ce genre d'expérimentations a permis d'identifier les promoteurs de l'élément mobile SXT spécifiquement régulés par des antibiotiques à concentrations sub-CMI. L'un de ces promoteurs ( $P_{S086}$ ), impliqué dans la régulation centrale de l'élément SXT, s'est avéré particulièrement bien répondre au stress génotoxique. Cependant, si cette approche permet d'identifier des promoteurs régulés par un antibiotique donné, elle ne permet pas d'identifier directement la concentration maximale inductrice. En effet, pour cela il faudrait connaître la concentration des antibiotiques en tout point de la gélose après diffusion. L'objectif principal de cette thèse était d'utiliser des modèles de diffusion pour prédire les concentrations autour du disque et notamment au niveau de la zone couvrant le maximum d'induction. Pour cela, des simulations numériques ont été effectuées au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP). Ce dernier étudie le génie chimique dans son ensemble avec par exemple l'étude des processus couplés de transfert de matière, de chaleur et d'écoulements.<sup>24</sup> Les simulations des phénomènes de diffusion ont été réalisées au sein de l'équipe «Génie Chimique des Milieux Rhéologiquement Complexes » (GEMICO) dont l'un des axes d'étude est dédié aux transferts de matière dans les milieux complexes. Dans le but de poser les jalons de cette thèse, la méthode de résolution des phénomènes de diffusion par les simulations numériques est présentée dans le chapitre E.

## E. SIMULATIONS NUMÉRIQUES DES PHÉNOMÈNES DE DIFFUSION

### 1. Équation de conservation de la masse

L'équation de continuité se retrouve en réalisant un bilan de matière sur une particule fluide de volume infinitésimal de dimensions  $dx$ ,  $dy$ ,  $dz$  (figure 6)<sup>25</sup> :

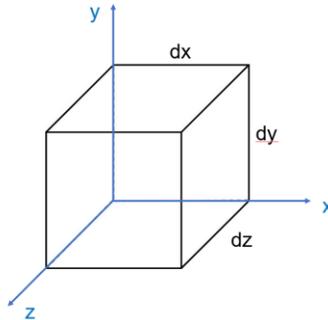


Figure 6 : Volume infinitésimal dans un repère cartésien

Le bilan de masse s'écrit :

$$\text{Entrée} + \text{Production} = \text{Sortie} + \text{Accumulation}$$

On suppose le fluide non réactif ; la **production** est donc nulle.

L'**accumulation** de masse de fluide par unité de temps dans le volume d'étude est définie par :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} dx dy dz \quad (1)$$

avec  $\rho$  = masse volumique en  $\text{kg/m}^3$  et  $t$  le temps

De plus, les composantes du vecteur vitesse de la particule fluide  $V$  dans les directions  $x$ ,  $y$  et  $z$  sont notées  $u$ ,  $v$  et  $w$ . Le terme d'**entrée** est égal à la somme des débits massiques traversant les faces de la particule fluide situées dans les trois directions de l'espace :

$$\rho u|_{x,y,z} (dydz) + \rho v|_{x,y,z} (dxdz) + \rho w|_{x,y,z} (dxdy) \quad (2)$$

Et le terme de **sortie** est défini par :

$$\rho u|_{x+dx,y,z} (dydz) + \rho v|_{x,y+dy,z} (dxdz) + \rho w|_{x,y,z+dz} (dxdy) \quad (3)$$

En remplaçant les termes dans le bilan de matière, l'équation suivante est obtenue :

$$\left[ \frac{\partial}{\partial x} (\rho u) dx \right] dydz + \left[ \frac{\partial}{\partial y} (\rho v) dy \right] dxdz + \left[ \frac{\partial}{\partial z} (\rho w) dz \right] dxdy + \frac{\partial \rho}{\partial t} dx dy dz = 0 \quad (4)$$

En divisant chaque terme par le volume infinitésimal cartésien  $dx dy dz$ , l'équation de continuité pour un fluide compressible en coordonnées cartésiennes est obtenue :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} \rho u + \frac{\partial}{\partial y} \rho v + \frac{\partial}{\partial z} \rho w = \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot \rho V = 0 \quad (5)$$

Dans le cas d'un fluide incompressible,  $\rho$  est une constante indépendante du temps et de l'espace et l'on obtient :

$$\frac{\partial}{\partial x} u + \frac{\partial}{\partial y} v + \frac{\partial}{\partial z} w = \nabla \cdot V = 0 \quad (6)$$

## 2. Équations de conservation de la quantité de mouvement

L'équation d'Euler correspond à l'équation de mouvement d'un fluide en négligeant les forces visqueuses<sup>25</sup> :

$$\rho \frac{DV}{Dt} = -\nabla P + \rho g \quad (7)$$

avec  $P$  : pression au centre du volume de contrôle

$g$  : accélération de la pesanteur

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + u \frac{\partial}{\partial x} + v \frac{\partial}{\partial y} + w \frac{\partial}{\partial z} \quad (8)$$

Les équations d'Euler permettent de résoudre tous les problèmes d'hydrostatique ( $V=0$ ) pour lesquels le bilan des forces s'écrit :

$$\nabla P = \rho g \quad (9)$$

Dans le cas d'un fluide en mouvement au sein d'un tube de section constante, la perte de pression entre deux points distants dans la direction de l'écoulement prévue par les équations d'Euler est nulle. Mais ce résultat ne tient pas compte des frottements entre le fluide et les parois du tube ou entre deux couches de fluide.

Pour tenir compte de ces frottements, il est nécessaire de rajouter les forces visqueuses dans l'équation d'Euler qui sont séparées en deux parties : une composante normale à la surface et analogue aux forces de pression et des forces de cisaillement parallèles à la surface. L'expression de la force de frottement est définie par la formule de Newton :

$$F = \mu.S.\frac{du}{dz} \quad (10)$$

avec  $\mu$  la viscosité dynamique,  $S$  la surface des particules fluides et  $u$  la vitesse de déplacement des particules fluides

La viscosité dynamique se définit comme le coefficient de proportionnalité qui caractérise « la force à exercer pour déplacer les particules fluides les unes par rapport aux autres ». <sup>26</sup> Elle s'exprime généralement en Pa.s.

En admettant la viscosité du fluide  $\mu$  constante (fluide newtonien), les équations de Navier-Stokes <sup>25</sup> s'expriment :

$$\frac{DV}{Dt} = -\frac{1}{\rho}\nabla P + \nu\nabla^2 V + \frac{1}{3}\nu\nabla(\nabla.V) + g \quad (11)$$

avec  $\nu = \mu/\rho$  la viscosité cinématique

Pour un fluide incompressible de viscosité constante, les équations deviennent :

$$\frac{DV}{Dt} = -\frac{1}{\rho}\nabla P + \nu\nabla^2 V + g \quad (12)$$

La forme usuelle de l'équation de Navier-Stokes est :

$$\rho\left[\frac{\partial V}{\partial t} + V\nabla V\right] = -\nabla P + \mu\nabla^2 V + \rho g \quad (13)$$

Les équations de continuité (conservation de la masse) (6) et de Navier-Stokes (13) peuvent alors être écrites dans tous les systèmes de coordonnées.

### 3. Utilisation des simulations numériques

#### a. Résolution des équations de conservation de la masse et de Navier-Stokes

Les équations de conservation de la masse et de Navier-Stokes sont des équations aux dérivés partielles non linéaires qu'il n'est pas possible de résoudre analytiquement pour la plupart des problèmes d'ingénieur. <sup>27</sup> En revanche, il est possible d'obtenir des solutions informatiques approximatives en utilisant des logiciels de dynamique des fluides numérique (CFD pour « Computational Fluid Dynamics »). Ces logiciels permettent également de traiter les équations de conservation de l'énergie qui ne seront pas évoquées dans cette thèse.

## b. Logiciels de CFD

Différents logiciels de CFD sont disponibles sur le marché tels que ANSYS Fluent<sup>®</sup>, COMSOL Multiphysics<sup>®</sup>, ou Star CCM+<sup>®</sup>. Ils permettent de modéliser des « phénomènes physiques d'écoulement fluide, de turbulence, de transfert de chaleur et de réaction chimique. »<sup>28</sup>. Leurs applications industrielles sont variées : écoulement d'air autour d'une aile d'avion, combustion à l'intérieur d'un four, flux sanguin, etc. Il est en outre possible de simuler l'écoulement des fluides à une ou plusieurs phases.<sup>29</sup>

## 4. Diffusion

En s'appuyant sur les équations de conservation de la masse et de la quantité de mouvement, la CFD permet d'étudier les phénomènes de transferts de matière.<sup>25</sup> Le transfert de matière est défini comme le transfert d'une espèce chimique d'un endroit où elle est très concentrée à un endroit où sa concentration est moindre. On suppose un mélange binaire d'espèces  $A$  et  $B$ . Dans le cas de l'étude d'une surface fixe, le flux molaire s'écrit :

$$N_A = C_A u_A \quad (14)$$

avec  $c_A$  la concentration molaire du corps  $A$  et  $u_A$  la vitesse du corps  $A$  par rapport à un repère stationnaire

La vitesse molaire moyenne est alors définie par :

$$u^* = \frac{C_A u_A + C_B u_B}{C_A + C_B} = x_A (N_A + N_B) \quad (15)$$

où  $C_B$ ,  $u_B$  et  $N_B$  sont respectivement la concentration, la vitesse et le flux molaire de l'espèce  $B$  et  $x_A$  est la fraction molaire de l'espèce  $A$

Le flux molaire relatif  $J_A^*$ , exprimé dans un repère évoluant à la vitesse molaire moyenne, s'exprime :

$$J_A^* = C_A (u_A - u^*) \quad (16)$$

Le passage du repère stationnaire au repère mobile s'écrit

$$N_A = C_A u^* + J_A^* \quad (17)$$

avec  $C_A u^*$  le flux convectif proportionnel à  $u^*$  et tenant compte des entrées et sorties de la substance  $A$

En admettant le milieu isotrope (invariance des propriétés physiques du milieu en fonction de la direction), on peut utiliser la loi de Fick :

$$J_A^* = -D_{AB}\nabla C_A \quad (18)$$

Le signe négatif témoigne du passage des molécules d'une forte concentration à une faible concentration.  $D_{AB}$ , exprimé en  $m^2/s$ , représente la diffusivité moléculaire de  $A$  dans le mélange binaire. Cette dernière se définit comme « l'énergie de diffusion ramenée à la masse en cause et considérée pendant un certain temps ». Elle représente aussi la « variation dynamique en fonction de la concentration massique volumique ». <sup>30</sup>

La loi de Fick (18) est une relation linéaire entre le flux molaire relatif  $J_A^*$  et le gradient de concentration  $-\nabla C_A$  (figure 7.a). Lorsque le temps de diffusion augmente (en passant de  $t_1$  à  $t_2$ ), la diminution de la concentration de l'espèce couvre une plus grande distance pour un flux molaire relatif constant (figure 7.b).

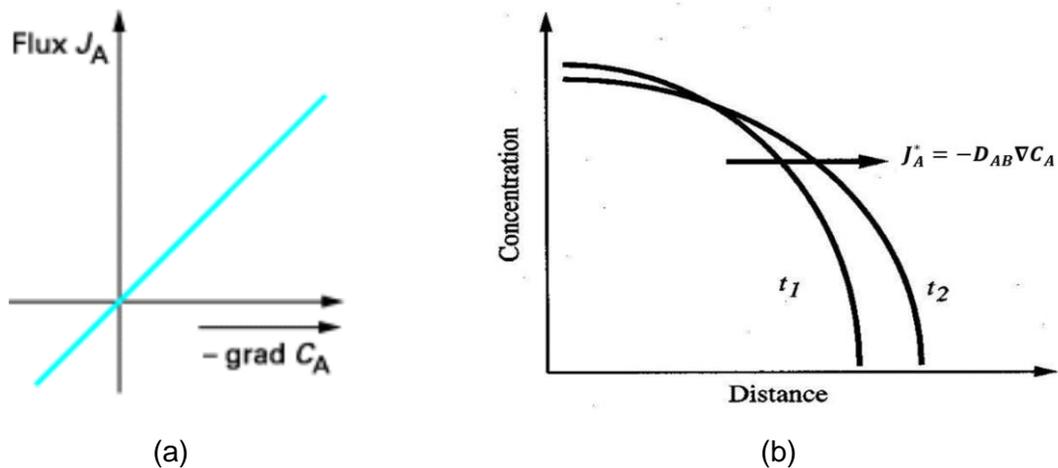


Figure 7 : Flux de diffusion en fonction du gradient de concentration pour un mélange binaire (a)<sup>31</sup> et variation de la concentration d'une espèce en fonction de la distance pour différents temps de diffusion (b)<sup>32</sup>

La loi de Fick exprimée dans le repère stationnaire s'écrit<sup>25</sup> :

$$N_A - x_A(N_A + N_B) = -D_{AB}\nabla C_A \quad (19)$$

Si l'on considère que l'espèce  $A$  est en faible concentration ( $x_A \ll 1$ ), l'équation de conservation de  $A$  dans le mélange binaire s'écrit :

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + \nabla C_A u = R_A + D_{AB}\nabla C_A \quad (20)$$

où  $R_A$  est un terme source décrivant la production (ou disparition) de l'espèce  $A$  lors d'éventuelles réactions chimiques

En absence de réaction chimique, l'équation de conservation de la matière devient :

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + u \nabla C_A = D_{AB} \nabla^2 C_A \quad (21)$$

De plus si le milieu est immobile ( $u = 0$ ), ce qui est le cas au sein d'un solide, le transfert de l'espèce  $A$  est purement diffusif et s'écrit :

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 C_A \quad (22)$$

Il s'agit de la seconde loi de Fick.

Ces problèmes de diffusion sont résolus en régime transitoire avec des méthodes mathématiques analytiques (séparation des variables, transformée de Laplace par exemple) et des méthodes numériques.

Afin d'appréhender plus spécifiquement l'utilisation des simulations numériques dans la description des phénomènes de diffusion d'antibiotiques en milieu gélosé, une étude présentant les grands principes de tels travaux est décrite dans le chapitre F.

## F. ÉTAT DE L'ART SUR LA DIFFUSION D'ANTIBIOTIQUES DANS L'AGAR (MANIPULATIONS ET SIMULATIONS NUMÉRIQUES)

Chandrasekar et al. se sont intéressés en 2015 aux phénomènes de diffusion d'un antibiotique dans l'agar et à la modélisation de l'inhibition bactérienne par cet antibiotique.<sup>33</sup> Leur étude, qui a aidé à choisir la stratégie à employer pour cette thèse, est présentée ci-dessous. La molécule utilisée est la nisine, un antibiotique servant de conservateur dans l'industrie alimentaire.

### 1. Caractérisation de la Nisine

L'article de Chandrasekar et al. (2015) montre que la nisine peut être caractérisée via un essai de diffusion.<sup>33</sup> Cette technique consiste à creuser des puits dans un lit d'agarensemencé par des bactéries et à injecter des solutions de nisine de concentrations différentes dans ces puits. Les rayons d'inhibition sont ensuite mesurés pour les différentes concentrations en antibiotique et une courbe représentant le rayon d'inhibition en fonction de la concentration en nisine est tracée. En théorie, plus la concentration en nisine est élevée, plus le rayon de la zone d'inhibition est élevé.

Des optimisations de la méthode de caractérisation ont été proposées comme celle décrite par Lalpuria et al. (2012) : elle consiste à réaliser une pré-diffusion de la solution de nisine à 4°C pendant 48h avant de lancer l'incubation à 30°C.<sup>34</sup> Cette technique permet d'améliorer la précision et la sensibilité de la quantification de la nisine lorsque la bactérie utilisée est *Micrococcus luteus*. Ce résultat suggère l'intérêt de développer un essai de diffusion dans l'agar soumis à deux températures différentes.<sup>33</sup> En 2004, Sebti et al. ont étudié le phénomène de diffusion de la nisine dans le gel d'agarose et ont ainsi pu développer un modèle mathématique utilisant la loi de Fick.<sup>35</sup> Ce dernier permet de déterminer le coefficient de diffusion pour la gélose incubée à plusieurs températures.

### 2. Simulation de deux processus de diffusion successifs

La pré-diffusion à 4°C permet d'initier la diffusion de la nisine avant que la croissance bactérienne ne débute.<sup>33</sup> Les solutions analytiques existent pour l'équation de pré-diffusion avec des coordonnées cylindriques et permettent de décrire la concentration locale en nisine comme une fonction du temps.

Lors de la diffusion à 30°C, les conditions initiales sont fonction de la position considérée. Ainsi, les solutions analytiques standards ne peuvent pas être utilisées pour prédire la concentration de la nisine. Des méthodes numériques sont alors utilisées pour résoudre les

équations différentielles telles que la méthode des éléments finis. Dans cette méthode, un espace continu est divisé en petits éléments de géométrie donnée, les mailles. Un maillage fin permet d'obtenir des résultats précis mais implique un temps de calcul conséquent. Il est donc important d'optimiser le maillage en fonction de la précision et du temps de calcul souhaités. Le but de la méthode des éléments finis est ainsi de transformer un problème continu en un problème discret. Dans cette étude, elle permet de prédire le rayon d'inhibition dans l'essai de diffusion de l'agar soumis à deux températures. Cette méthode a été décrite par Lalpuria et al en 2012.<sup>34</sup>

La résolution du phénomène de diffusion à 30°C est réalisée sur COMSOL Multiphysics® qui utilise la méthode des éléments finis pour résoudre les équations différentielles intervenant dans les problèmes physiques.<sup>33</sup> Après avoir modélisé la géométrie de la boîte de Petri, différentes simulations sont effectuées avec des concentrations en nisine allant de 0,625 à 125 µg/mL pour une concentration en antibiotique nulle dans la gélose.

### 3. Détermination des diffusivités aux deux températures d'étude

Sebti et al. ont montré, en 2014, que la diffusion de la nisine à travers la gélose d'agar est un processus de transfert de masse pouvant être décrit par la seconde loi de diffusion de Fick qui est rappelée ci-dessous<sup>35</sup> :

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = D_{AB} \frac{\partial^2 c_A}{\partial z^2} \quad (23)$$

Le phénomène de diffusion à résoudre sur COMSOL Multiphysics® est donc basé sur la seconde loi de Fick.

De plus, la détermination du flux de nisine au sein de la gélose en régime permanent passe par l'équation suivante :

$$N_{A_z} = -D_{AB} \frac{dc_A}{dz} = cste \quad (24)$$

Il n'y a pas de flux aux limites du modèle géométrique car il n'y a pas de pertes de nisine. La condition de flux nul aux limites implique donc la relation suivante :

$$-n \left( -D_{AB} \frac{dc_A}{dz} \right) = 0 \quad (25)$$

La diffusivité de la nisine (D) dans le gel d'agarose à différentes températures a été calculée par Sebti et al. Cette grandeur satisfait à la relation d'Arrhenius. Ainsi, le calcul des valeurs de diffusivité à 4°C et 30°C peut être réalisé en utilisant l'équation de régression linéaire suivante :

$$\ln D = -6729 \left( \frac{1}{T} \right) - 0,3621 \quad (26)$$

La diffusivité trouvée à 4°C est de  $1,92 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  et celle trouvée à 30°C est  $15,77 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ .

#### 4. Détermination de la CMI de la nisine contre *Micrococcus luteus*

La CMI est déterminée expérimentalement avec l'essai de diffusion dans l'agar à deux températures évoqué précédemment et décrit par Lalpuria et al. en 2012.<sup>34</sup>

Les boîtes de Petri contenant les puits chargés en antibiotique sont incubées à 4°C pendant 48h puis à 30°C pendant 48h. L'apparition ou l'absence de zones d'inhibition est ensuite détectée visuellement et la CMI est identifiée en considérant la plus petite concentration en antibiotique pour laquelle une zone d'inhibition est observable. La CMI ainsi obtenue est de  $0,156 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$  soit  $4,651 \cdot 10^7 \text{ mol}/\text{m}^3$ .<sup>33</sup>

#### 5. Détermination du temps critique ( $T_c$ ) pour la croissance de *M. luteus*

En 1946, Cooper et Woodman ont montré que la formation d'une zone d'inhibition nécessite un temps d'incubation inférieur au temps critique pour lequel la population microbienne présente dans l'agar devient plus grande que la quantité pouvant être inhibée par la CMI en nisine.<sup>36</sup>

La méthode proposée par Linton en 1958 est utilisée pour évaluer le temps critique  $T_c$ .<sup>37</sup> Les bactéries sontensemencées dans un milieu de culture jusqu'à ce que la densité optique mesurée à 600 nm soit comprise entre 1,6 et 1,7 (ce qui correspond à environ  $3 \cdot 10^8 \text{ UFC}/\text{mL}$ ).<sup>38</sup> Deux puits de chacune des quatre boîtes testées sont initialement incubés à 30°C pour différents temps de croissance bactérienne  $t$  (1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7h). Après incubation, 15  $\mu\text{L}$  d'une solution de nisine d'une concentration égale à la CMI sont ajoutés dans les puits et une nouvelle incubation d'une durée de 48h est réalisée à 30°C. Le rayon d'inhibition est ensuite mesuré ( $z$ ) en faisant la moyenne des quatre rayons d'inhibition obtenus via les quatre boîtes testées. Enfin, le carré du rayon d'inhibition ( $z^2$ ) est tracé en fonction de  $t$  pour obtenir une relation linéaire. Le temps critique  $T_c$  correspond au temps d'incubation pour lequel  $z$  est nul (absence d'inhibition).

Plus le temps d'incubation initial  $t$  augmente, plus le rayon d'inhibition diminue.<sup>33</sup> Cette diminution continue jusqu'à  $t = T_c$ . Dans l'étude, lorsque  $z$  est nul,  $T_c$  est égal à 7,03 heures pour *M. luteus*.

## 6. Détermination du rayon d'inhibition

L'évolution de la concentration en nisine en fonction de la distance par rapport au puits du dépôt, pour un temps de croissance égale au  $T_c$  (7h), est tracée sur COMSOL Multiphysics® pour toutes les concentrations en nisine initiales testées allant de 0,625 à 125 µg/mL.<sup>33</sup> Pour ces simulations, la diffusivité trouvée à 4°C est utilisée pour la période de pré-diffusion de 48h puis la diffusivité trouvée à 30°C est utilisée pour le temps de croissance restant. La distance entre le centre du puits et la position où la concentration est égale à la CMI déterminée expérimentalement donne alors le rayon d'inhibition. Ensuite, le rayon d'inhibition est tracé en fonction de la concentration initiale en nisine. Cette courbe est comparée à celle déterminée par Lalpuria et al. en 2012 via les mêmes concentrations initiales en nisine et des rayons d'inhibition mesurés expérimentalement.<sup>34</sup> Ainsi, une concordance est observée entre la valeur prédite et la valeur expérimentale pour la gamme de concentrations testée ( $R^2 = 0,984$ ). La diffusion de Fick permet donc bien d'expliquer le phénomène de diffusion étudié.

## G. BUT DU TRAVAIL ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Le but de ce travail de thèse était d'étudier la possibilité d'améliorer la méthode de criblage développée au LCPME (exposition de biosenseurs bactériens luminescents à des gradients de concentration en antibiotique, voir chapitre D), notamment en déterminant la concentration à laquelle un antibiotique inducteur est actif. Pour cela, la stratégie expérimentale proposée s'est orientée vers la modélisation de la diffusion des antibiotiques en gélose afin de pouvoir proposer une valeur de concentration en fonction de la distance parcourue par l'antibiotique depuis son dépôt sur la gélose. Mettre en place une telle approche suppose nécessairement de pouvoir vérifier les modélisations proposées et requiert donc quelques points spatiaux critiques, pour lesquels les concentrations en antibiotique sont connues. Avec l'approche utilisée pour le criblage, deux points spatiaux sont facilement identifiables dans le gradient de diffusion, la limite du halo d'inhibition dont la concentration est égale à la CMI et la zone d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  pour laquelle la concentration en antibiotique peut être déterminée *in vitro*.

Dans l'étude de Chandrasekar et al. (2015), l'utilisation d'un logiciel de dynamique des fluides numérique a permis de résoudre le phénomène de diffusion, précédé d'une pré-diffusion, via la méthode des éléments finis.<sup>33</sup> Cette méthode permet d'obtenir, de manière numérique, le rayon d'inhibition de l'antibiotique pour une bactérie donnée en s'appuyant sur des données déterminées expérimentalement : la CMI de l'antibiotique et les rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux. Une méthodologie semblable a été utilisée dans cette thèse pour prédire les concentrations actives en antibiotique (CMI et concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ ). Des manipulations ont d'abord été réalisées au LCPME pour trouver la CMI et la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  en milieu liquide. À la suite de cela, l'étude de la diffusion de différentes quantités d'un antibiotique donné au sein d'un tapis bactérien gélosé a permis de déterminer les rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  correspondants. Enfin, des simulations numériques ont été entreprises au LRGP pour retrouver les rayons d'inhibition bactérienne, via la CMI trouvée expérimentalement, en faisant varier la diffusivité de l'antibiotique. C'est la concordance entre les rayons d'inhibition bactérienne expérimental et numérique qui permettra de valider la méthode automatisée de détermination des concentrations actives en antibiotique. Il est à noter que la connaissance de la concentration et du rayon pour lesquels l'induction du promoteur  $P_{S086}$  est maximale aurait également pu servir à l'élaboration du modèle de détermination des concentrations actives.

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### A. MANIPULATIONS EN MICROBIOLOGIE (RÉALISÉES AU LCPME)

#### 1. Préparation des milieux LB liquide, top agar et agar

25 g de bouillon LB (« lysogeny broth »), composé de Tryptone à 10 g/L, extrait de levure à 5 g/L et NaCl à 10 g/L sont ajoutés à 1 L d'eau déminéralisée sous agitation. Le milieu LB liquide obtenu est ensuite stérilisé à l'autoclave (120°C pendant 15 minutes).

0,7 g d'agar sont ajoutés à 100 mL de LB liquide sous agitation afin d'obtenir une solution de « LB top agar » à 0,7%. 6 g d'agar sont ajoutés à 400 mL de LB liquide sous agitation afin d'obtenir une solution de « LB agar » à 1,5%. Ces préparations sont ensuite stérilisées à l'autoclave (120°C pendant 15 minutes).

#### 2. Souche bactérienne *E. coli* CM996 utilisée

Des biosenseurs bactériens ont été développés au LCPME pour exprimer de la bioluminescence après l'induction de promoteurs bactériens d'intérêt par les antibiotiques. Dans notre étude, nous avons utilisé la souche *E. coli* CM996, une souche dérivée de la souche de référence MG156 à laquelle s'ajoute une insertion de l'élément génétique mobile SXT et qui contient le promoteur P<sub>S086</sub> de l'élément SXT, fusionné aux gènes de bioluminescence *luxCDABE*. Le promoteur P<sub>S086</sub> contrôle un gène régulateur qui gouverne l'expression des fonctions de mobilité de SXT. Ce promoteur est connu pour être induit par le stress génotoxique lui-même généré par l'exposition à des quinolones ou fluoroquinolones, par exemple. À des concentrations inférieures à la CMI, de tels antibiotiques peuvent donc induire le promoteur P<sub>S086</sub> et favoriser la dissémination de l'élément génétique mobile SXT, vecteur de différentes résistances aux antibiotiques.

#### 3. Préparation d'une solution de ciprofloxacine

L'antibiotique choisi pour cette étude est la ciprofloxacine qui fait partie du groupe des fluoroquinolones et peut ainsi induire le promoteur P<sub>S086</sub>. Une solution de ciprofloxacine à 1 mg/mL est préparée à partir de ciprofloxacine commerciale provenant du laboratoire Fluka® (Référence : 17850-5G-F).<sup>39</sup> Pour ce faire, 1 mg de ciprofloxacine commerciale est dissous dans 1 mL de NaOH à 0,1 M puis la solution obtenue est stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22 µm de porosité.

#### 4. Étude de la diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu LB gélosé inoculé par *E. coli* CM996

##### a. Exposition de la souche CM996 à des gradients de diffusion de ciprofloxacine

45 mL de « LB agar » à 1,5% sont coulés dans une boîte de Petri carrée de 12 cm de côté puis le tout est stocké à température ambiante entre trois et quatre jours avant l'essai. Le « LB top agar » est ensuite remis en surfusion et maintenu à 42°C la nuit, tout comme le LB liquide. Les biosenseurs bactériens sont maintenus sur milieu sélectif puis cultivés pendant la nuit (environ 18 heures) dans 2 à 3 mL de LB liquide sans antibiotique à 30°C sous une agitation de 160 rpm. Pour l'inoculation, un mélange de 500 µL de culture de nuit, 5,5 mL de LB liquide et 12 mL de « LB top agar » est réalisé puis versé sur la boîte contenant déjà du « LB agar » gélosé pour former un tapis homogène qui se solidifie rapidement à température ambiante. Une gamme de 15 concentrations en ciprofloxacine est préparée. Pour chaque concentration, 10 µL sont prélevés et utilisés pour imbiber un disque de cellulose d'un diamètre de 6 mm (Dutscher®, référence : 074074) à une doses définie. Un disque commercial, contenant 5 µg de ciprofloxacine (Bio-Rad®, référence : 68648), est aussi utilisé comme témoin pour s'assurer de la bonne préparation des disques. Les 16 disques imbibés de ciprofloxacine sont ensuite déposés directement sur le tapis bactérien selon le schéma présenté sur la figure 8.

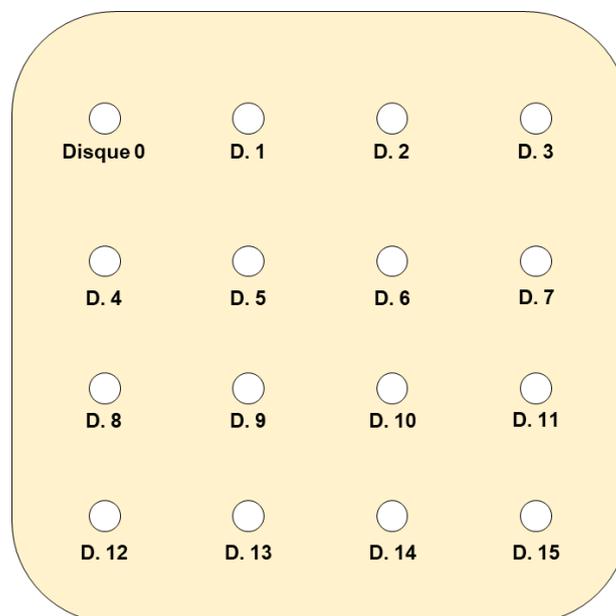


Figure 8 : Schéma de l'emplacement des disques imbibés de ciprofloxacine sur le tapis bactérien

Dans ce travail, deux gammes de concentration en ciprofloxacine sont étudiées. Le choix des concentrations en ciprofloxacine considérée pour la seconde gamme est motivé par les résultats obtenus avec la première série d'expériences et les quantités massiques de

ciprofloxacine contenues dans chacun des disques de ces deux séries d'expériences sont présentées dans le chapitre III. Pour chaque série d'expériences, trois boîtes de Petri (triplicata) sont préparées selon le schéma ci-dessus (figure 8) avec des colonies différentes de la même souche d'*E. coli* par boîte (répétitions biologiques). Pour chacune des répétitions d'une série d'expériences, des solutions identiques de ciprofloxacine sont utilisées. Après dépôt des disques, les trois boîtes sont incubées à l'étuve à 30°C pendant 7 heures (série d'expériences 1) ou 7 heures et 30 minutes (série d'expériences 2) puisqu'il a été estimé au laboratoire qu'un temps d'incubation d'au moins 7 heures était suffisant pour atteindre un rapport optimal entre le signal émis et le bruit de fond.

#### b. Mesures d'intensités de luminescence émises par la souche CM996

Des photographies avec mesure d'intensité de luminescence pour chaque pixel photographié sont effectuées toutes les 30 minutes à partir de deux heures d'incubation et jusqu'au temps d'incubation défini ci-dessus. L'objectif est de déterminer l'évolution des rayons d'inhibition de croissance bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  au cours du temps d'incubation (et donc de la diffusion de la ciprofloxacine). La prise de photographies et la mesure de luminescence en milieu solide sont réalisées à l'aide d'une caméra CCD à comptage de photon (NightShade LB 985<sup>®</sup>, Berthold Technologies<sup>®</sup>).<sup>40</sup> Il s'agit d'un système d'imagerie équipé d'une armoire étanche à la lumière et d'une caméra CCD à haute sensibilité. Ce système permet ainsi de mesurer la luminescence émise par un objet et de la restituer sous forme d'une image où chaque pixel conserve la mémoire du nombre de photons reçus. Cette technologie est associée à un logiciel permettant de récupérer et de manipuler les images de luminescence émise. Le traitement des données d'imagerie a été automatisé par le Professeur C. Pradalier (Georgia Tech Lorraine).

Le rayon d'inhibition bactérienne peut être déterminé de manière précise en mesurant une différence de niveau de gris sur les photographies réalisées à la lumière visible. Les zones d'inhibition bactérienne apparaîtront plus foncées que le tapis bactérien car les photographies sont réalisées sur un fond noir visible à travers la gélose au niveau des halos d'inhibition. Le traitement informatisé des photographies permet d'identifier le rayon du halo d'inhibition comme étant la position par rapport au centre du disque où le niveau de gris dépasse un certain seuil. Ce seuil est lui-même calculé par un algorithme d'analyse à partir des intensités maximales et minimales des niveaux de gris de la photographie. L'analyse informatisée des données d'imagerie de luminescence permet, quant à elle, d'extraire les valeurs d'intensités maximales de luminescence et leur position par rapport au centre du disque (rayons d'induction maximale). L'algorithme d'analyse est également conçu pour extrapoler les valeurs

de bruit de fond de luminescence en tout point de l'image. Le rapport entre l'intensité maximale et le bruit de fond permet de calculer le facteur d'induction qui représente le niveau d'activation du promoteur  $P_{S086}$  pour une quantité d'antibiotique donnée.

## 5. Détermination de la CMI et de la concentration inductrice maximale en milieu liquide

Après avoir déterminé les rayons d'inhibition et d'induction maximale en milieu solide, il reste encore à déterminer les concentrations correspondantes, à savoir la CMI et la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ , pour pouvoir réaliser les simulations numériques. Ces concentrations sont définies en milieu LB liquide afin de pouvoir établir une correspondance avec les rayons d'intérêt également identifiés en milieu LB mais sous forme gélosé.

### a. Détermination de la CMI en ciprofloxacine vis-à-vis de *E. coli* CM996

Une méthode de micro-dilution est utilisée. Différents volumes d'une solution de ciprofloxacine, initialement à 1 mg/mL, sont déposés dans 13 tubes différents puis complétés à 5 mL avec du LB liquide de façon à obtenir la gamme de concentrations suivante :

- Tube 1 : 0,24 µg/mL
- Tube 2 : 0,16 µg/mL
- Tube 3 : 0,12 µg/mL
- Tube 4 : 0,08 µg/mL
- Tube 5 : 0,06 µg/mL
- Tube 6 : 0,04 µg/mL
- Tube 7 : 0,03 µg/mL
- Tube 8 : 0,02 µg/mL
- Tube 9 : 0,015 µg/mL
- Tube 10 : 0,01 µg/mL
- Tube 11 : 0,0075 µg/mL
- Tube 12 : 0,005 µg/mL
- Tube 13 : 0 µg/mL

5 µL d'une culture bactérienne de *E. coli* CM996 sontensemencés dans chacun des tubes qui sont ensuite incubés à 30°C sans agitation pendant 24h. L'apparition ou l'absence de turbidité est ensuite détectée visuellement. Cette manipulation est réalisée en quadrata (à partir de quatre colonies d'*E. coli* CM996 différentes).

b. Détermination du facteur d'induction et de la concentration en ciprofloxacine pour laquelle l'induction du promoteur P<sub>S086</sub> est maximale

Deux colonies de la souche bactérienne *E. coli* CM996 sont cultivées dans 3 mL de LB liquide à 30°C pendant 16h +/- 2h. Une gamme de dilution d'une solution mère de ciprofloxacine à 1 mg/mL est également réalisée dans de l'eau stérile en alternant les dilutions  $\frac{2}{3}$  et  $\frac{3}{4}$  comme présenté dans le tableau I.

Tableau I : Recette de préparation de la gamme de dilution en ciprofloxacine

N° tube	[CIP] <sub>i</sub> (µg/mL)	Dilution	[CIP] <sub>i</sub> (µg/mL/puits)
1	76,8	N/A	1,92
2	51,2	$\frac{2}{3}$	1,28
3	38,4	$\frac{3}{4}$	0,96
4	25,6	$\frac{2}{3}$	0,64
5	19,2	$\frac{3}{4}$	0,48
6	12,8	$\frac{2}{3}$	0,32
7	9,6	$\frac{3}{4}$	0,24
8	6,4	$\frac{2}{3}$	0,16
9	4,8	$\frac{3}{4}$	0,12
10	3,2	$\frac{2}{3}$	0,08
11	2,4	$\frac{3}{4}$	0,06
12	1,6	$\frac{2}{3}$	0,04
13	1,2	$\frac{3}{4}$	0,03
14	0,8	$\frac{2}{3}$	0,02
15	0,6	$\frac{3}{4}$	0,015
16	0,4	$\frac{2}{3}$	0,01
17	0,3	$\frac{3}{4}$	0,0075
18	0,2	$\frac{2}{3}$	0,005
19	0,15	$\frac{3}{4}$	0,00375
20	0,1	$\frac{2}{3}$	0,0025
21	0,075	$\frac{3}{4}$	0,001875
22	0,05	$\frac{2}{3}$	0,00125

Dans le tube n°1, 50 µL de la solution mère de ciprofloxacine à 1 mg/mL sont ajoutés à 601 µL d'eau pour donner une solution de ciprofloxacine à 76,8 µg/mL. Dans le tube n°2, 300 µL d'eau sont ajoutés à 600 µL de la solution obtenue dans le tube 1 (dilution au  $\frac{2}{3}$  de la solution du tube 1). Dans le tube n°3, 250 µL d'eau sont ajoutés à 750 µL de la solution obtenue dans le tube 2 (dilution au  $\frac{3}{4}$  de la solution du tube 2). Le tube n°4 est préparé comme le tube n°2, le tube n°5 comme le tube n°3 et ainsi de suite...

5 µL de chacune des dilutions de ciprofloxacine sont déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits selon un plan bien précis (tableau II). Les nombres figurant dans le tableau II représentent les numéros des tubes de dilution de ciprofloxacine préparés au préalable (tableau I). Dans les puits ne contenant pas d'antibiotique, 5 µL d'eau sont déposés à la place.

Tableau II : Plan de dépôt des dilutions de ciprofloxacine dans les puits

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Culture sans ATB	LB sans bactérie
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Culture sans ATB	LB sans bactérie
H	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

Après dilution au 1/10<sup>ème</sup> des deux cultures (liées aux deux colonies d'*E. coli*) dans du LB préchauffé à 30°C (13,5 mL LB + 1,5 mL de culture), 195 µL de chaque culture diluée sont déposés dans les puits (lignes A à D de la microplaque pour la première culture et lignes E à H pour la seconde culture). Pour le LB sans bactérie, 195 µL de LB liquide sont déposés à la place. Pour chaque culture, les dilutions en ciprofloxacine, la culture sans antibiotique et le milieu LB sans bactérie sont étudiés en doublon. La plaque est ensuite incubée à 30°C puis l'intensité de luminescence émise, caractéristique de l'activité du promoteur P<sub>S086</sub>, ainsi que la densité optique de la biomasse à 600 nm sont mesurées dans chaque puits après 2h, 3h, 4h, 5h, 6h et 24h d'incubation. Le lecteur de microplaque utilisé est le Victor 1420 multilabel Counter<sup>®</sup> de Perkin Elmer<sup>®</sup>.<sup>41</sup>

Les données obtenues sont cependant biaisées par le bruit de fond issu du milieu LB sans bactérie. De façon à éliminer ce bruit de fond, les valeurs d'intensités de luminescence mesurées dans chaque puits de la microplaque sont corrigées en retranchant la valeur moyenne des intensités de luminescence mesurées dans les quatre puits du milieu LB sans bactérie. Pour l'intensité de luminescence corrigée, on obtient :

$$Lux \text{ corrigée} = Lux - Lux_0 \quad (27)$$

avec *Lux corrigée* = intensité de luminescence corrigée, *Lux* = intensité de luminescence mesurée dans le puits d'intérêt et *Lux<sub>0</sub>* = bruit de fond lié à la mesure de l'intensité de luminescence

De même, les valeurs de densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) mesurées dans chaque puits de la microplaque sont corrigées en retranchant la valeur moyenne des  $DO_{600}$  mesurées dans les quatre puits du milieu LB sans bactérie. Pour la densité optique à 600 nm corrigée, on obtient :

$$DO \text{ corrigée} = DO - DO_0 \quad (28)$$

avec  $DO \text{ corrigée}$  = Densité Optique à 600 nm corrigée,  $DO$  = Densité Optique à 600 nm mesurée dans le puits d'intérêt et  $DO_0$  = bruit de fond lié à la mesure de la Densité Optique à 600 nm

Pour chaque puits, une valeur de luminescence normalisée à la biomasse engagée peut ensuite être calculée en faisant le rapport entre l'intensité de luminescence corrigée et la densité optique à 600 nm corrigée :

$$\left(\frac{Lux}{DO}\right)_N = \frac{Lux \text{ corrigée}}{DO \text{ corrigée}} \quad (29)$$

Sachant que chaque dilution de ciprofloxacine est réalisée en doublon, des valeurs normalisées moyennes sont obtenues en prenant en compte ces deux doublons.

Le facteur d'induction est ensuite calculé en faisant le rapport entre la valeur normalisée moyenne d'intérêt (obtenue pour une concentration donnée) et la valeur normalisée moyenne de la culture sans antibiotique (obtenue pour la même culture bactérienne) :

$$\text{Facteur d'induction} = \frac{\left(\frac{Lux}{DO}\right)_N}{\left(\frac{Lux}{DO}\right)_N \text{ sans antibiotique}} \quad (30)$$

Ce dernier se définit comme le rapport entre le niveau induit et le niveau de base d'expression du promoteur  $P_{S086}$ . La concentration en ciprofloxacine pour laquelle l'induction du promoteur  $P_{S086}$  est maximale peut enfin être déterminée en traçant le facteur d'induction en fonction de la concentration en ciprofloxacine pour un temps d'incubation donné. Le facteur d'induction maximale donnera la concentration maximale inductrice du promoteur.

## B. SIMULATIONS NUMÉRIQUES (RÉALISÉES AU LRGP)

### 1. D'un domaine continu à discret

La stratégie utilisée en CFD est de remplacer des domaines continus en domaines discrets en les découpant en volumes élémentaires appelés mailles.<sup>27</sup> Ainsi, chaque grandeur de l'écoulement est définie par des valeurs discrètes au sein de chaque maille. Les valeurs aux autres endroits sont déterminées en interpolant les valeurs discrètes des mailles. Il faut en outre définir des conditions aux limites adaptées. La résolution des équations différentielles présentées dans le chapitre I.E peut être effectuée par différentes méthodes numériques telles que celle des différences finies ou la méthode des volumes finis.

### 2. ANSYS Fluent® et méthode de résolution des volumes finis

Le logiciel utilisé est ANSYS Fluent® qui utilise la méthode de résolution des volumes finis.<sup>27</sup> Pour expliquer cette méthode, il faut imaginer la grille comme un ensemble de mailles séparées par des nœuds, appelé maillage. Dans un modèle bidimensionnel, les mailles peuvent être rectangulaires ou triangulaires. Elles s'approcheront d'une forme hexaédrique, tétraédrique ou de prisme dans le cas d'un modèle tridimensionnel. Les équations de conservation sont appliquées sous forme intégrale au volume de contrôle défini par une maille pour obtenir des équations discrètes. L'intégrale de l'équation de conservation de la masse pour un flux incompressible est définie par :

$$\int_S \vec{V} \hat{n} dS = 0 \quad (31)$$

avec  $n$  la normale extérieure

Ainsi, le flux massique net traversant les frontières du volume de contrôle considéré est nul. Définissons un volume de contrôle sous la forme d'une cellule rectangulaire (figure 9) :

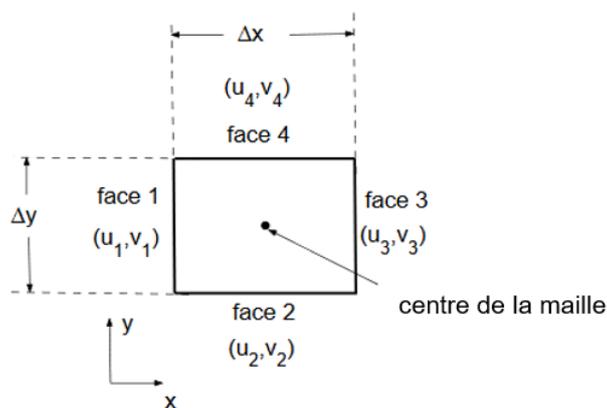


Figure 9 : Volume de contrôle rectangulaire

L'équation de conservation de la masse dans ce volume de contrôle s'écrit sous forme discrète :

$$-u_1\Delta y - v_2\Delta x + u_3\Delta y + v_4\Delta x = 0 \quad (32)$$

La masse est conservée dans la maille car le flux de masse net est nul. La résolution numérique est effectuée au centre de chaque maille et les valeurs des autres localisations sont obtenues par interpolation.

En chaque nœud sont écrites les équations discrètes de conservation et on impose les conditions aux limites sur les frontières du domaine. On obtient alors un système d'équations algébriques avec un nombre d'équations égal au nombre de variables discrètes indépendantes, qui est résolu par un algorithme numérique. Plus le nombre de nœuds est important, plus l'erreur numérique est réduite.

La finesse du maillage doit être ajustée de sorte que les calculs convergent, que les résultats soient indépendants du maillage, et que le temps de calcul soit raisonnable.

### 3. Validation des simulations numériques réalisées sur ANSYS Fluent®

Pour valider les simulations numériques réalisées avec ANSYS Fluent®, on considère une géométrie simplifiée pour laquelle une solution analytique est connue : le cas d'un solide cylindrique de longueur infinie placé dans un domaine infini, contenant un soluté de concentration initiale uniforme  $C_0$ .

L'évolution de la concentration à l'intérieur et autour du cylindre est gouvernée par l'équation de la diffusion, équation aux dérivées partielles exprimée en coordonnées cylindrique :

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r D_{AB} \frac{\partial C_A}{\partial r} \right) \quad (33)$$

La solution analytique de cette équation est donnée par CITER CRANCK et s'écrit<sup>42</sup>:

$$C_A = \frac{2C_0}{R^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_0(r\alpha_n)}{J_1^2(R\alpha_n)} \exp(-D_{AB}\alpha_n^2 t) \int_0^R r J_0(r\alpha_n) dr \quad (34)$$

où  $R$  est le rayon du cylindre,  $J_0$  et  $J_1$  sont les fonctions de Bessel du premier type d'ordre 0 et 1 respectivement et  $\alpha_n$  est la n-ième racine de l'équation

$$J_0(R\alpha_n) = 0 \quad (35)$$

La fonction de Bessel de premier type et d'ordre  $p$ , notée  $J_p$ , est définie par :

$$J_p(x) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n \left(\frac{x}{2}\right)^{2n+p}}{n!(n+p)!} \quad (36)$$

et est implémentée dans le logiciel de calcul Matlab®.

Le profil de concentration dans et autour d'un cylindre infini a ainsi été calculé avec la formule analytique (34) à l'aide du logiciel Matlab®. Les paramètres de simulation suivants, tirés partiellement de l'article de Chandrasekar et al. (2015), ont été utilisés<sup>33</sup> :

- Rayon du cylindre :  $R = 1,75 \text{ mm}$
- Concentration initiale dans le cylindre  $C_0 = 1,8734 \cdot 10^8 \text{ mol/m}^3$
- Diffusivité  $D_{AB} = 1,92 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$
- Temps de calcul  $t = 7h (25\ 200 \text{ s})$

En parallèle, une simulation numérique a été réalisée avec le logiciel ANSYS Fluent®, pour un cylindre de même rayon  $R$  constitué d'un matériau de même diffusivité  $D_{AB}$  avec une concentration initiale identique  $C_0$ . Le cylindre est fini mais de grande hauteur  $H$  et placé au sein d'un domaine cylindrique de grand rayon  $R_{dom}$ . Les paramètres suivants ont été employés :

- Domaine cylindrique de rayon :  $R_{dom} = 50 \text{ mm}$
- Hauteur du cylindre :  $H = 10 \text{ m}$
- Temps caractéristique de la diffusion  $t_{diff} = R/D_{AB} = 9,11 \cdot 10^4 \text{ s}$
- Pas de temps  $\Delta t = t_{diff} / 1000$
- Nombre d'itérations  $N = t/\Delta t$

La géométrie conçue avec le logiciel ANSYS Workbench Design Modeler® est présentée sur la figure 10.a. Cette géométrie est discrétisée avec le logiciel ANSYS Workbench Meshing® (figure 10.b) pour obtenir un maillage constitué de 5254 mailles hexaédriques et 8115 nœuds.

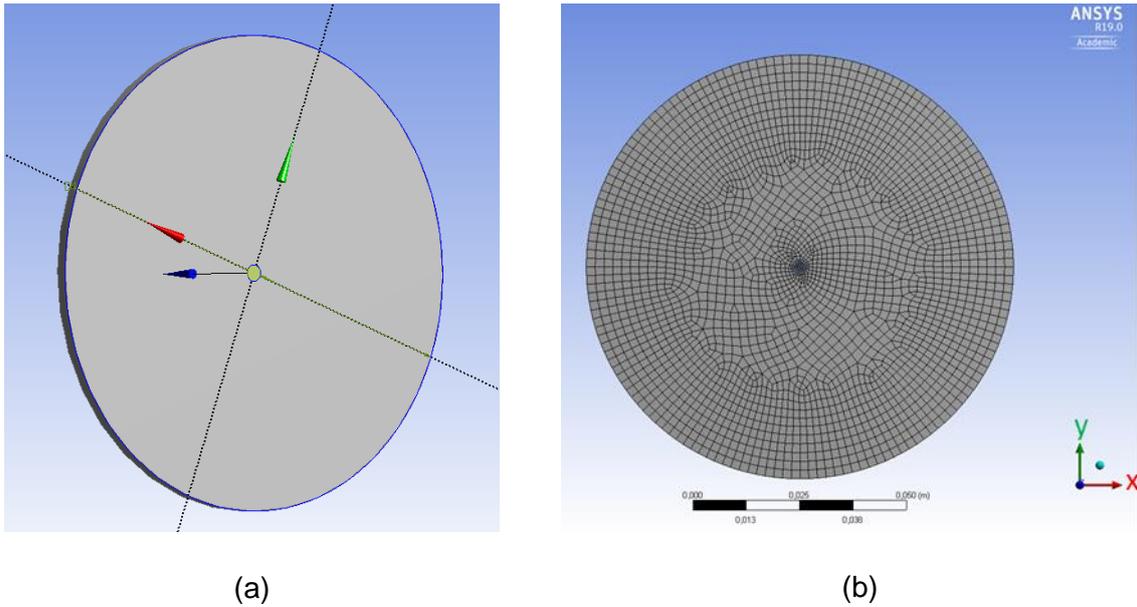


Figure 10 : Géométrie (a) et maillage (b) de la boîte de Petri (paramètres de l'article de Chandrasekar et al.)

Les termes convectifs de l'équation de Navier-Stokes (13) sont discrétisés avec un schéma du second ordre. L'interpolation de la pression est également effectuée avec un schéma du second ordre. Sur la figure 11, la concentration est alors tracée en fonction de la position radiale nommée ici  $x$ , à l'instant  $t = 7h$ . Les résultats analytiques (Matlab®) sont tracés en trait continu bleu et les résultats numériques (Fluent®) sont représentés par des carrés verts. On constate un très bon accord entre les deux courbes, ce qui permet de valider l'approche numérique avec le logiciel ANSYS Fluent®.

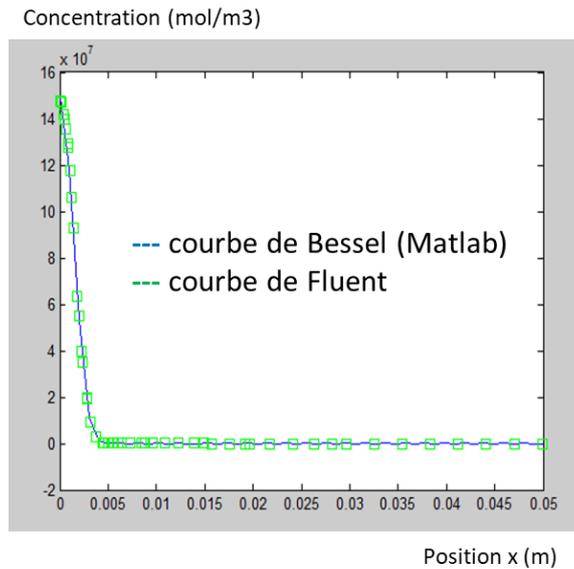


Figure 11 : Simulation des profils de concentration en fonction de la position  $x$  dans la boîte obtenue sur Matlab® et ANSYS Fluent®

#### 4. Simulations numériques de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu gélosé

Pour rappel, les simulations numériques visent à trouver les concentrations autour des disques imbibés d'antibiotique et notamment la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Pour valider les simulations numériques, il est nécessaire de retrouver les rayons d'inhibition bactérienne obtenus expérimentalement via la CMI également déterminée au laboratoire et en faisant varier la diffusivité jusqu'à trouver une valeur de diffusivité cohérente.

Pour pouvoir comparer les rayons numériques et expérimentaux, il est nécessaire que la géométrie définie dans les simulations numériques représente le plus fidèlement possible la boîte de Petri (« LB agar » à 1,5% + tapis bactérien) et les disques imbibés de ciprofloxacine utilisés lors des séries d'expériences.

##### a. Géométrie de la boîte de Petri (« LB agar » à 1,5% + tapis bactérien) et des disques

Avant de s'atteler aux simulations numériques, il est nécessaire de modéliser la géométrie. Ainsi, la boîte de Petri contenant le « LB agar » à 1,5% ainsi que les disques utilisés pour les séries d'expériences sont représentés à l'identique sur Fluent<sup>®</sup>. Les corps créés (objets modélisés sur Fluent<sup>®</sup>) et leurs dimensions sont présentés ci-dessous :

- Une boîte de Petri carrée de 12 cm de côté et 0,6 cm d'épaisseur avec des coins arrondis de 0,7 cm de rayon
- 16 disques de 0,6 cm de diamètre ( $D_{\text{disque}}$ ) et 0,05 cm de hauteur ( $H_{\text{disque}}$ ) : l'espace inter-disques est de 2,8 cm et l'espace entre les disques extérieurs et le bord de la boîte de Petri est de 1,8 cm

##### Remarques :

- L'épaisseur de la boîte de Petri comprend la couche de « LB agar » (0,5 cm) au fond de la boîte et celle du tapis bactérien (0,1 cm) au-dessus
- Les disques sont représentés enfoncés dans le « LB top agar » car ils ont tendance à s'immerger à la suite du dépôt (phénomène observé lors des manipulations)
- Chaque disque est défini par un corps spécifique distinct du corps de la gélose (afin de pouvoir inclure une concentration initiale en antibiotique différente dans chaque disque)

La boîte de Petri et les disques modélisés sont représentés sur la figure 12.

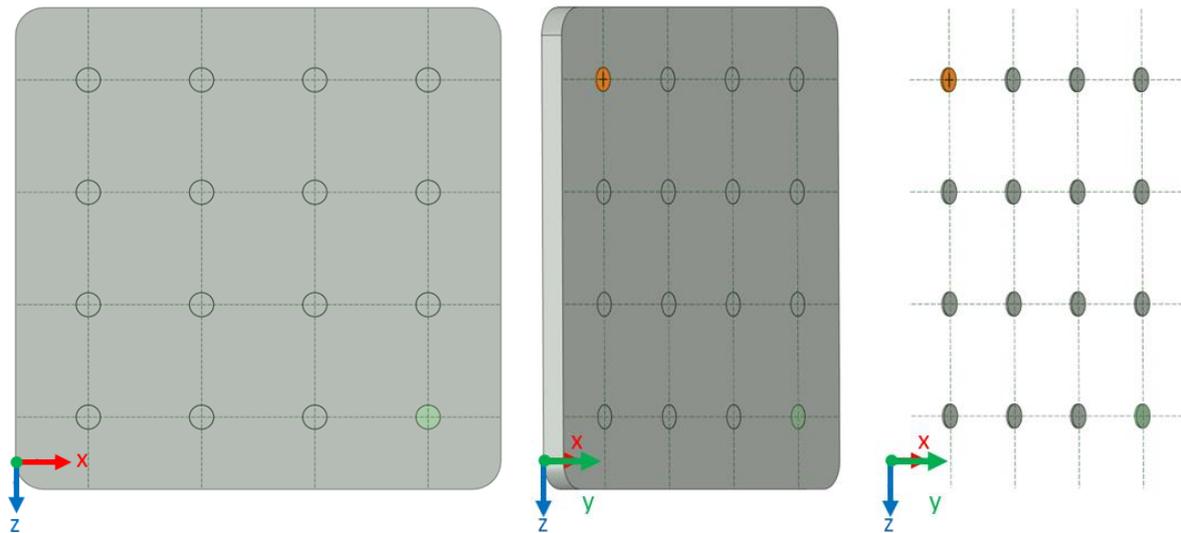


Figure 12 : Modélisation de la boîte de Petri (de face et de biais) et des disques sur Fluent®

#### b. Maillage de la géométrie obtenue (boîte de Petri + disques)

Il convient ensuite de découper la géométrie en un ensemble de mailles qui vont contenir toutes les valeurs discrètes des grandeurs de l'écoulement. Ainsi, la géométrie est découpée en 76 582 mailles triangulaires séparées par 17 984 nœuds. Pour l'étude de la concentration, les mailles représenteront les plus petites unités géométriques pouvant subir une variation de concentration. Le maillage est représenté sur la figure 13.

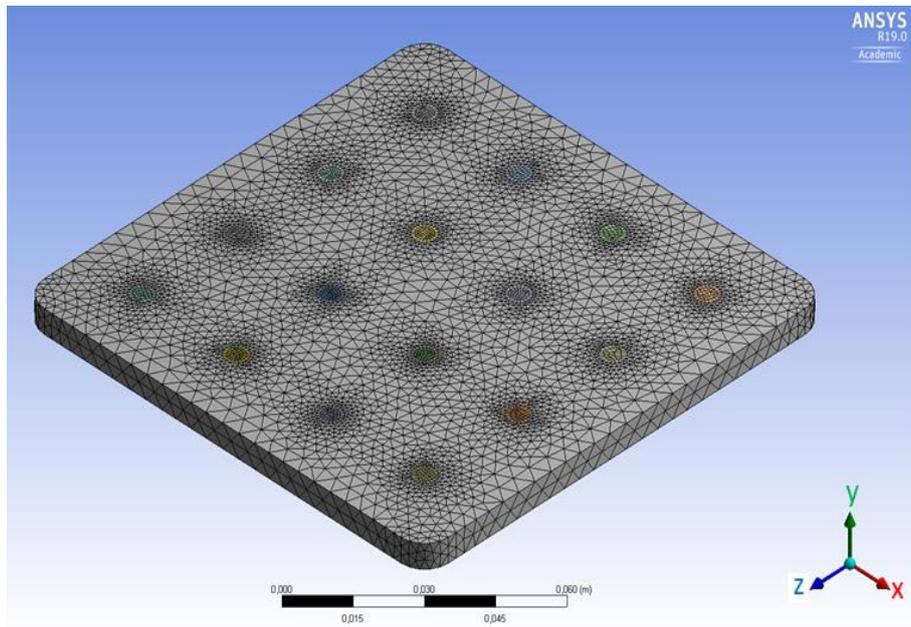


Figure 13 : Maillage de la boîte de Petri modélisée

### c. Configuration des paramètres utilisés pour les simulations numériques

Dans le but de représenter l'agar, un nouveau matériel est créé avec une densité de 1000 kg/m<sup>3</sup> et une viscosité dynamique de 0,001 kg/m.s (paramètres de l'eau définis par défaut). La diffusivité, désignée UDS (« User-Defined Scalar ») sur Fluent® et définie en kg/m.s, sera l'élément variable d'une simulation à l'autre.

L'initialisation des concentrations en antibiotique contenues dans les disques est réalisée selon les quantités déposées dans les disques (ces dernières sont détaillées pour chacune des deux séries expérimentales dans le chapitre III).

Au préalable, il est nécessaire de convertir les quantités (µg) en concentrations molaires (mol/m<sup>3</sup>). Pour ce faire, les quantités massiques de ciprofloxacine sont divisées par la masse molaire de la ciprofloxacine (331,35 g/mol), afin d'obtenir des quantités de matières qui sont alors divisées par le volume du disque. Ce dernier est calculé selon les dimensions mesurées au laboratoire :

$$V_{disque} = H_{disque} \cdot \frac{\pi \cdot D_{disque}^2}{4} = 0,0005 \cdot \frac{\pi \cdot 0,006^2}{4} = 1,41 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \quad (37)$$

Dans la configuration des temps de simulation, le premier paramètre à renseigner est le nombre de pas. Un nombre de pas élevé permet d'améliorer la précision des profils de concentration obtenus mais il nécessite un temps de calcul important si le temps de diffusion est élevé. En prenant en compte ce postulat et en sachant que le temps de diffusion est de 7 heures pour la première série d'expériences et 7,5 heures pour la seconde série d'expériences, le nombre de pas défini pour les simulations à réaliser dans le cadre de ce travail est choisi arbitrairement entre 250 et 300.

Le second paramètre à renseigner dans la configuration des temps de simulation est le nombre d'itérations. Il est calculé en faisant le rapport entre le temps de diffusion et le nombre de pas.

$$\text{nombre itérations} = \frac{\text{temps de diffusion}}{\text{nombre de pas}} \quad (38)$$

En choisissant un nombre de pas situé entre 250 et 300 (temps de simulation correct), le nombre d'itérations obtenu avoisine les 100. De telles valeurs sont choisies pour l'ensemble des simulations. Après avoir configuré tous ces paramètres, les simulations peuvent être lancées en faisant varier la diffusivité UDS.

### III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### A. DÉTERMINATION DE LA CMI EN CIPROFLOXACINE VIS-A-VIS DE E. COLI CM996

La CMI de la ciprofloxacine vis-à-vis de *E. coli* CM996 a été déterminée en milieu LB liquide en exposant la bactérie à une série de concentrations en ciprofloxacine allant de 0,24 à 0 µg/mL. Après 24 heures d'incubation à 30°C, une turbidité a été observée pour les concentrations en ciprofloxacine allant de 0,01 à 0 µg/mL, ce qui témoigne de la croissance bactérienne. Ainsi, la CMI obtenue est de 0,015 µg/mL (plus petite concentration étudiée sans turbidité), soit  $4,53 \cdot 10^{-5}$  mol/m<sup>3</sup> (pour une masse molaire de ciprofloxacine valant 331,35 g/mol).

#### B. DÉTERMINATION DU FACTEUR D'INDUCTION ET DE LA CONCENTRATION D'INDUCTION MAXIMALE DU PROMOTEUR P<sub>S086</sub>

L'intensité de luminescence émise et la densité optique de la biomasse à 600 nm ont été mesurés à différents temps d'incubation des deux cultures dans les puits de la microplaque contenant différentes concentrations en ciprofloxacine. Cette manipulation a été effectuée en triplicata par Abdelwahab SEGHIER, stagiaire lors du séjour au LCPME.<sup>43</sup> Après avoir calculé la moyenne des facteurs d'induction obtenus pour les trois répétitions, la courbe représentant le facteur d'induction moyen en fonction de la concentration en ciprofloxacine après 6h d'exposition a été tracée (figure 14). Pour chaque point de la courbe, l'écart-type des facteurs d'induction obtenues pour les trois manipulations est représenté.

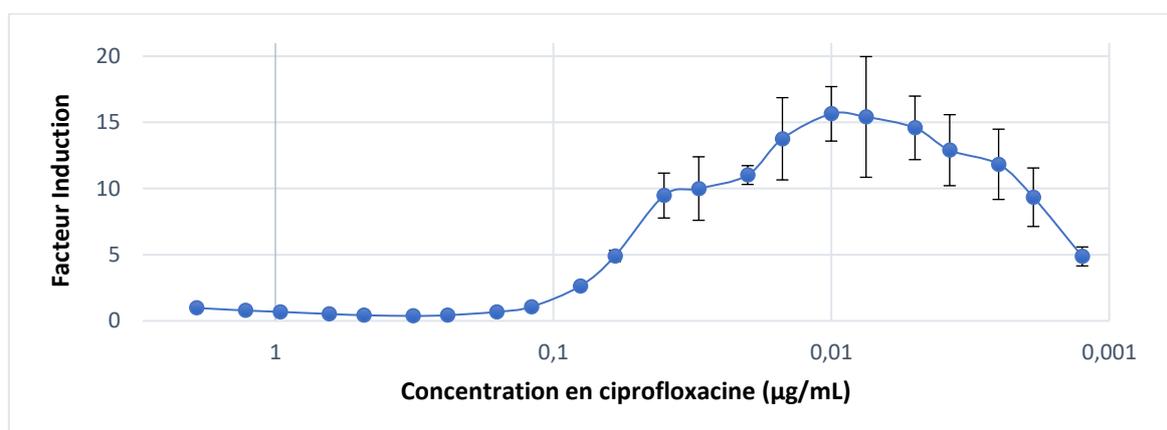


Figure 14 : Facteur d'induction après 6 heures d'exposition en fonction de la concentration en ciprofloxacine

Le facteur d'induction est étudié à 6h car il a été remarqué, lors de précédentes manipulations, que le niveau d'induction était maximal et que l'écart-type des mesures était minimal pour ce temps d'incubation dans les conditions expérimentales mises en œuvre.

Le facteur d'induction maximal est d'environ 15,5 et il est retrouvé pour une concentration en ciprofloxacine égale à 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , soit  $3,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol/m}^3$ . Cette concentration maximale inductrice du promoteur  $P_{S086}$  est cohérente puisqu'elle est inférieure à la CMI déterminée en milieu LB liquide (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ). La situation inverse n'est théoriquement pas possible car toute concentration supérieure à la CMI est censée être toxique contre les bactéries sensibles. Les écart-types du facteur d'induction sont plus importants pour une concentration en ciprofloxacine comprise entre 0,04  $\mu\text{g/mL}$  et 0,00125  $\mu\text{g/mL}$ . Ceci est attribué à de petites différences de concentration entre les trois répétitions pouvant entraîner des variations modérées du facteur d'induction. Ces valeurs d'écart-types ne semblent pas excessives et permettent d'apporter un bon niveau de confiance sur les facteurs d'induction calculés et ainsi sur la concentration maximale inductrice trouvée pour le promoteur  $P_{S086}$ .

## C. ÉTUDE DE LA DIFFUSION DE LA CIPROFLOXACINE DANS UN MILIEU LB GÉLOSÉ INOCULÉ PAR E. COLI CM996

### 1. Détermination des rayons d'inhibition et d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> après exposition à la ciprofloxacine (5 µg à 0,0003 µg)

#### a. Quantités massiques de ciprofloxacine étudiées

Dans une première série d'expériences (réalisée en triplicata), *E. coli* CM996 a été exposée à une série de disques de cellulose imbibés de ciprofloxacine et dont les quantités massiques initiales sont présentées sur la figure 15.

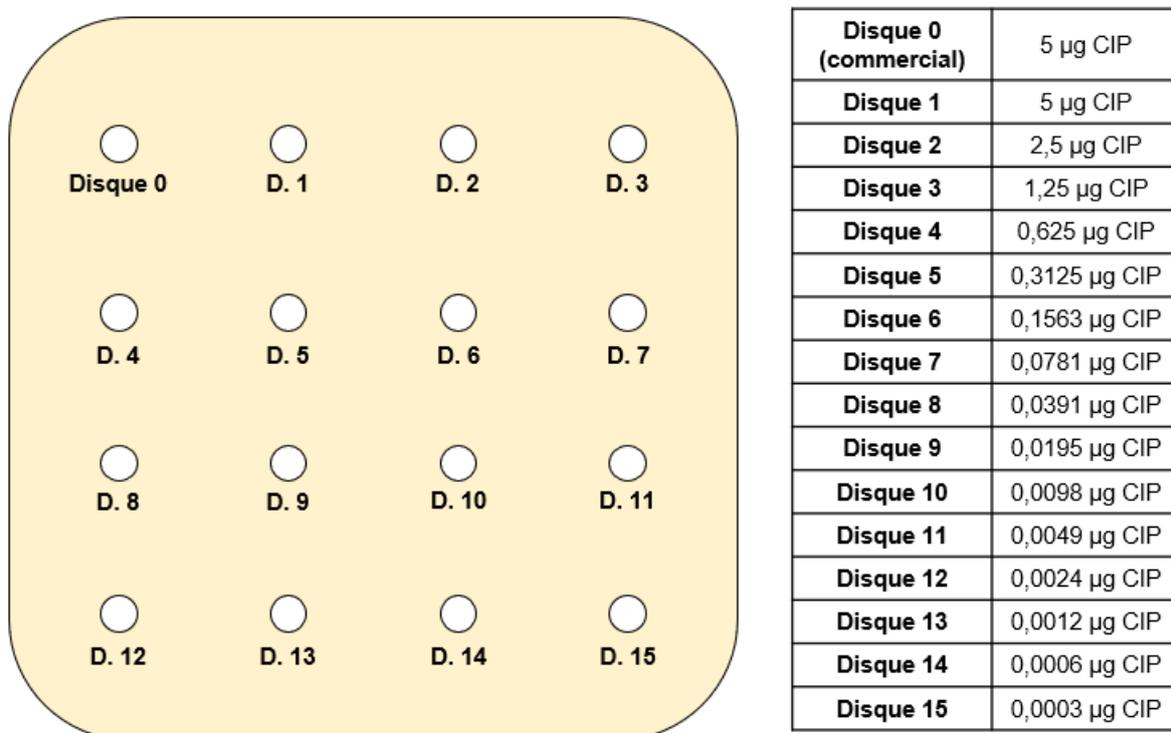


Figure 15 : Quantités de ciprofloxacine initialement imbibées dans les disques pour la première étude de diffusion

#### b. Obtention des rayons d'intérêt et du facteur d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> via les photographies à la lumière visible et les images de luminescence obtenues après 7 heures d'incubation des boîtes de Petri

L'inhibition d'*E. coli* CM996 par la ciprofloxacine se caractérise par l'observation, à l'œil nu, de halos d'inhibition sur les photographies prises à la lumière visible. Pour rappel, ces zones d'inhibition bactérienne apparaissent plus foncées que le tapis bactérien car les photographies sont réalisées sur un fond noir visible à travers la gélose en l'absence de bactéries. L'une des

photographies obtenues est présentée en exemple sur la figure 16. Des halos d'inhibition sont visibles autour des disques 0 à 10 et témoignent de l'inhibition bactérienne après 7 heures d'incubation. Les photographies obtenues pour les trois répétitions de l'expérience sont disponibles en annexe II. Le traitement informatique des photographies permet d'obtenir le rayon du halo d'inhibition qui est défini comme le rayon du cercle où le niveau de gris dépasse le seuil de base.

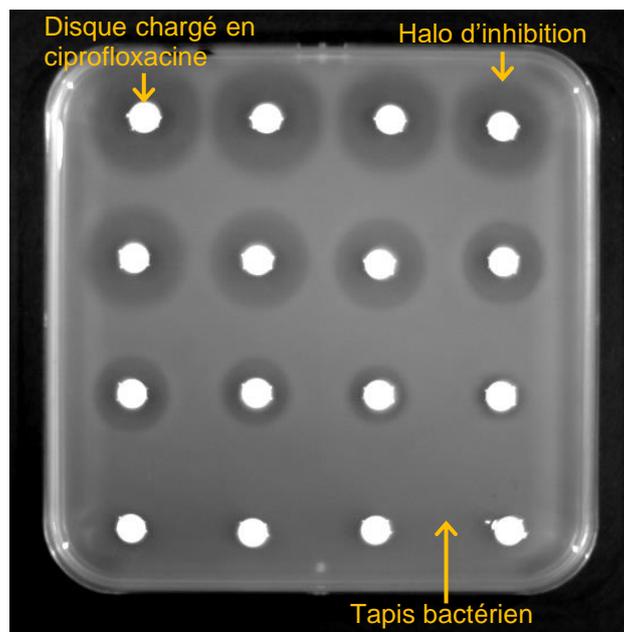


Figure 16 : Exemple de photographie obtenue à la lumière visible après 7 heures d'incubation (répétition 3)

L'induction du promoteur  $P_{S086}$  par la ciprofloxacine peut, quant à elle, être mise en évidence avec l'analyse informatique des données d'imageries de luminescence qui permet d'extraire les valeurs d'intensités maximales de luminescence et leur position par rapport au centre du disque. Un exemple d'image de luminescence obtenue après 7 heures d'incubation est présenté sur la figure 17. L'intensité de luminescence maximale, qui est représentée en rouge sur l'image, est visible pour les disques 0 à 7 et témoigne de l'induction du promoteur  $P_{S086}$ . Les rayons d'induction maximale de ce dernier sont obtenus en déterminant, de manière informatique, la position des intensités de luminescence maximales par rapport au centre du disque. L'algorithme d'analyse est également conçu pour récupérer les valeurs de bruit de fond de luminescence en tout point de l'image. Ainsi, le facteur d'induction, qui est défini comme le rapport entre l'intensité maximale et le bruit de fond local, peut aussi être tracé.

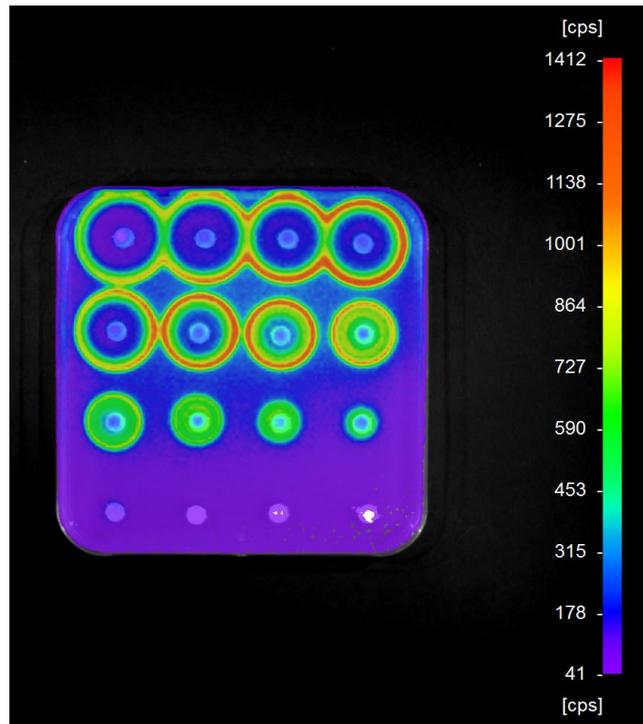


Figure 17 : Exemple d'image de luminescence obtenue après 7 heures d'incubation (répétition 3) (cps : coup par seconde)

c. Évolution de la toxicité et de l'induction du promoteur par la ciprofloxacine en fonction du temps d'exposition

Après traitement informatique des images obtenues, le rayon d'inhibition bactérienne, le rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  et le facteur d'induction de ce promoteur, obtenus dans l'expérience discutée ci-dessous, ont été tracés en fonction du temps d'incubation pour chaque quantité de ciprofloxacine déposée sur les disques et pour chaque répétition d'expérience. Dans notre étude, nous nous attendons à observer deux phénomènes : la présence d'induction caractérisée par un facteur d'induction non nul et l'obtention d'un rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  supérieur au rayon d'inhibition bactérienne comme attendu en théorie puisque l'induction de promoteurs bactériens a lieu à des concentrations inférieures à l'inhibition bactérienne. L'ensemble des courbes tracées pour la première série d'expériences est disponible en annexe III. Pour chacune des quantités initiales de ciprofloxacine imbibées dans les disques, les graphiques sont analysés visuellement afin de mettre en évidence ou non ces deux phénomènes. Un bilan des observations réalisées est présenté dans le tableau III.

Tableau III : Visualisation ou non des phénomènes d'inhibition et d'induction sur les graphiques tracés dans l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu LB gélosé

Disque	Quantité CIP ( $\mu\text{g}$ )	Présence d'induction du promoteur P <sub>S086</sub> (oui/non)	Rayon Induction Maximale Promoteur > Rayon Inhibition Bactérienne (oui/non)
0 et 1	5	Oui	Oui
2	2,5	Oui	Oui
3	1,25	Oui	Oui
4	0,625	Oui	Oui
5	0,3125	Oui	Oui
6	0,1563	Oui	Oui
7	0,0781	Oui	Oui
8	0,0391	Oui	Non
9	0,0195	Oui	Non
10	0,0098	Oui	Non
11	0,0049	Oui	Non
12	0,0024	Oui	Non
13	0,0012	Non	Non
14	0,0006	Non	Non
15	0,0003	Non	Non

Le tableau III montre que les deux phénomènes attendus sont observés pour une quantité initiale de ciprofloxacine comprise entre 5 et 0,0781  $\mu\text{g}$  (disques 0 à 7). Cependant, on peut noter une absence d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> pour une quantité initiale de ciprofloxacine inférieure ou égale à 0,0012  $\mu\text{g}$  (disques 13 à 15). De manière surprenante, le rayon d'inhibition bactérienne apparaît supérieur au rayon d'induction maximale pour une quantité initiale de ciprofloxacine inférieure ou égale à 0,0391  $\mu\text{g}$  (disques 8 à 15). Afin d'illustrer et d'expliquer chacun de ces trois cas de figure, des exemples sont présentés dans les paragraphes i, ii et iii ci-dessous.

i. Cas où les deux phénomènes attendus sont observés (quantités initiales de ciprofloxacine allant de 5  $\mu\text{g}$  à 0,0781  $\mu\text{g}$ ) et validation de la méthode de préparation des disques imbibés de ciprofloxacine

La présence d'induction du promoteur  $P_{S086}$  et l'obtention d'un rayon d'induction maximale de ce promoteur supérieur au rayon d'inhibition bactérienne sont observés pour des quantités initiales de ciprofloxacine comprises entre 5 et 0,0781  $\mu\text{g}$  (disque 0 à 7). Le type d'analyse réalisé est illustré avec la figure 18 représentant une série de données obtenues pour un disque commercial initialement chargé avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (disque 0).

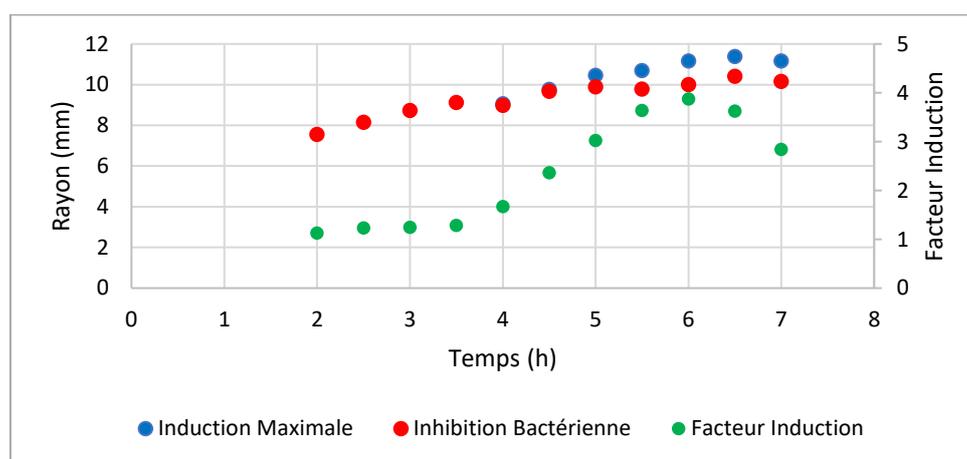


Figure 18 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour un disque commercial (témoin) chargé avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 2)

D'une part, la position du rayon d'inhibition bactérienne augmente au cours du temps d'incubation : il passe de 7,6 mm à 10,2 mm entre 2 heures et 7 heures d'incubation en restant globalement constant sur les derniers points du graphique à partir de 5 heures d'incubation. L'augmentation de ce rayon s'explique par le fait que le profil de concentration retrouvé aux différents temps d'incubation n'est pas encore stabilisé et que la ciprofloxacine continue de diffuser. Dès lors que le rayon d'inhibition devient constant à partir de 5 heures d'incubation, la CMI a atteint son rayon maximum et une diminution ultérieure de la concentration au cours de la diffusion ne permettra pas d'inhiber la croissance bactérienne. Par ailleurs, le facteur d'induction augmente au cours de l'incubation en passant de 1,1 à 2,8 entre 2 heures et 7 heures d'incubation. Une induction maximale de 3,9 est obtenue pour 6 heures d'incubation. Cette augmentation du facteur d'induction s'accompagne d'une hausse du rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  qui, indétectable pour un temps d'incubation inférieur à quatre heures, apparaît dépasser progressivement le rayon d'inhibition bactérienne en passant de 9,1 mm à 11,2 mm entre 4 heures et 7 heures d'incubation. Avant quatre heures de croissance bactérienne, le rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  ne présente pas de point sur

le graphique bien qu'il y ait forcément une position dans la boîte où une concentration générant l'induction du promoteur  $P_{S086}$  est présente. Il est possible que la variation de concentration soit trop rapide en début de diffusion de la ciprofloxacine pour qu'il y ait effectivement induction du promoteur contrôlant les gènes de luminescence. Il se peut également qu'il n'y ait pas assez de bactéries en début d'incubation pour détecter la bioluminescence émise.

Pour le disque non commercial également chargé avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine au départ (disque 1), la figure 19 montre que le facteur d'induction passe de 1,1 à 2,8 entre 2 et 7 heures d'incubation avec un maximum à 3,4 pour 6 heures d'incubation. De plus, le rayon d'inhibition bactérienne est de 10,8 mm après 7 heures d'incubation, ce qui est inférieur au rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  qui est de 11,9 mm. On observe donc les mêmes tendances pour les disques initialement imbibés de 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine commercial et non commercial et les valeurs des deux rayons d'intérêt et du facteur d'induction sont relativement proches. Cette comparaison permet de valider la méthode de préparation des disques chargés en ciprofloxacine.

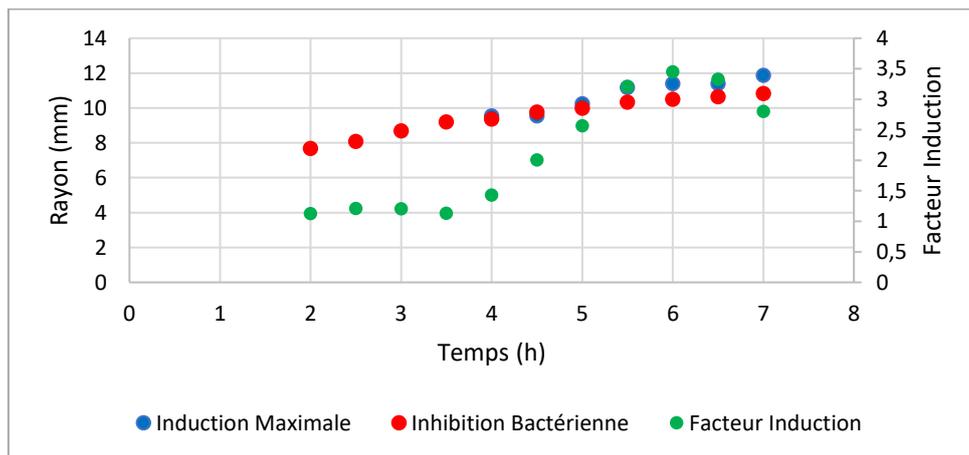


Figure 19 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour un disque non commercial chargé avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 2)

ii. Cas où le facteur d'induction du promoteur  $P_{S086}$  est nul (quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,0012 à 0,0003  $\mu\text{g}$ )

Pour des quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,0012 à 0,0003  $\mu\text{g}$  (disques 13 à 15), aucune induction du promoteur  $P_{S086}$  n'est observée comme le montre la figure 20 tracée pour le disque chargé initialement avec 0,0003  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (disque 15).

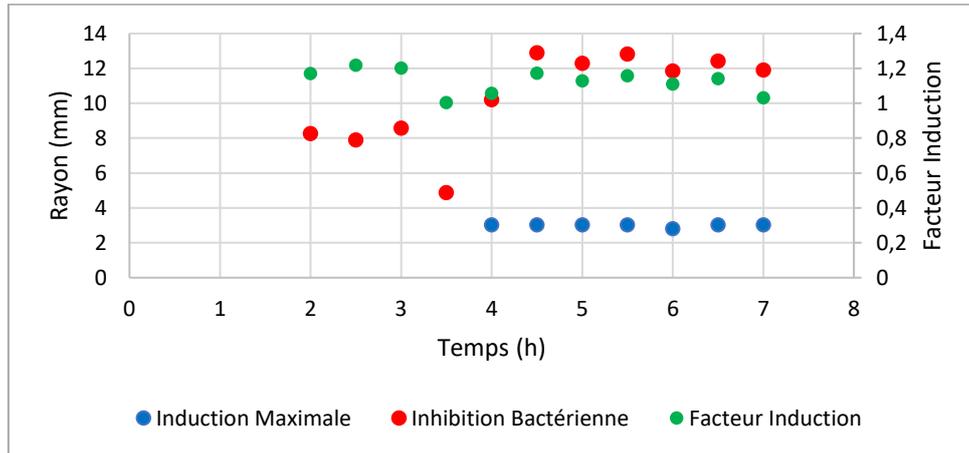


Figure 20 : Exemple d'inhibition bactérienne et d'induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour un disque non commercial chargé avec 0,0003  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 3)

Dans le but d'expliquer ce cas de figure, une investigation a été réalisée autour des valeurs utilisées pour le calcul du facteur d'induction. Pour cette étude de diffusion en milieu gélosé, le facteur d'induction est d'abord calculé pour chaque pixel autour du disque en faisant le rapport entre l'intensité de luminescence maximale du pixel et le bruit de fond théorique correspondant.

$$\text{Facteur d'induction du pixel} = \frac{\text{Intensité de luminescence maximale du pixel}}{\text{Bruit de fond théorique du pixel}} \quad (39)$$

Pour trouver le bruit de fond théorique du pixel, un échantillonnage de signal est réalisé automatiquement en dehors des zones de dépôt de disques, puis une fonction est ajustée numériquement afin de permettre le calcul du bruit de fond en tout point de la boîte. Le facteur d'induction moyen peut ensuite être déterminé en faisant la moyenne de tous les facteurs d'induction obtenus pour les pixels du rayon (autour du disque) où l'intensité est maximale.

Dans notre étude, la limite de détection de l'appareil de mesure utilisé est de 16 cps (coups par seconde) et sa limite de quantification est de 100 cps (avec une réduction notable de l'écart-type observée au-dessus de 300 coups par seconde). Ainsi, toute intensité de luminescence inférieure à 16 cps ne sera pas significative et toute intensité de luminescence comprise entre 16 cps et 100 cps donnera des valeurs erronées du fait de problèmes de

quantification. Il en est de même pour le bruit de fond correspondant. Si un seul des termes du facteur d'induction d'un pixel est erroné, ce dernier ne sera pas interprétable et devra être rejeté de l'étude. Dans le but d'expliquer l'absence d'induction pour les quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,0012 à 0,0003  $\mu\text{g}$  (disques 13 à 15), l'idée a donc été de voir s'il était possible d'atteindre des valeurs d'intensité de luminescence maximale et de bruit de fond supérieures à la limite de quantification et à partir de quel temps d'incubation. Pour faciliter cette étude, nous avons choisi de nous intéresser à la moyenne des intensités de luminescence maximales obtenues pour tous les pixels de la boîte et au bruit de fond moyen calculé en faisant la moyenne de tous les bruits de fond des pixels de la boîte.

Pour chacune des quantités de ciprofloxacine étudiées dans cette série, les temps d'incubation nécessaires pour obtenir des valeurs d'intensité de luminescence maximale moyenne et de bruit de fond moyen supérieures à la limite de quantification ont été relevés. Le temps requis pour avoir un facteur d'induction interprétable a alors pu être défini comme le temps d'incubation minimum conduisant à des valeurs de luminescence supérieures à la limite de quantification pour les deux paramètres considérés. Toutes les données obtenues sont compilées dans l'annexe IV. Il ressort de cette analyse que pour des quantités initiales de ciprofloxacine allant de 5 à 0,0049  $\mu\text{g}$  (disques 0 à 11), des données supérieures à la limite de quantification sont retrouvées aussi bien pour l'intensité de luminescence maximale moyenne que pour le bruit de fond moyen et cela pour des temps d'incubation inférieurs à 7 heures. Les facteurs d'induction peuvent donc être interprétés à partir de ces temps d'incubation. En revanche, pour des quantités initiales de ciprofloxacine comprises entre 0,0024 et 0,0003  $\mu\text{g}$  (disque 12 à 15), des valeurs inférieures à la limite de quantification sont observées pour le bruit de fond moyen et l'intensité de luminescence maximale moyenne durant les 7 heures d'incubation. Ceci peut paraître incohérent, mais s'explique par l'absence d'induction d'une part et par un bruit de fond moyen relativement bas pour ces boîtes de Petri. Les données observées pour les disques 12 à 15 sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Temps requis pour pouvoir interpréter le facteur d'induction du promoteur  $P_{S086}$  dans l'étude de la diffusion en milieu gélosé pour des quantités de ciprofloxacine allant de 0,024 à 0,0003  $\mu\text{g}$  (disques 12 à 15)

Diffusion CIP en milieu LB gélosé (manipulation 1)		Temps d'incubation requis pour avoir bruit de fond moyen > limite de quantification de 100 cps (h)	Temps d'incubation requis pour avoir intensité de luminescence maximale moyenne > limite de quantification de 100 cps (h)	Temps requis pour avoir un facteur d'induction interprétable (h)
Disque 12 0,0024 $\mu\text{g}$ CIP	Boîte 1	6	4	6
	Boîte 2	7	4,5	7
	Boîte 3	N/A	6	N/A
Disque 13 0,0012 $\mu\text{g}$ CIP	Boîte 1	6	5	6
	Boîte 2	7	7	7
	Boîte 3	N/A	N/A	N/A
Disque 14 0,0006 $\mu\text{g}$ CIP	Boîte 1	6	6	6
	Boîte 2	N/A	N/A	N/A
	Boîte 3	N/A	N/A	N/A
Disque 15 0,0003 $\mu\text{g}$ CIP	Boîte 1	6,5	6,5	6,5
	Boîte 2	N/A	N/A	N/A
	Boîte 3	N/A	N/A	N/A

À titre d'exemple, si l'on reprend le cas de la répétition 3 (boîte 3) présenté sur la figure 20, il apparaît que pour les disques 12 à 15, aucun des bruits de fond moyens ne dépasse la limite de quantification quel que soit le temps d'incubation. La même observation peut être faite pour les intensités de luminescence maximales moyennes pour les disques 13 à 15. En conséquence, les facteurs d'induction qui découlent de ces valeurs ne sont pas interprétables. Cette analyse permet donc de restreindre l'interprétation des facteurs d'induction aux quantités initiales de ciprofloxacine comprises entre 5 et 0,0049  $\mu\text{g}$  (disques 0 à 11).

iii. Cas où le rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  est inférieur au rayon d'inhibition bactérienne (quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,0391  $\mu\text{g}$  à 0,0003  $\mu\text{g}$ )

Comme déduit précédemment, les facteurs d'induction des quantités de ciprofloxacine allant de 0,0024 à 0,0003  $\mu\text{g}$  (disques 12 à 15) ne sont pas interprétables car l'intensité de luminescence émise et le bruit de fond moyen sont inférieurs à la limite de quantification dans au moins une répétition (boîte) pour ces quantités de ciprofloxacine. Il en est donc de même pour les rayons d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Pour des quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,0391  $\mu\text{g}$  à 0,0049  $\mu\text{g}$  (disques 8 à 11), l'augmentation du facteur d'induction ne s'accompagne pas d'une variation du rayon d'induction maximale et ce dernier ne semble pas dépasser le rayon d'inhibition bactérienne. Pour illustrer ce résultat surprenant, le graphique obtenu pour le disque chargé avec 0,0098  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (disque 10) est présenté sur la figure 21.

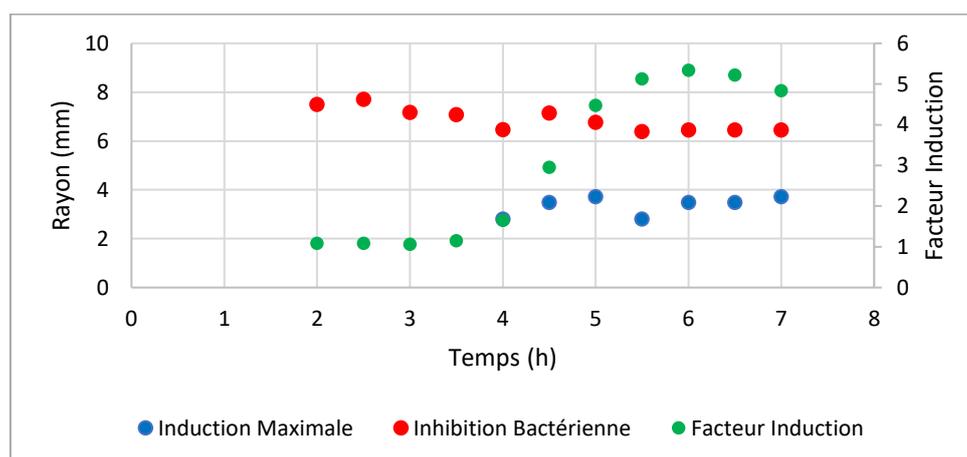


Figure 21 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour le disque chargé avec 0,0098  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 3)

Deux phénomènes inattendus sont observables sur la figure 21 : une décroissance du rayon d'inhibition bactérienne et la faible variation du rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Des investigations ont donc été réalisées pour expliquer ces phénomènes. Le rayon d'inhibition décroît au cours de l'incubation en passant d'environ 7,5 à 6,5 mm entre 2 et 7 heures d'incubation. Ce résultat est surprenant car la diffusion s'accompagne d'une répartition de la quantité initiale de ciprofloxacine sur une zone de plus en plus grande jusqu'à l'atteinte de la CMI. Pour trouver la cause de ce phénomène, une comparaison est effectuée entre les rayons d'inhibition mesurés à la règle de manière approchée sur les photographies obtenues à la lumière visible et ceux obtenus à la suite du traitement automatisé de ces photographies

pour différents temps d'incubation. Les photographies obtenues à la lumière visible prises pour des temps d'incubation de 2 et 7 heures sont présentées sur la figure 22.

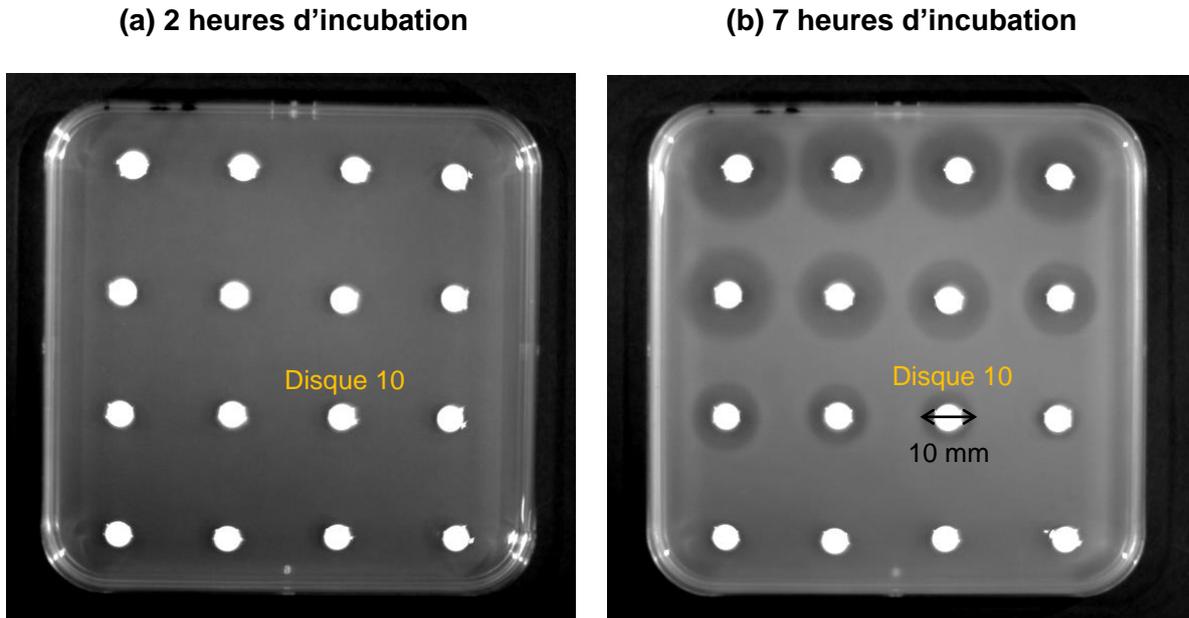


Figure 22 : Photographies à la lumière visible pour 2 (a) et 7 heures d'incubation (b) dans l'étude de diffusion de la ciprofloxacine en milieu gélosé (répétition 3)

On remarque qu'il n'y a pas de halo d'inhibition autour du disque 10 après 2 heures d'incubation, ce qui diffère du rayon d'inhibition d'environ 7,5 mm calculé par le logiciel de mesure et retrouvé sur la figure 21. En revanche, un halo d'inhibition d'environ 10 mm est mesuré autour du disque 10 pour un temps d'incubation de 7 heures, ce qui correspond à un rayon d'inhibition de 5 mm. Ce dernier est proche du rayon d'inhibition de 6,5 mm trouvé avec l'analyse automatisée de la photographie. Les rayons mesurés de manière approchée et ceux issus de l'analyse automatisée des photographies à la lumière visible, pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 0,0098  $\mu\text{g}$  (disque 10) et différents temps d'incubation, sont reportés dans le tableau V.

Tableau V : Comparaison des rayons d'inhibition bactérienne mesurés et issus de l'analyse automatisée de la photographie pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 0,0098 µg (disque 10) et différents temps d'incubation

Temps d'incubation (h)	Rayon d'inhibition bactérienne mesuré de manière approchée sur la photographie à la lumière visible (mm)	Rayon d'inhibition bactérienne issu de l'analyse automatisée de la photographie à la lumière visible (mm)
2	N/A	7,5
2,5	N/A	7,7
3	N/A	7,2
3,5	N/A	7,1
4	N/A	6,5
4,5	N/A	7,1
5	4	6,8
5,5	4,5	6,4
6	4,5	6,5
6,5	5	6,4
7	5	6,5

Pour 7 heures d'incubation, les rayons d'inhibition bactérienne mesurés via les deux méthodes sont proches (5 mm pour le rayon d'inhibition mesuré à la main et 6,5 mm pour l'autre rayon). La légère différence peut venir du fait que la mesure à la main est réalisée de manière approximative sur une photographie avec une règle. Pour des temps d'incubation allant de 2 à 4,5 heures d'incubation, l'absence de halo d'inhibition observable sur les photographies peut témoigner d'un temps de diffusion de la ciprofloxacine trop faible mais aussi d'un problème de contraste étant donné l'absence de croissance bactérienne visible comme le montre la figure 22.a. En revanche, l'analyse automatisée des images propose des rayons d'inhibition même quand aucune inhibition n'est observable à l'œil nu pour ces faibles temps d'incubation. Ceci s'explique par le fait que l'algorithme utilisé repose sur une variation des niveaux de gris entre une valeur minimum et une valeur maximum, et qu'aucun seuil n'a été fixé pour la valeur minimum. Il est donc nécessaire de ne pas prendre en compte les rayons d'inhibition calculés par l'analyse automatisée des images lorsque le temps d'incubation n'a pas encore permis la croissance d'un tapis bactérien détectable. D'après les données analysées ci-dessus, un temps d'incubation d'environ 5 heures permet d'avoir des résultats cohérents.

Pour aller plus loin, on constate que le rayon d'induction maximale du promoteur P<sub>S086</sub> ne croît pas au cours de l'incubation et reste à une valeur faible malgré l'augmentation du facteur d'induction qui passe d'environ 1,1 à 5,3 entre 3 et 6 heures d'incubation (figure 21). Pour comprendre ce phénomène, intéressons-nous de nouveau à la figure 17 représentant l'intensité de luminescence émise pour la répétition 3 (boîte 3) après 7 heures d'incubation. Sur cette image de luminescence, la couleur bleu foncé/violet représente le bruit de fond et la gamme de couleur comprise entre le bleu et le rouge représente une induction de luminescence de plus en plus intense avec une intensité maximale dans le rouge. Clairement,

l'induction apparaît diffuse et homogène pour les quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,0391 µg à 0,0049 µg (disques 8 à 11) contrairement aux quantités plus élevées retrouvées dans les disques des rangées supérieures où une zone discrète délimitant le maximum d'induction est observable. Cet aspect diffus de la zone d'induction ne permet donc pas d'identifier le rayon d'induction maximale du promoteur à proprement parler et montre que le logiciel d'analyse s'est arrêté sur le rayon où apparaît la luminescence en premier lieu.

Pour conclure, il semble donc que de faibles quantités initiales de ciprofloxacine associées à de faibles temps d'incubation génèrent des données erronées. Afin de ne pas inclure de telles données dans la suite de ce travail, tous les disques contenant initialement une quantité de ciprofloxacine inférieure ou égale à 0,0391 µg (disques 8 à 15) sont exclus.

#### d. Définition du domaine d'étude à considérer pour la seconde série d'expériences

Les quantités initiales de ciprofloxacine inférieures ou égales à 0,0024 µg (disques 12 à 15) n'aboutissent pas à l'obtention de facteurs d'induction du promoteur  $P_{S086}$  interprétables. De plus, pour une quantité initiale de ciprofloxacine inférieure ou égale à 0,0391 µg (disques 8 à 15), il n'est pas possible d'identifier un rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Les quantités initiales de ciprofloxacine pertinentes étant comprises entre 5 µg et 0,0391 µg, une seconde série d'expériences a été réalisée dans le but d'affiner la gamme de quantités de ciprofloxacine d'étude entre ces deux quantités.

## 2. Détermination des rayons d'inhibition et d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> après exposition à des quantités pertinentes de ciprofloxacine (5 µg à 0,04 µg)

### a. Quantités massiques de ciprofloxacine étudiées

Les quantités massiques de ciprofloxacine initialement imbibées dans chacun des disques, pour les trois boîtes de cette seconde série d'expériences (triplicata), sont présentées sur la figure 23.

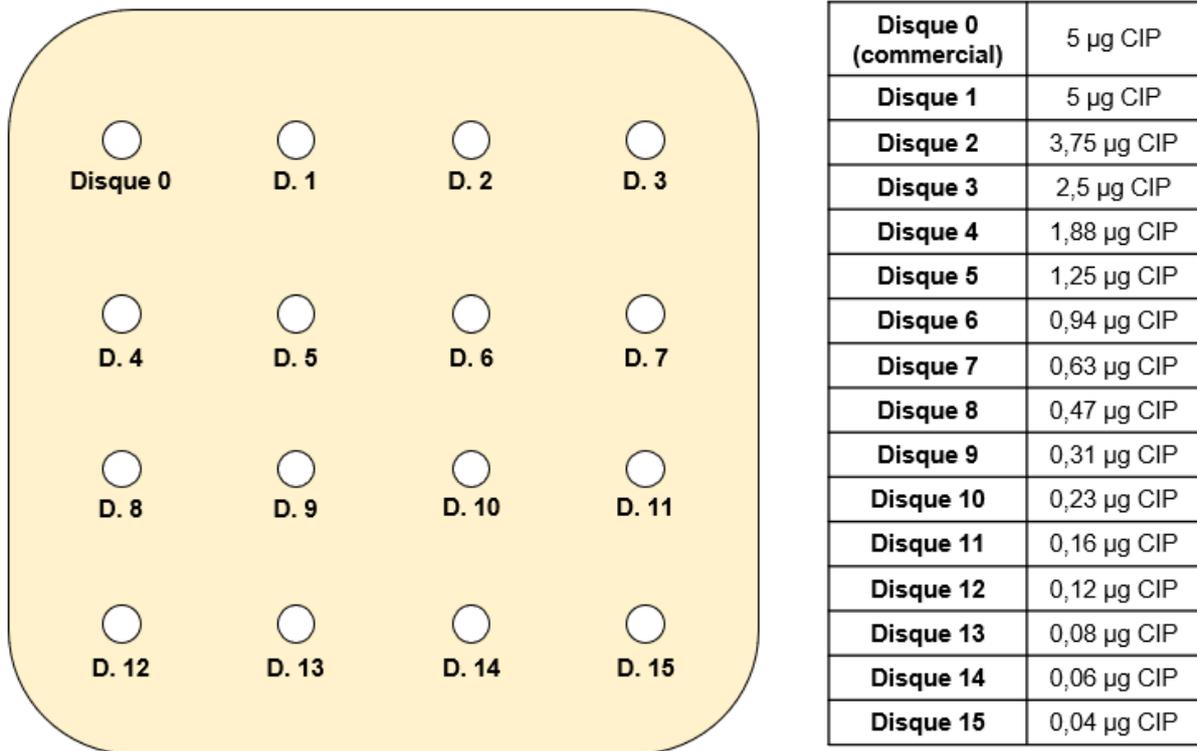


Figure 23 : Quantités de ciprofloxacine initialement imbibées dans les disques pour la seconde étude de diffusion

### b. Obtention des rayons d'intérêt et du facteur d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> via les photographies à la lumière visible et les images de luminescence obtenues après 7,5 heures d'incubation des boîtes de Petri

Comme illustré sur la photographie obtenue à la lumière visible et présentée sur la figure 24, des halos d'inhibition sont visibles autour de tous les disques étudiés (de 5 µg à 0,04 µg de ciprofloxacine) et témoignent de l'inhibition bactérienne après 7,5 heures d'incubation. Les photographies obtenues pour les trois boîtes de Petri sont disponibles en annexe V. Comme pour la première série d'expériences, le traitement automatisé des photographies permet d'obtenir le rayon du halo d'inhibition bactérienne. Par ailleurs, l'image de luminescence

donnée en illustration sur la figure 25 montre qu'après 7,5 heures d'incubation, l'intensité de luminescence maximale est visible pour les disques 0 à 10 (de 5  $\mu\text{g}$  à 0,23  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine) et témoigne de l'induction du promoteur  $P_{S086}$ . De la même manière que pour la première série d'expériences, l'analyse automatisée des données d'imagerie de luminescence permet de déterminer le rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  et le facteur d'induction.

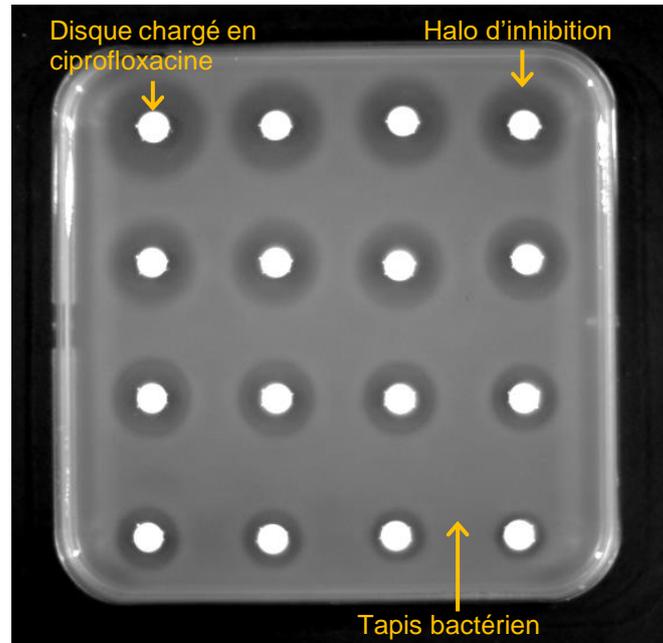


Figure 24 : Exemple de photographie obtenue à la lumière visible après 7,5 h d'incubation (seconde répétition)

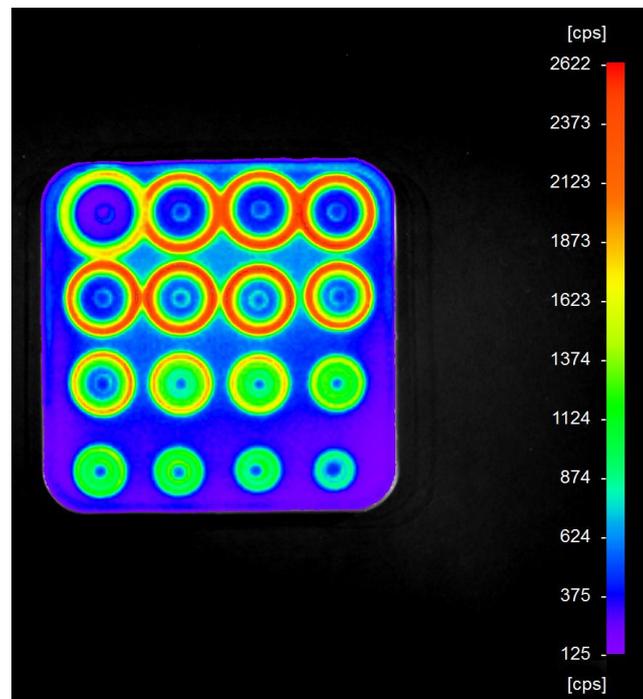


Figure 25 : Exemple d'image de luminescence obtenue après 7,5 heures d'incubation (répétition 2) (cps : coup par seconde)

c. Évolution de la toxicité et de l'induction du promoteur par la ciprofloxacine en fonction du temps d'exposition

Dans la continuité de la première série d'expériences, le rayon d'inhibition bactérienne, le rayon d'induction maximale du promoteur P<sub>S086</sub> et le facteur d'induction de ce promoteur ont été tracés en fonction du temps d'incubation pour chaque quantité de ciprofloxacine déposée dans les disques et pour chacune des trois répétitions. L'ensemble des courbes obtenues pour cette seconde série d'expériences est disponible en annexe VI. Après analyse visuelle des graphiques, un bilan des observations a été réalisé et est présenté dans le tableau VI.

*Tableau VI : Visualisation ou non des phénomènes d'inhibition et d'induction sur les graphiques tracés dans l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu LB gélosé*

Disque	Quantité CIP (µg)	Présence d'induction du promoteur P <sub>S086</sub> (oui/non)	Rayon Induction Maximale Promoteur > Rayon Inhibition Bactérienne (oui/non)
0 et 1	5	Oui	Oui
2	3,75	Oui	Oui
3	2,5	Oui	Oui
4	1,88	Oui	Oui
5	1,25	Oui	Oui
6	0,94	Oui	Oui
7	0,63	Oui	Oui
8	0,47	Oui	Oui
9	0,31	Oui	Oui
10	0,23	Oui	Oui
11	0,16	Oui	Oui
12	0,12	Oui	Non
13	0,08	Oui	Non
14	0,06	Oui	Non
15	0,04	Oui	Non

Le tableau VI montre que le facteur d'induction augmente et que le rayon d'induction maximale du promoteur P<sub>S086</sub> devient supérieur au rayon d'inhibition bactérienne au cours de l'incubation pour des quantités de ciprofloxacine allant de 5 µg à 0,16 µg (disques 0 à 11). Ces observations sont illustrées sur les figures 26 (disque commercial imbibé de 5 µg de ciprofloxacine) et 27 (disque non commercial imbibé de 5 µg de ciprofloxacine).

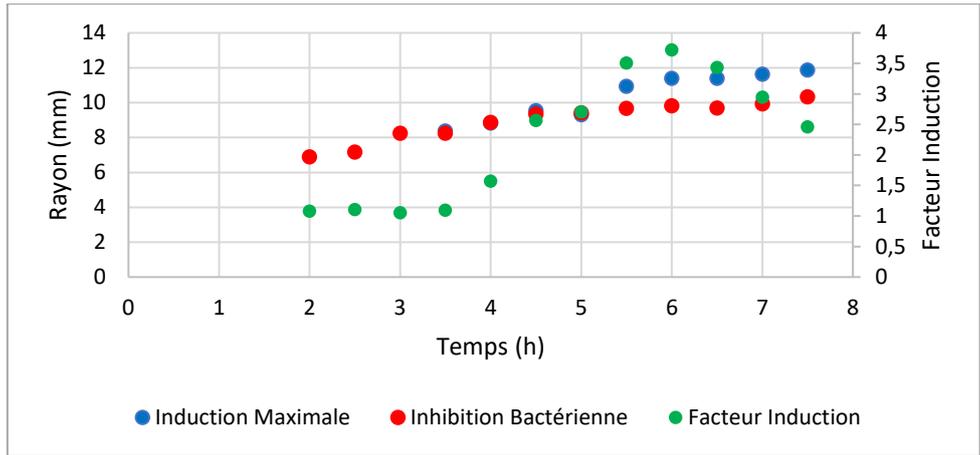


Figure 26 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour un disque commercial (témoin) chargé avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 1)

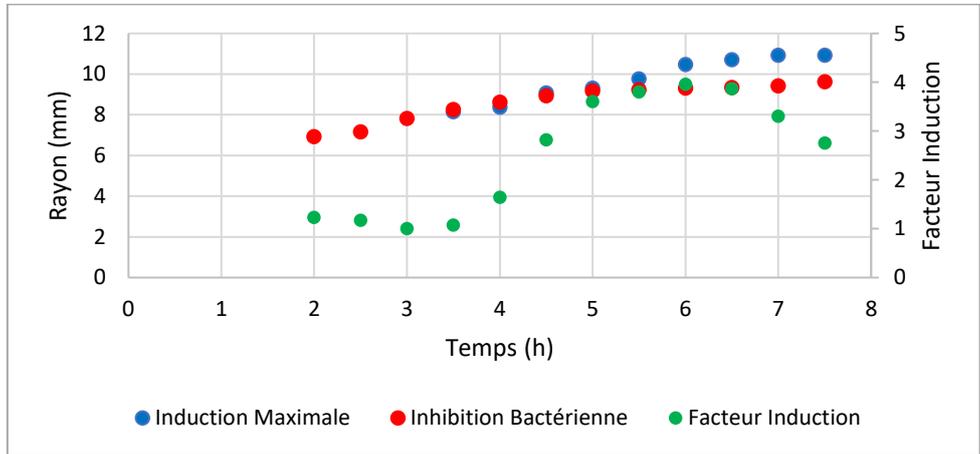


Figure 27 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour un disque non commercial chargé avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 1)

La concordance entre les figures 26 et 27 (disques commercial et non commercial avec 5  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine) permet de valider la méthode de préparation des disques. En revanche, pour des quantités de ciprofloxacine comprises entre 0,12  $\mu\text{g}$  et 0,04  $\mu\text{g}$  (disques 12 à 15), le rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  reste inférieur au rayon d'inhibition bactérienne au cours de l'incubation et cela malgré l'augmentation du facteur d'induction. Pour ces quantités de ciprofloxacine, le rayon d'inhibition bactérienne diminue également au cours de l'incubation. Ce résultat est illustré sur la figure 28 (quantité initiale de ciprofloxacine de 0,06  $\mu\text{g}$ ).

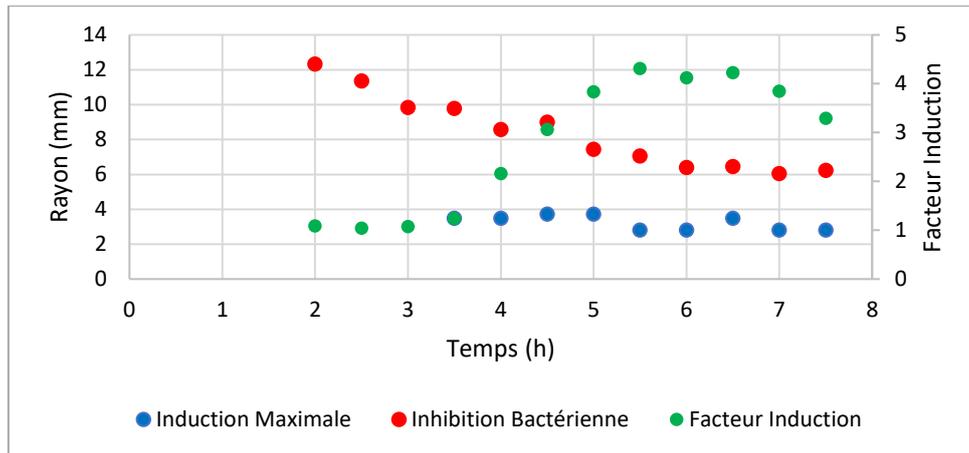


Figure 28 : Inhibition bactérienne et induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour un disque chargé avec 0,06  $\mu\text{g}$  de ciprofloxacine (répétition 2)

Comme pour la première série d'expériences, des investigations ont été réalisées pour expliquer les phénomènes inattendus. Dans le but d'expliquer la décroissance du rayon d'inhibition bactérienne au cours de l'incubation, les rayons des halos d'inhibition sont mesurés de manière approchée sur les photographies obtenues à la lumière visible pour des temps d'incubation compris entre 2 (figure 29.a) et 7,5 heures (figure 29.b). Après mesure à la règle des rayons d'inhibition bactérienne obtenus pour le disque 14 (quantité initiale de ciprofloxacine de 0,06  $\mu\text{g}$ ), ces derniers sont comparés avec ceux obtenus à la suite du traitement automatisé des photographies pour différents temps d'incubation (tableau VII).

(a) 2 heures d'incubation

(b) 7,5 heures d'incubation

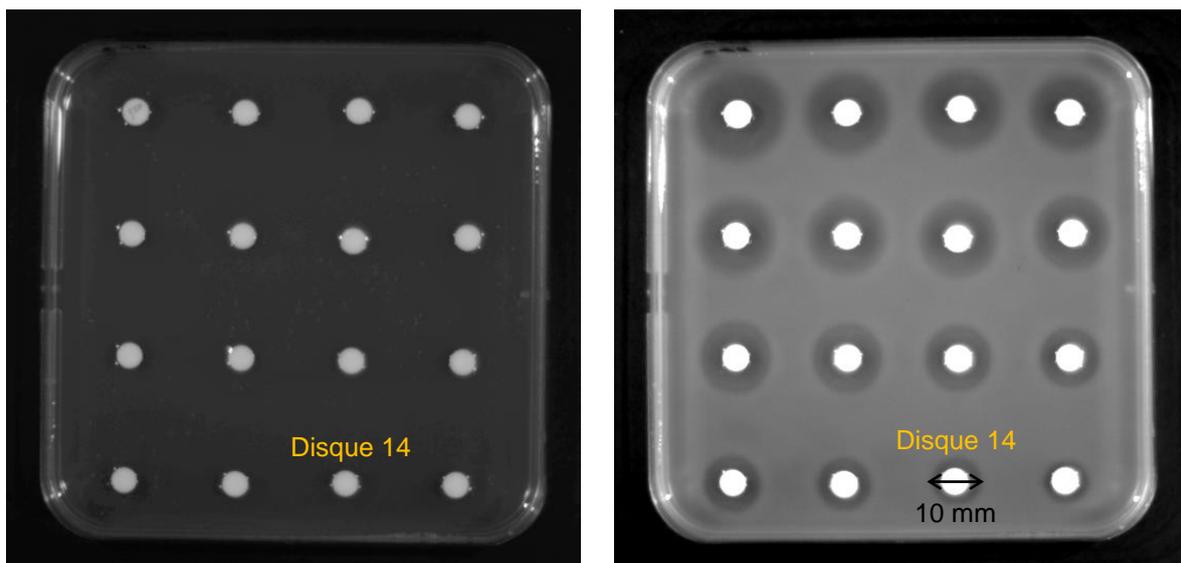


Figure 29 : Photographies à la lumière visible pour 2 (a) et 7,5 heures d'incubation (b) dans l'étude de diffusion de la ciprofloxacine en milieu gélosé (répétition 2)

Tableau VII : Comparaison des rayons d'inhibition bactérienne mesurés et issus de l'analyse automatisée des photographies pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 0,06 µg (disque 14) et différents temps d'incubation

Temps d'incubation (h)	Rayon d'inhibition bactérienne mesuré de manière approchée sur la photographie à la lumière visible (mm)	Rayon d'inhibition bactérienne issu de l'analyse automatisée de la photographie à la lumière visible (mm)
2	N/A	12,3
2,5	N/A	11,3
3	N/A	9,8
3,5	N/A	9,8
4	3,5	8,6
4,5	4	9
5	4	7,4
5,5	4,5	7
6	4,5	6,4
6,5	5	6,4
7	5	6
7,5	5	6,2

Aucune zone d'inhibition bactérienne n'est observable à l'œil nu pour des temps d'incubation allant de 2 à 3,5 heures alors que l'analyse automatisée des images propose des rayons d'inhibition. Comme évoqué pour la première série d'expériences, il ne faut pas prendre en compte ces rayons d'inhibition bactérienne puisque le temps d'incubation n'a pas encore permis d'aboutir à une croissance bactérienne détectable. Pour rappel, on observe tout de même des rayons d'inhibition avec l'analyse automatisée des images car l'algorithme utilisé repose sur une variation des niveaux de gris entre une valeur minimum et une valeur maximum et aucun seuil n'a été fixé pour la valeur minimum. Ainsi, d'après les données précédentes, un temps d'incubation minimum de 4 heures permet d'avoir des résultats acceptables.

Afin d'expliquer l'obtention d'un rayon d'induction maximale du promoteur P<sub>S086</sub> inférieur au rayon d'inhibition bactérienne, intéressons-nous de nouveau à l'image de luminescence présentée précédemment (figure 25). L'induction apparaît diffuse et homogène pour des quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,16 µg à 0,04 µg (disques 11 à 15) contrairement aux quantités allant de 5 µg à 0,23 µg (disques 0 à 10) où une zone discrète délimitant le maximum d'induction est observable. Comme pour la première série d'expériences, cet aspect diffus de la zone d'induction ne permet pas d'identifier un rayon d'induction maximale et nécessite, a priori, d'exclure les quantités initiales de ciprofloxacine allant de 0,16 µg à 0,04 µg (disques 11 à 15) de l'étude. Concernant le disque 11, même si on ne distingue pas d'intensité lumineuse maximale sur la figure 25, le rayon d'induction maximale du promoteur P<sub>S086</sub> est supérieur au rayon d'inhibition bactérienne (tableau VI). Ainsi, l'analyse automatisée, plus précise, permet de ne pas exclure la quantité de 0,16 µg (disque 11) de l'étude.

### 3. Bilan de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu LB gélosé inoculé par *E. coli* CM996 (séries d'expériences 1 et 2)

Les deux séries d'expériences ont permis de tracer l'évolution des rayons d'inhibition de croissance et d'induction maximale de luminescence, ainsi que l'évolution du facteur d'induction du promoteur  $P_{S086}$  en fonction du temps d'incubation pour différentes quantités initiales de ciprofloxacine. L'analyse visuelle des graphiques a permis de mettre en évidence deux phénomènes inattendus pour de faibles quantités de ciprofloxacine :

- Aspect diffus de la zone d'induction du promoteur  $P_{S086}$
- Rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  inférieur au rayon d'inhibition bactérienne

Le facteur d'induction du promoteur  $P_{S086}$  n'est pas interprétable pour une quantité de ciprofloxacine inférieure ou égale à 0,0024  $\mu\text{g}$  (disques 12 à 15 de la première série d'expériences). De plus, on peut visualiser un rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  inférieur au rayon d'inhibition bactérienne pour une quantité de ciprofloxacine inférieure ou égale à 0,12  $\mu\text{g}$  (disques 12 à 15 de la seconde série d'expériences). Les quantités de ciprofloxacine inférieures ou égales à 0,12  $\mu\text{g}$  ont donc été écartées de l'étude et cela sans remettre en cause la méthode ou le matériel utilisé. La détermination automatisée des rayons d'inhibition et d'induction du promoteur  $P_{S086}$  reste donc pertinente pour des quantités initiales de ciprofloxacine comprises entre 5  $\mu\text{g}$  et 0,16  $\mu\text{g}$  (disques 0 à 11 de la seconde série d'expériences).

Les rayons d'inhibition bactérienne moyens ont été calculés, pour les quantités initiales de ciprofloxacine comprises entre 5  $\mu\text{g}$  et 0,16  $\mu\text{g}$  (disques 0 à 11 de la seconde série d'expériences), en faisant la moyenne des rayons d'inhibition bactérienne obtenus via les trois boîtes (triplicata) à un temps d'incubation de 7,5 heures (temps maximal étudié dans la seconde série d'expériences). Il en est de même pour les rayons d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Pour ces calculs, trois graphiques issus de la seconde série d'expériences n'ont pas été pris en compte car les points des courbes étaient assez dispersés (absence de tendance) :

- Le graphique obtenu pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 3,75  $\mu\text{g}$  (disque 2) dans la répétition 1 (boîte 1)
- Le graphique obtenu pour quantité initiale de ciprofloxacine de 2,5  $\mu\text{g}$  (disque 3) dans la répétition 1 (boîte 1)
- Le graphique obtenu pour une quantité initiale de ciprofloxacine de 0,16  $\mu\text{g}$  (disque 11) dans la répétition 3 (boîte 3)

Pour ces quantités de ciprofloxacine et pour chaque type de rayon (inhibition bactérienne et induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ ), les rayons moyens sont calculés en faisant la moyenne des deux rayons obtenus pour les deux autres boîtes. Les résultats obtenus pour l'ensemble des disques sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Rayons moyens d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  pour les disques 0 à 11 (série d'expériences 2)

	5 µg CIP (Disque 0)	5 µg CIP (Disque 1)	3,75 µg CIP (Disque 2)	2,5 µg CIP (Disque 3)	1,88 µg CIP (Disque 4)	1,25 µg CIP (Disque 5)
<b>Rayon d'inhibition bactérienne (mm)</b>	10,7	9,5	9,3	8,9	9,7	8,8
<b>Rayon d'induction maximale du promoteur <math>P_{S086}</math> (mm)</b>	12,7	11,0	10,9	10,9	11,3	10,1

	0,94 µg CIP (Disque 6)	0,63 µg CIP (Disque 7)	0,47 µg CIP (Disque 8)	0,31 µg CIP (Disque 9)	0,23 µg CIP (Disque 10)	0,16 µg CIP (Disque 11)
<b>Rayon d'inhibition bactérienne (mm)</b>	8,7	8,5	9,1	8,0	7,8	7,0
<b>Rayon d'induction maximale du promoteur <math>P_{S086}</math> (mm)</b>	10,1	9,8	9,8	8,8	8,4	7,7

Les rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  sont ensuite tracés en fonction de la quantité de ciprofloxacine (figure 30). Pour chacune des quantités comprises entre 5 µg et 0,16 µg, le rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  est bien toujours supérieur au rayon d'inhibition comme attendu. De plus, les écarts-types, qui ont été calculés en considérant les rayons des trois répétitions, sont relativement élevés pour les quantités de ciprofloxacine de 5 µg, 1,88 µg et 0,47 µg. Il est intéressant de noter que les disques 0, 4 et 8 correspondants sont disposés dans la partie gauche de la boîte de Petri et à proximité d'autres disques pour lesquelles les quantités de ciprofloxacine sont élevées. Il est donc possible qu'il y ait des recouvrements entre les gradients de diffusion issus des différentes quantités de ciprofloxacine concernées et ainsi une perturbation des rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . En excluant les quantités de 5 µg, 1,88 µg et 0,47 µg, on observe bien une décroissance des rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  lorsque la quantité initiale de ciprofloxacine diminue. Cela est cohérent puisque la diffusion d'une plus faible quantité de ciprofloxacine permet d'atteindre les concentrations actives (CMI et concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ ) sur une plus courte distance de diffusion.

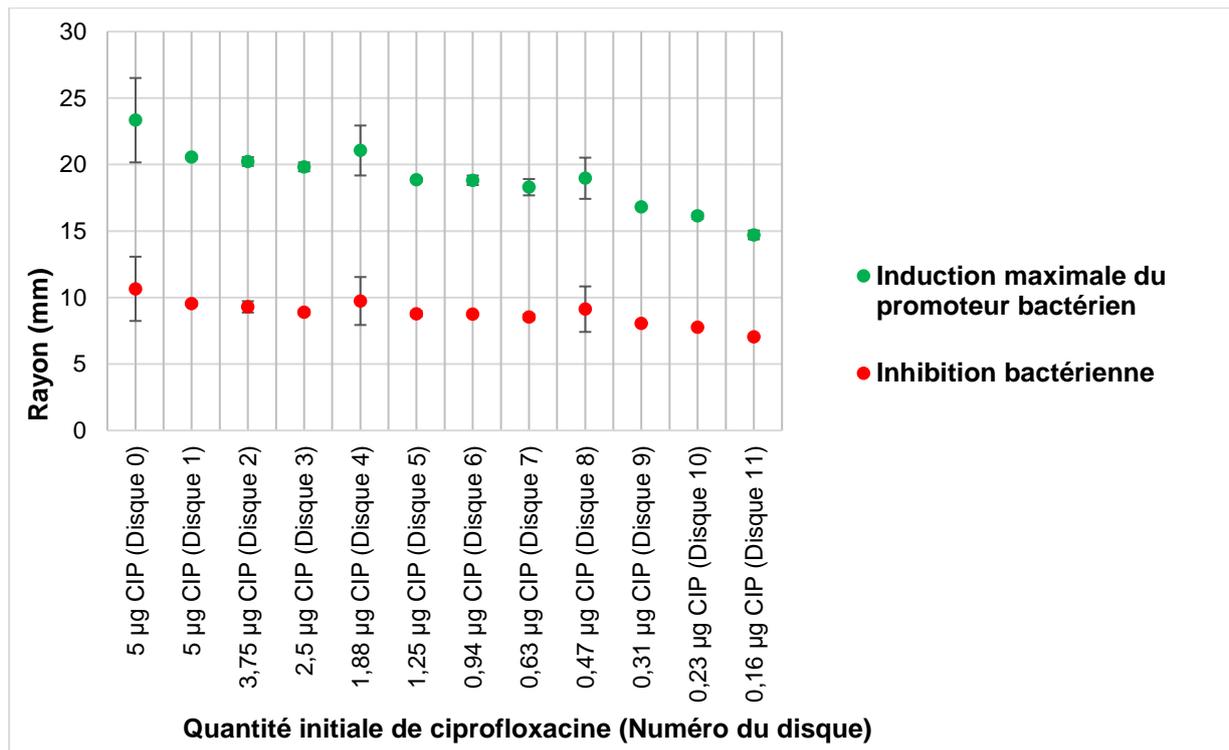


Figure 30 : Évolution des rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  en fonction de la quantité de ciprofloxacine

Ainsi, les rayons obtenus pour des quantités initiales de ciprofloxacine allant de 5 µg à 0,16 µg (disques 0 à 11) peuvent être comparés aux simulations numériques. Pour rappel, l'objectif de ce travail est de retrouver les rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux, via la CMI trouvée au laboratoire, en faisant varier la diffusivité de l'antibiotique. Il serait également envisageable de retrouver les rayons d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  à partir de la concentration correspondante.

## D. SIMULATIONS NUMÉRIQUES DE LA DIFFUSION DE LA CIPROFLOXACINE DANS UN MILIEU GÉLOSÉ

### 1. Concentrations en ciprofloxacine configurées dans les corps des disques

Les simulations numériques ont été configurées selon les paramètres de la seconde série d'expériences réalisée au cours de l'étude expérimentale de la diffusion de la ciprofloxacine (chapitre III.C.2). Les concentrations initiales imposées dans les disques sont décrites dans le tableau IX. Pour rappel, la concentration molaire est obtenue en divisant la quantité massique par la masse molaire de la ciprofloxacine (331,35 g/mol) puis en divisant le résultat obtenu par le volume du disque ( $1,41 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3$ ).

Tableau IX : Concentrations en ciprofloxacine imposées initialement dans les disques (mol/m<sup>3</sup>)

Numéro de disque	Quantité CIP (µg)	Concentration molaire CIP (mol/m <sup>3</sup> )
0 et 1	5	1,067
2	3,75	0,801
3	2,5	0,534
4	1,88	0,400
5	1,25	0,267
6	0,94	0,200
7	0,63	0,133
8	0,47	0,100
9	0,31	0,067
10	0,23	0,050
11	0,16	0,033
12	0,12	0,025
13	0,08	0,017
14	0,06	0,013
15	0,04	0,008

### 2. Diffusivités testées dans les différentes simulations

Plusieurs simulations ont été réalisées pour étudier les profils de concentration de la ciprofloxacine en faisant varier la diffusivité. Pour tester des valeurs pertinentes, les diffusivités ont été choisies autour de celle utilisé par Chandrasekar, soit  $10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ .<sup>33</sup> Ainsi, les trois diffusivités suivantes ont été testées :

- $D = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
- $D = 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$
- $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$

### 3. Domaine spatial choisi pour la représentation des profils de concentration

L'orientation de la boîte de Petri modélisée dans le repère cartésien (x,y,z) est présentée sur la figure 31.

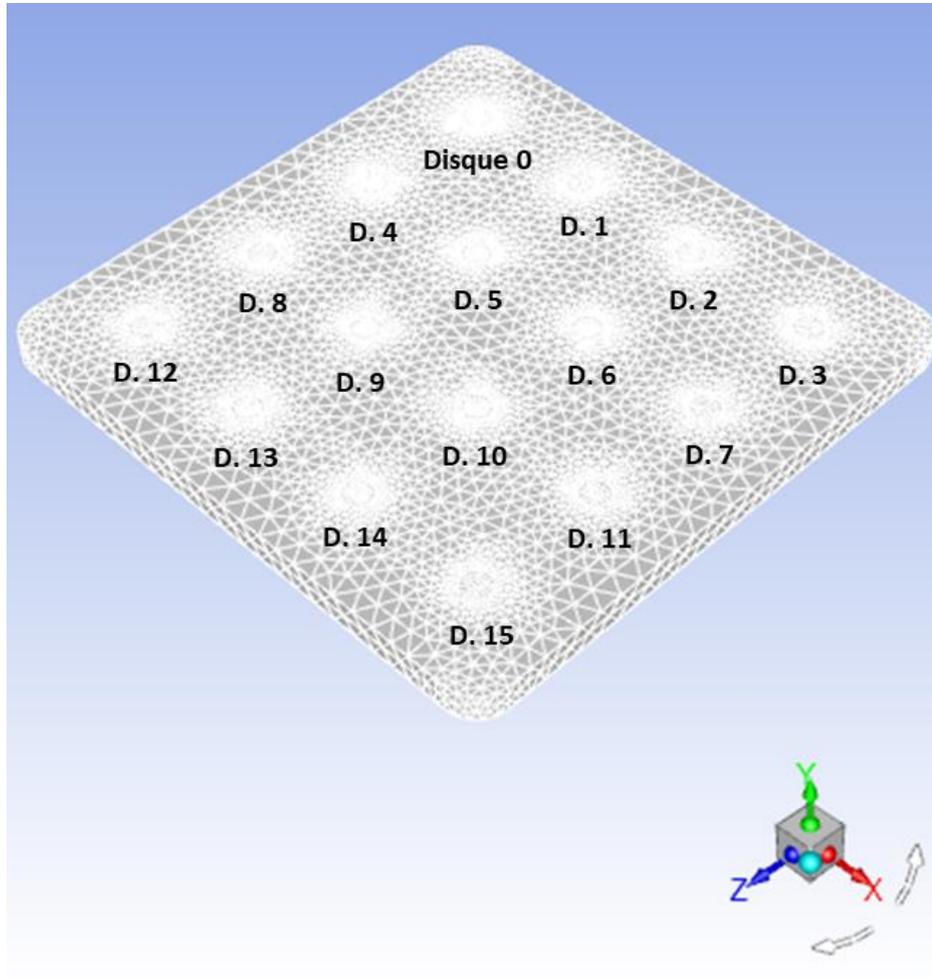


Figure 31 : Orientation de la boîte de Petri simulée selon le repère cartésien

Afin de s'intéresser au domaine spatial pertinent, les profils de concentration sont étudiés dans la direction x pour quatre valeurs de z correspondant aux quatre rangées de disques (disque 0 à 3, 4 à 7, 8 à 11 et 12 à 15) et à la surface de la boîte de Petri ( $y = 0,6$  cm). Il est intéressant de localiser l'étude à la surface de la boîte car le tapis bactérien est situé dans la couche supérieure d'agar (« LB top agar »).

#### 4. Temps de diffusion choisi et impact de ce paramètre sur les profils de concentration

Afin de pouvoir retrouver les rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux via les simulations numériques, il est nécessaire que le temps de diffusion choisi pour ces simulations soit égal au temps d'incubation étudié au laboratoire, c'est-à-dire 7,5 heures. Mais ce temps de diffusion permet-il d'aboutir à un profil de concentration interprétable ? Pour avoir une idée plus précise sur l'impact de ce temps, plusieurs simulations ont été lancées avec des temps de diffusion inférieurs ou égal à 7,5 heures et pour une diffusivité de  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s. Différentes fractions de temps balayant 7,5 heures de diffusion ont ainsi été étudiées (tableau X).

Tableau X : Correspondance entre les fractions du temps total de diffusion (7,5 heures) et les temps de diffusion réels

Fraction du temps total de 7,5 h (%)	Temps de diffusion (h)	Fraction du temps total de 7,5 h (%)	Temps de diffusion (h)
5	0,4	55	4,1
10	0,8	60	4,5
15	1,1	65	4,9
20	1,5	70	5,3
25	1,9	75	5,6
30	2,3	80	6,0
35	2,6	85	6,4
40	3,0	90	6,8
45	3,4	95	7,1
50	3,8	100	7,5

La concentration en ciprofloxacine a ensuite été tracée en fonction de la position x dans la boîte de Petri pour toutes ces fractions du temps total de diffusion de 7,5 heures et cela pour les disques 0 à 15 (annexe VII). Les courbes obtenues pour les disques 0 à 3 (concentrations en ciprofloxacine allant de 1,067 à 0,534 mol/m<sup>3</sup>) et 12 à 15 (concentrations de 0,025 à 0,008 mol/m<sup>3</sup>) sont présentées sur les figures 32 et 33. Ces graphiques montrent que plus le temps de diffusion augmente, plus la courbe de diffusion s'aplatit. Mais pour toutes les fractions de temps de diffusion étudiées, l'aire sous la courbe obtenue est la même car la matière initialement présente dans le disque se déplace mais se conserve. Il est intéressant d'obtenir des profils de concentration en forme de courbe aplatie car l'antibiotique est mieux réparti dans la boîte de Petri.

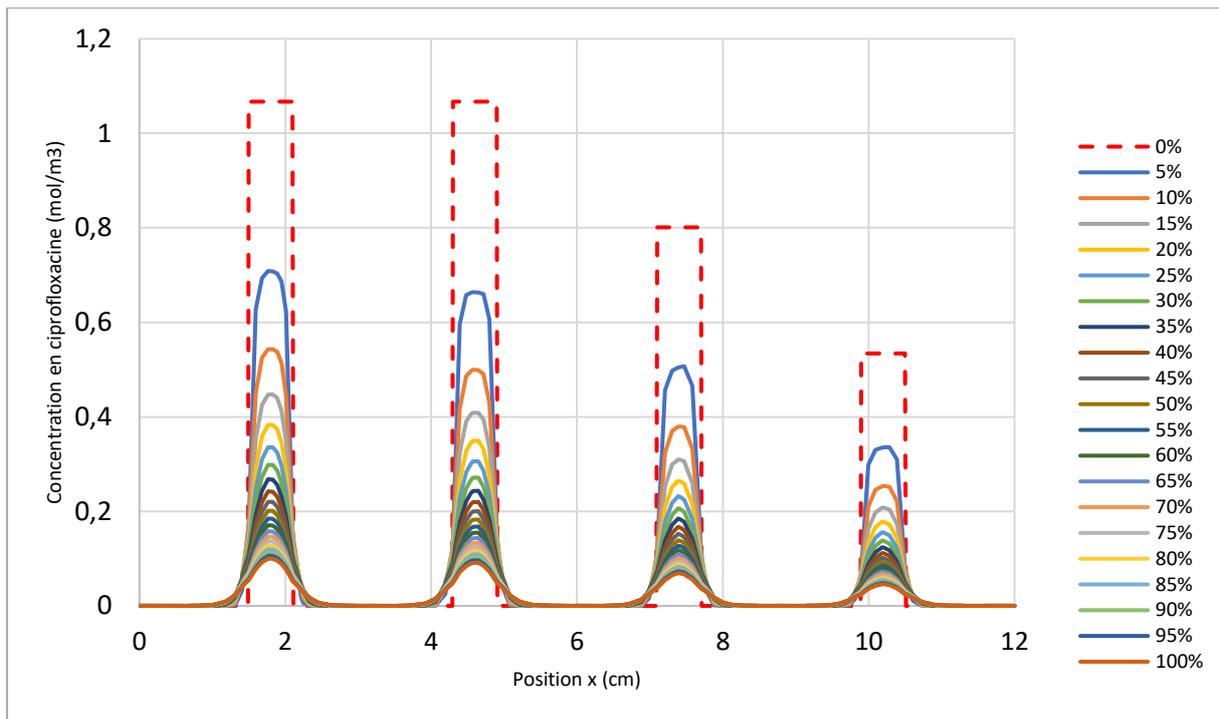


Figure 32 : Profils de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position  $x$  sur la boîte de Petri (avec  $y = 0,6$  cm et  $D = 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures (disques 0 à 3)

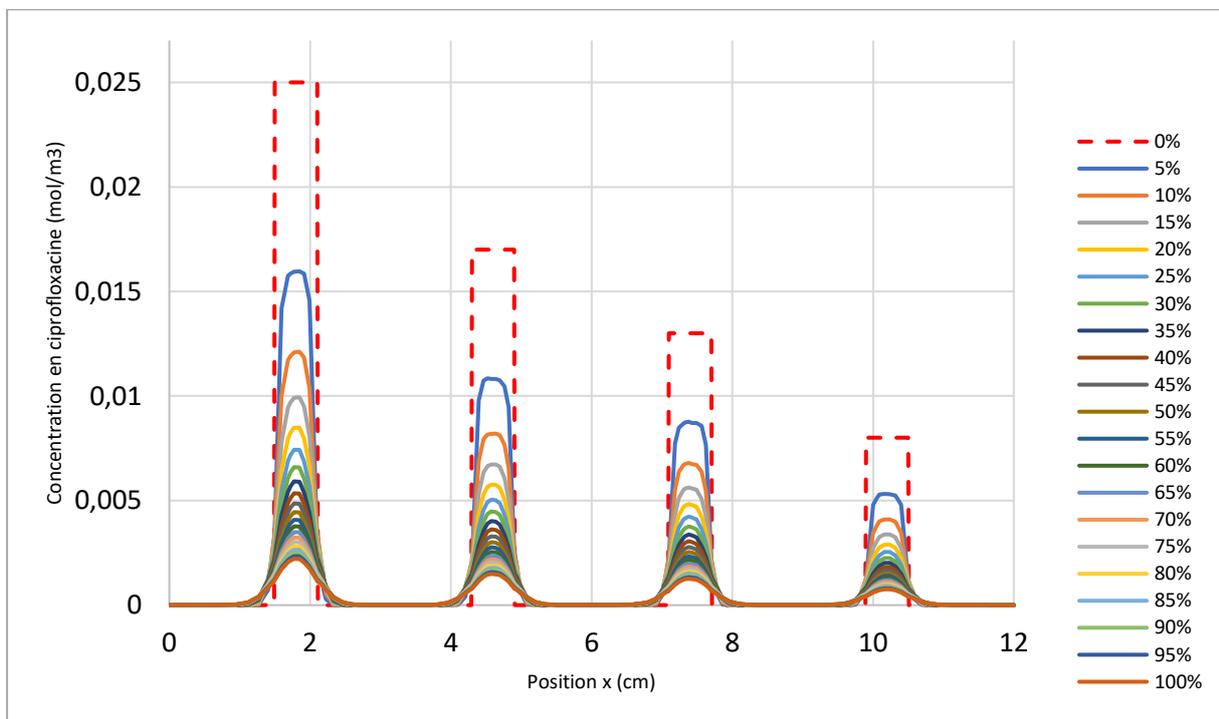


Figure 33 : Profils de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position  $x$  sur la boîte de Petri (avec  $y = 0,6$  cm et  $D = 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures (disques 12 à 15)

## 5. Profils de concentration et diamètres d'inhibition bactérienne obtenus suite aux simulations numériques

Les profils de concentration des trois simulations numériques réalisées aux trois diffusivités différentes sont représentés en fonction de la position  $x$  sur la boîte de Petri et sur un unique graphique pour faciliter la comparaison des diffusions. La CMI déterminée expérimentalement en milieu LB liquide et égale à  $4,53 \cdot 10^{-5} \text{ mol/m}^3$  est également représentée sur ce schéma.

Les graphiques obtenus après un temps de diffusion de 7,5 heures pour des positions  $z$  correspondant aux disques 0 à 3 (concentrations en ciprofloxacine allant de 1,067 à 0,534  $\text{mol/m}^3$ ) et 12 à 15 (concentrations de 0,025 à 0,008  $\text{mol/m}^3$ ) sont présentés sur les figures 34 et 35. Tous les graphiques obtenus pour les disques 0 à 15 sont présentés en annexe VIII. Quelle que soit la diffusivité étudiée, il n'est pas possible de distinguer la CMI de l'axe des abscisses à l'échelle étudiée et cela pour l'ensemble des disques après 7,5 heures de diffusion (il faudrait réaliser un grossissement pour étudier la CMI). Cela montre qu'il est difficile d'étudier de faibles concentrations en antibiotique, telle que la CMI de la ciprofloxacine vis-à-vis d'*E. coli*, en simulant une boîte de Petri complète dont les disques contiennent des concentrations en antibiotique très variées et cela pour plusieurs diffusivités.

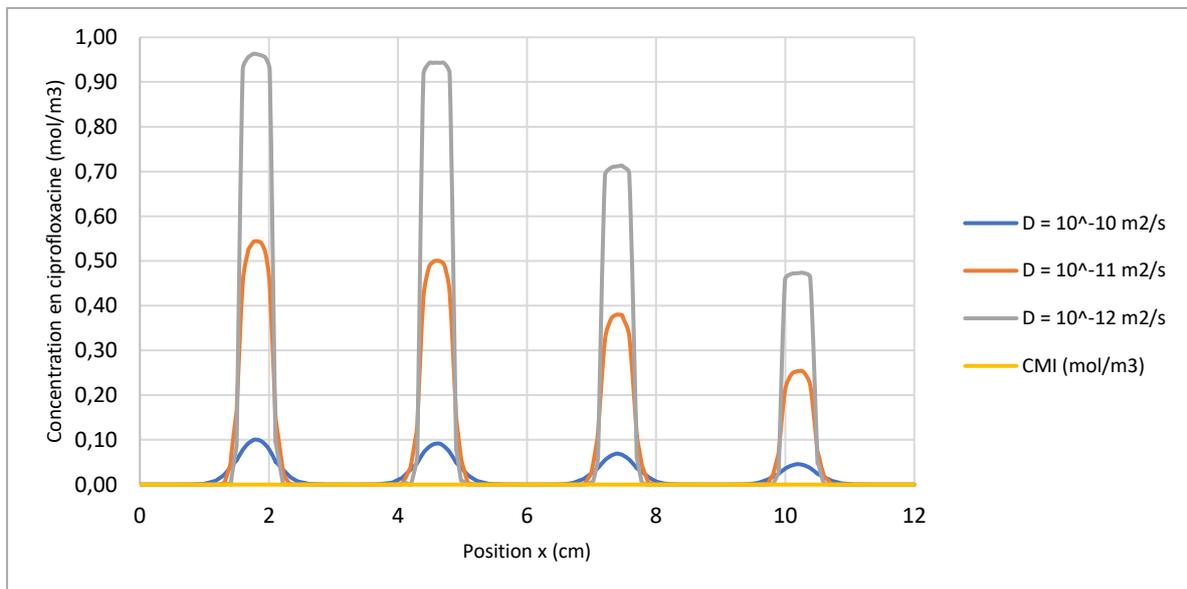


Figure 34 : Profil de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position  $x$  sur la boîte de Petri ( $y = 0,6 \text{ cm}$ ) pour différentes diffusivités (disques 0 à 3)

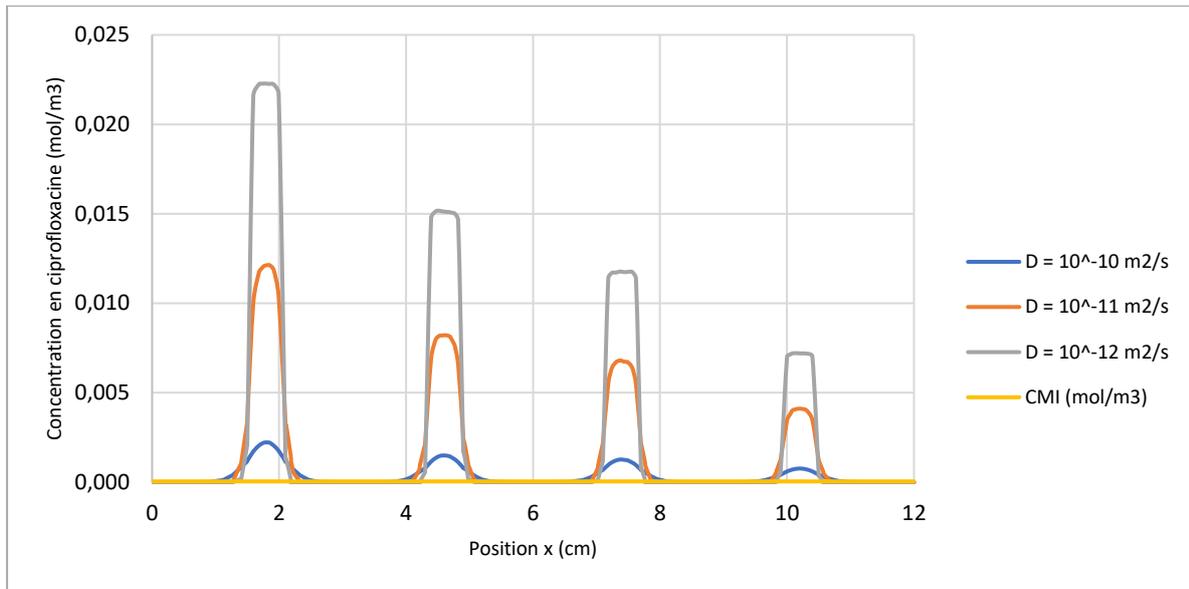


Figure 35 : Profil de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri ( $y = 0,6$  cm) pour différentes diffusivités (disques 12 à 15)

Dans le but de restreindre le domaine de diffusion et faciliter l'étude de faibles concentrations en antibiotique, on s'intéresse uniquement à une diffusivité donnée. Dans le cas de la diffusivité égale à  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s, la CMI se distingue de l'axe des abscisses à l'échelle étudiée au niveau des disques 8 à 15 (concentrations en ciprofloxacine allant de 0,1 à 0,008 mol/m<sup>3</sup>). Ce n'est pas le cas pour les disques 0 à 7 (concentrations allant de 1,067 à 0,133 mol/m<sup>3</sup>) et les deux autres diffusivités. Par exemple, le profil de concentration obtenu au niveau des disques 12 à 15 (concentrations allant de 0,025 à 0,008 mol/m<sup>3</sup>) après 7,5 heures d'incubation est présenté sur la figure 36. Tous les graphiques obtenus pour les disques 0 à 15 sont présentés en annexe IX.

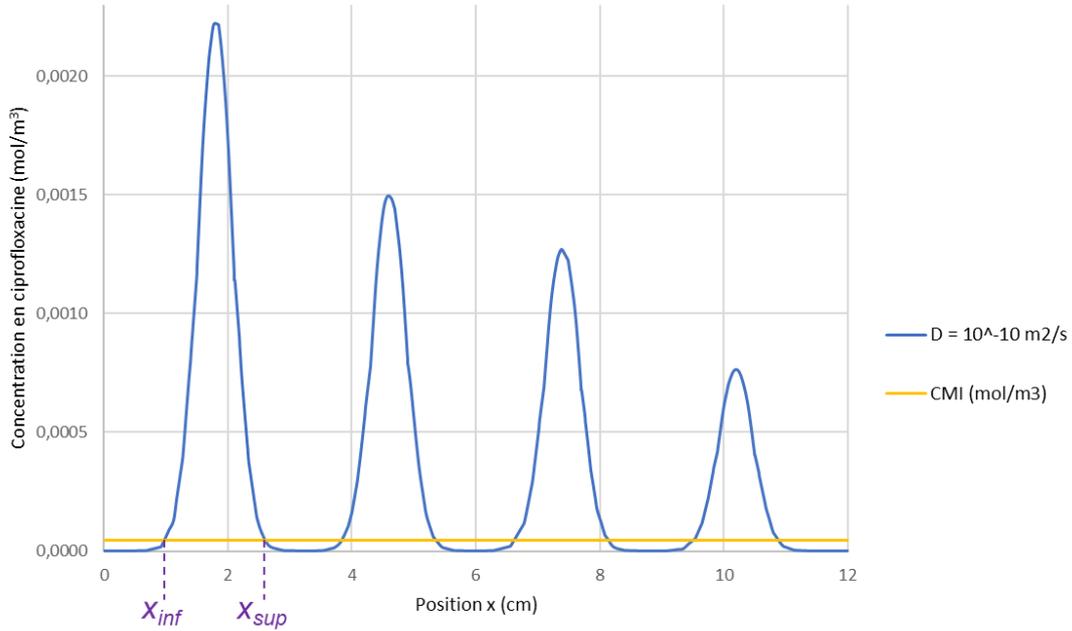


Figure 36 : Profil de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position  $x$  sur la boîte de Petri ( $y = 0,6$  cm) pour une diffusivité de  $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (disques 12 à 15)

Il est possible de déterminer deux positions  $x$ , autour de chacun des disques 8 à 15, pour lesquelles la concentration en ciprofloxacine est égale à la CMI. Ainsi, pour des concentrations initiales en ciprofloxacine allant de 0,1 à 0,008  $\text{mol}/\text{m}^3$  (disques 8 à 15), la simulation d'une diffusion de 7,5 heures dans une boîte de Petri complète permet de visualiser les positions  $x$  d'intérêt pour lesquelles la CMI est retrouvée. Le diamètre d'inhibition bactérienne peut alors être obtenu par simple différence entre la position supérieure notée  $x_{sup}$  et la position inférieure notée  $x_{inf}$  pour lesquelles la concentration est égale à la CMI. Ces positions sont représentées sur la figure 36 pour le disque 12.

La simulation numérique donne des valeurs discrètes des concentrations en fonction de la position  $x$ , positions qui dépendent du maillage choisi. Pour rappel, plus le maillage est fin, plus il y aura de mailles dans la boîte modélisée et plus le temps de calcul sera élevé. Dans le but d'obtenir les concentrations au niveau des positions  $x$  pour lesquelles le calcul n'a pas été fait, il faut réaliser une interpolation à partir des concentrations calculées autour de la position  $x$  d'intérêt. La formule d'interpolation linéaire, détaillée ci-dessous, permet de déterminer les positions  $x_{inf}$  et  $x_{sup}$  et ainsi de calculer les diamètres d'inhibition bactérienne.

$$x^* = \frac{[(x_2 - x_1)(CMI - C_1)]}{(C_2 - C_1)} + x_1 \quad (40)$$

avec :  $x^* = x_{inf}$  ou  $x_{sup}$ ,  $x_2$  = position connue située juste au-dessus de  $x^*$ ,  $x_1$  = position connue située juste en dessous de  $x^*$ ,  $C_2$  = concentration calculée située juste au-dessus de la CMI et  $C_1$  = concentration calculée située juste en-dessous de la CMI

Les diamètres d'inhibition bactérienne sont alors calculés pour des concentrations molaires initiales en ciprofloxacine allant de 0,1 à 0,008 mol/m<sup>3</sup> (disques 8 à 15) en faisant la différence entre  $x_{sup}$  et  $x_{inf}$  (tableau XI) :

Tableau XI : Diamètres d'inhibition bactérienne obtenus autour des disques 8 à 15 pour une diffusivité de  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s

	0,1 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 8	0,067 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 9	0,05 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 10	0,033 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 11	0,025 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 12	0,017 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 13	0,013 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 14	0,008 mol/m <sup>3</sup> CIP Disque 15
$x_{inf}$ (mm)	8,5	37,0	65,0	93,7	9,7	38,3	66,2	95,1
$x_{sup}$ (mm)	27,3	55,3	82,7	110,7	25,7	53,5	81,4	108,9
Diamètre Inhibition bactérienne (mm)	18,8	18,4	17,7	17,0	16,0	15,2	15,2	13,8

Une diminution du diamètre d'inhibition bactérienne est observable en passant des disques 8 à 15. En effet, il passe de 18,8 mm à 13,8 mm. Cette tendance est semblable à celle observée lors des manipulations en milieu LB gélosé.

## 6. Comparaison des rayons d'inhibition bactérienne numériques et expérimentaux

Pour rappel, les manipulations réalisées afin d'étudier la diffusion en milieu LB gélosé nous ont permis d'obtenir les rayons d'inhibition bactérienne pour l'ensemble des quantités initiales de ciprofloxacine étudiées. Après élimination des données erronées, les rayons d'inhibition pertinents ont été trouvés pour des quantités de ciprofloxacine comprises entre 5 µg et 0,16 µg (disques 0 à 11 de la seconde série d'expériences). De plus, l'étude numérique des profils de concentration autour de la CMI de la ciprofloxacine n'a pu être réalisée que pour des quantités allant de 0,47 à 0,04 µg (concentrations de 0,1 à 0,008 mol/m<sup>3</sup> pour les disques 8 à 15) et pour une diffusivité de 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>/s.

La comparaison des rayons d'inhibition expérimentaux et numériques a alors été effectuée pour des quantités de ciprofloxacine comprises entre 0,47 et 0,16 µg (concentrations de 0,1 à 0,033 mol/m<sup>3</sup> pour les disques 8 à 11) car ce sont pour ces quantités que des données ont été obtenues aussi bien pour les manipulations que pour les simulations (tableau XII). Pour chacune de ces quantités, un pourcentage d'écart a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Ecart} = \left| \frac{\text{Rayon Inhib. Bact. Numérique} - \text{Rayon Inhib. Bact. Experimental}}{\text{Rayon Inhib. Bact. Experimental}} \right| \times 100 \quad (41)$$

Tableau XII : Écarts entre rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux et numériques pour un temps de diffusion de 7,5 heures

	<b>0,47 µg CIP</b> <b>Disque 8</b>	<b>0,31 µg CIP</b> <b>Disque 9</b>	<b>0,23 µg CIP</b> <b>Disque 10</b>	<b>0,16 µg CIP</b> <b>Disque 11</b>
<b>Rayon d'inhibition bactérienne expérimental (mm)</b>	9,1	8,0	7,8	7,0
<b>Diamètre d'inhibition bactérienne numérique (mm)</b>	18,8	18,4	17,7	17,0
<b>Rayon d'inhibition bactérienne numérique (mm)</b> (Diamètre non arrondi / 2)	9,4	9,2	8,9	8,5
<b>% Écart</b>	2,8	14,0	14,2	21,1

Pour la plus petite quantité de ciprofloxacine étudiée qui est de 0,16 µg (disque 11), le pourcentage d'écart entre les rayons d'inhibition numérique et expérimental est assez élevé puisqu'il est de 21,1%. Cependant, en passant d'une quantité de ciprofloxacine de 0,16 µg à 0,47 µg (disques 11 à 8), le pourcentage d'écart entre les rayons numérique et expérimental

diminue et passe à 2,8%. Ce résultat laisse supposer que l'écart diminuerait davantage en passant des disques 8 à 0 qui contiennent des quantités de ciprofloxacine plus importantes. De plus, l'écart-type de 2,8% est un résultat encourageant. Il serait intéressant d'étudier la diffusion pour des concentrations en ciprofloxacine plus élevées lors des simulations numériques. Au niveau des manipulations, il faudrait améliorer la précision des mesures de rayons pour de faibles quantités d'antibiotique telles que celles retrouvées dans les disques 12 à 15 (de 0,12 à 0,04  $\mu\text{g}$ ). L'évolution des rayons d'inhibition bactérienne issus des manipulations et des simulations numériques en fonction de la quantité de ciprofloxacine a ensuite été tracée (figure 37) :

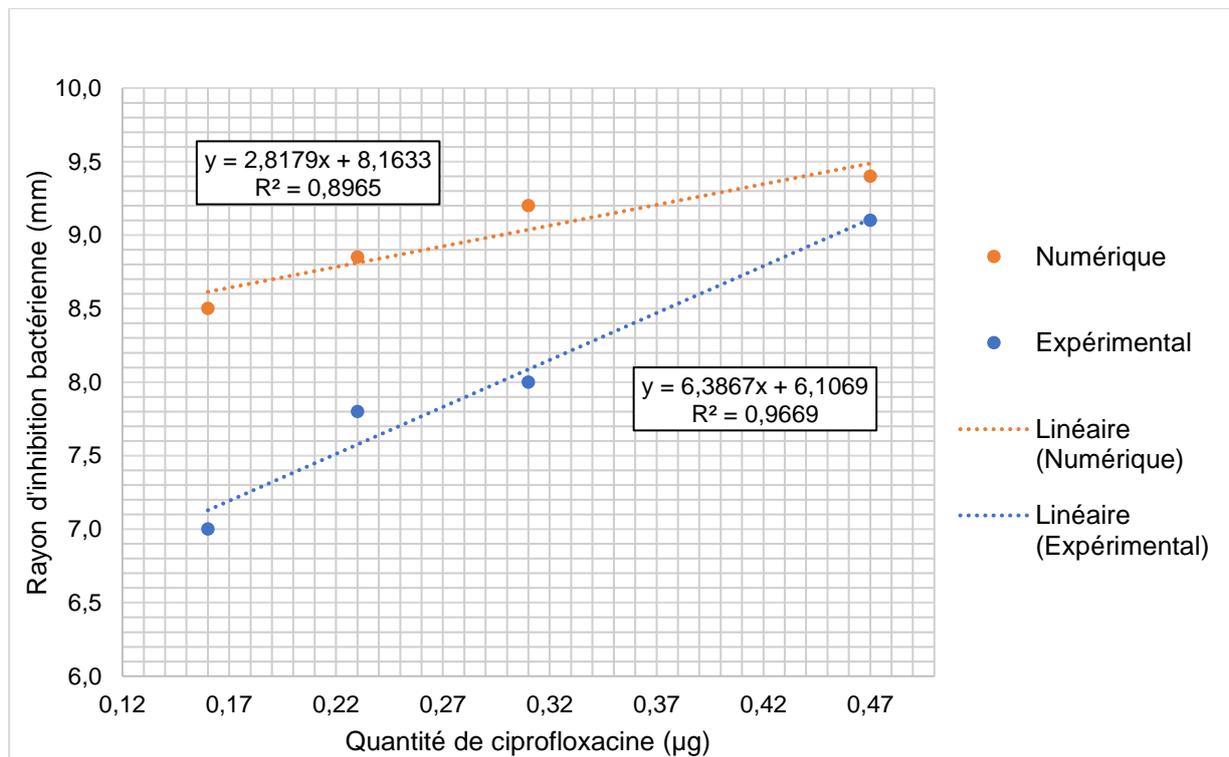


Figure 37 : Évolution des rayons d'inhibition bactérienne expérimental et numérique en fonction de la quantité de ciprofloxacine

Plus la quantité de ciprofloxacine est importante, plus l'écart entre les deux rayons d'inhibition bactérienne numérique et expérimental est faible. En traçant des courbes de tendance sur la figure 37, on remarque que le coefficient directeur de la courbe représentant l'évolution du rayon d'inhibition bactérienne expérimental est de 6,4 alors qu'il est de 2,8 pour la courbe dédiée au rayon d'inhibition bactérienne numérique (environ deux fois moins important). Cela peut se traduire par une représentation moins optimale des phénomènes de diffusion pour de faibles quantités de ciprofloxacine mais aussi par une différence entre la valeur de la diffusivité étudiée dans les simulations et celle de la diffusivité réelle. On peut néanmoins montrer que la diffusivité de  $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  est du bon ordre de grandeur puisque l'écart de 2,8% obtenu pour

une quantité de ciprofloxacine de 0,47  $\mu\text{g}$  (concentration de 0,1 mol/m<sup>3</sup> dans le disque 8) est relativement faible. Les simulations numériques réalisées ici ont donc permis d'obtenir un modèle de détermination des concentrations actives pouvant encore être optimisé en utilisant la diffusivité réelle de la ciprofloxacine et en facilitant l'étude des faibles quantités.

## IV. CONCLUSION

### A. APPORT DU TRAVAIL RÉALISÉ

Après avoir déterminé la CMI et la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  par la ciprofloxacine en milieu LB liquide, les rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  ont été définis dans un milieu LB gélosé inoculé par *E. coli* CM996 lors de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine. Des simulations numériques ont ensuite été entreprises pour retrouver, par le calcul, le rayon d'inhibition bactérienne trouvé expérimentalement à partir de la CMI. Mais tous les rayons d'inhibition bactérienne obtenus pour une même expérience, impliquant différentes quantités initiales de ciprofloxacine, n'ont pas encore été idéalement retrouvés avec les simulations numériques. En effet, un écart relativement élevé a été observé entre les rayons expérimentaux et numériques pour les plus petites quantités de ciprofloxacine étudiées. Après avoir optimisé la représentation des phénomènes de diffusion pour les plus faibles quantités de ciprofloxacine et avoir trouvé une bonne estimation de la diffusivité réelle de l'antibiotique, les simulations développées dans ce travail pourraient donc permettre d'élaborer un modèle numérique visant à obtenir la CMI et la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  par la ciprofloxacine à partir des rayons déterminés expérimentalement. Il serait alors possible de localiser, dans la boîte de Petri, les positions spatiales pour lesquelles la concentration en ciprofloxacine est égale à la CMI ou à la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  via le modèle de diffusion développé. Par conséquent, ce modèle permettrait d'établir une cartographie des concentrations actives en ciprofloxacine mais aussi d'estimer les concentrations en tout point de la boîte par la simple connaissance des rayons correspondants et de la diffusivité. L'objectif principal de cette thèse visant à utiliser des modèles de diffusion pour prédire les concentrations autour des disques et notamment au niveau de la zone couvrant le maximum d'induction a donc été atteint en partie, pour la ciprofloxacine et le promoteur  $P_{S086}$  de la souche *E. coli* CM996, sous réserve des améliorations restantes.

### B. PISTES D'AMÉLIORATION

#### 1. Diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu LB gélosé inoculé par *E. coli* CM996

L'étude de la diffusion de la ciprofloxacine en milieu gélosé a permis de déterminer les rayons d'inhibition bactérienne et d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Mais des phénomènes inattendus ont pu être observés au cours de cette étude pour de faibles quantités de ciprofloxacine. Tout d'abord, des valeurs d'induction erronées ont été obtenues lorsque l'intensité de luminescence émise et/ou le bruit de fond moyen étaient inférieurs à la limite de

quantification de l'appareil de mesure. Pour éviter ce phénomène, il serait intéressant d'inoculer davantage de bactéries dans le tapis bactérien (« LB top agar ») afin de rehausser le signal émis. Ainsi, l'intensité de luminescence serait émise par un plus grand nombre de bactéries et pourrait être supérieure à la limite de quantification. De plus, une décroissance du rayon d'inhibition bactérienne a pu être observée pour des temps d'incubation trop faibles. Ces derniers ont généré des problèmes de contraste aboutissant à l'obtention de rayons d'inhibition, via l'analyse automatisée des images, alors qu'aucune inhibition n'était en réalité observable. En effet, les rayons d'inhibition bactérienne sont calculés informatiquement par l'algorithme utilisé et reposent sur une variation des niveaux de gris entre une valeur minimum et une valeur maximum alors qu'aucun seuil n'a été fixé pour les valeurs minimum et maximum à prendre en compte. De ce fait, une toute petite fluctuation du niveau de gris dans une zone sans effet inhibiteur sera tout de même considérée comme une inhibition d'un point de vue numérique. Une amélioration facile à envisager serait d'éviter de travailler avec des temps d'incubation trop faibles pour rehausser la quantité de signal acquis. Enfin, une faible variation du rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ , aboutissant à l'obtention d'un rayon d'induction maximale inférieur au rayon d'inhibition bactérienne, a pu être observée pour de faibles quantités de ciprofloxacine. Dans ce cas de figure, l'induction apparaît diffuse et homogène et il semblerait que le logiciel d'analyse se soit arrêté sur le rayon où apparaît la luminescence en premier lieu, ce qui ne permet pas d'identifier un rayon d'induction maximale pour le promoteur étudié. Afin de contrecarrer les deux derniers phénomènes évoqués ci-dessus, à savoir la décroissance du rayon d'inhibition bactérienne et la faible variation du rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ , il serait intéressant d'améliorer le code du logiciel d'exploitation utilisé. D'une part, la fixation des valeurs minimum et maximum pour les niveaux de gris permettrait d'éviter d'obtenir des rayons d'inhibition bactérienne quand il n'y en a pas (faux positifs). D'autre part, une configuration optimisée du logiciel d'exploitation pourrait favoriser la localisation du rayon d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  pour de faibles quantités de ciprofloxacine.

Une autre observation réalisée au cours de cette étude est l'obtention d'écart-types plutôt élevés pour les rayons d'intérêt mesurés autour des disques situés dans la partie gauche de la boîte de Petri. De telles variations pourraient s'expliquer par des recouvrements des gradients de diffusion liées à la proximité entre des disques initialement imbibés avec de fortes quantités de ciprofloxacine. Si ce phénomène est bien lié à cette cause, il serait intéressant de réaliser, par exemple, des manipulations d'étude de diffusion en milieu gélosé avec de plus grandes distances entre les disques pour éviter les recouvrements des gradients de diffusion.

## 2. Simulations numériques de l'étude de la diffusion de la ciprofloxacine dans un milieu gélosé

Au niveau des simulations numériques, des problèmes d'étude des profils de concentration autour de la CMI ont été observés. Ces derniers sont liés à la modélisation des 16 disques en ciprofloxacine avec des quantités très différentes les unes des autres. Dans le but de faciliter l'interprétation des profils de concentration, on pourrait restreindre le domaine spatial étudié. Il serait alors possible de raffiner davantage (augmenter le nombre de mailles) et ainsi d'améliorer la précision de la diffusion. On pourrait par exemple modéliser une petite boîte contenant un unique disque chargé en antibiotique. Pour s'approcher de la réalité rencontrée dans les manipulations, il faudrait aussi diviser l'épaisseur de la boîte de Petri en deux : une gélose molle (« LB top agar ») dans laquelle le disque viendrait s'enfoncer et une gélose plus dure (« LB agar ») avec une diffusivité moindre. Enfin, on pourrait changer les propriétés de l'agar pour qu'elles soient plus représentatives de la réalité. De telles modifications permettraient de faciliter l'étude des plus faibles quantités d'antibiotique mais pourraient également contribuer à diminuer l'écart observé entre les rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux et théoriques. Pour notre étude, il n'était pas possible de distinguer la CMI de l'axe des abscisses pour les disques 0 à 7 (concentrations allant de 1,067 à 0,133 mol/m<sup>3</sup>) et les diffusivités de 10<sup>-11</sup> et 10<sup>-12</sup> m<sup>2</sup>/s. Il ne s'agit là que d'un problème de détermination des positions pour lesquelles la CMI est retrouvée mais cela ne remet pas en question la possibilité d'étudier de telles concentrations en ciprofloxacine et ces autres diffusivités avec le modèle numérique développé. En effet, un simple agrandissement de l'échelle étudiée permettrait de pouvoir dissocier la CMI de l'axe des abscisses pour ces concentrations plus élevées. Les écarts élevés observés entre les rayons d'inhibition bactérienne expérimentaux et numériques pour de faibles quantités de ciprofloxacine peuvent aussi s'expliquer par l'utilisation d'une valeur de diffusivité approchée et non exacte pour les simulations. La diffusivité obtenue semble être du même ordre de grandeur que la diffusivité réelle mais il serait intéressant de s'approcher encore plus de la vraie valeur. Pour ce faire, on pourrait réaliser d'autres simulations visant à obtenir des courbes numériques et expérimentales similaires et cela pour toutes les quantités d'antibiotique étudiées. En utilisant une valeur de diffusivité proche de la réalité, on rendrait la méthode automatisée de détermination des concentrations autour des disques plus optimale.

### C. OBJECTIFS ENVISAGEABLES POUR LA SUITE

A la suite du travail effectué dans cette thèse et après l'amélioration de tous les points évoqués dans le paragraphe précédent, il serait intéressant de passer de l'expérimental à la routine. Ainsi, l'étude de diffusion en milieu gélosé pourrait être réalisé pour n'importe quel antibiotique induisant des promoteurs bactériens. L'ensemble des promoteurs bactériens pouvant être induits pourraient également être testés. Ensuite, le modèle de diffusion permettant de prédire les concentrations autour des disques pourrait servir à la détermination des concentrations inductrices d'antibiotiques actifs sur les promoteurs bactériens en se basant sur les rayons d'intérêt déterminés expérimentalement. Il est évident que ce qui a été réalisé pour la ciprofloxacine peut être réalisé pour les autres antibiotiques à la condition de connaître les paramètres de diffusion de ces antibiotiques. De plus, nous nous sommes limités aux directions x et y pour les simulations numériques de cette étude mais il serait intéressant d'étudier les profils de concentration dans les trois directions x, y et z afin d'avoir une représentation tridimensionnelle plus pertinente des phénomènes de diffusion, telles qu'ils se manifestent dans le milieu ambiant. Enfin, la simulation de l'ensemble de la boîte de Petri avec plusieurs antibiotiques resterait un objectif, à terme, pour s'intéresser aux potentielles interactions entre les antibiotiques.

## V. PERSPECTIVES

La thèse a permis de réaliser des simulations numériques qui pourront servir de base à l'élaboration d'un modèle numérique de diffusion visant à prédire les concentrations autour des disques imbibés de ciprofloxacine et plus particulièrement la concentration d'induction maximale du promoteur  $P_{S086}$ . Mais un des objectifs envisageables pour la suite de ce travail est de pouvoir utiliser ces simulations pour tous les antibiotiques et l'ensemble des promoteurs bactériens identifiés comme importants dans le comportement physiologique d'une bactérie donnée (transfert de gènes de résistance, virulence, fonctions invasives, etc.). L'identification des concentrations d'induction de tels promoteurs bactériens est de première importance car elle permettrait d'identifier les endroits où se trouvent de telles concentrations et ainsi d'anticiper les risques associés à l'expression des fonctions bactériennes correspondantes. De telles concentrations inductrices sont-elles rencontrées chez des organismes vivants, humain ou animal, à la suite d'un traitement antibiotique ou bien dans l'environnement après rejet d'eaux usées ? Pour avoir un début de réponse à cette question, intéressons-nous au cas de la ciprofloxacine étudiée dans cette thèse. Pour rappel, la concentration en ciprofloxacine entraînant une induction maximale du promoteur  $P_{S086}$  et déterminée en milieu LB liquide est de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  avec un domaine d'induction s'étalant de 0,001 à 0,1  $\mu\text{g/mL}$ .

### A. CONCENTRATIONS EN CIPROFLOXACINE DANS L'ORGANISME HUMAIN A LA SUITE D'UNE ANTIBIOTHÉRAPIE ET POTENTIEL D'INDUCTION DU PROMOTEUR $P_{S086}$

Afin d'évaluer les concentrations en ciprofloxacine dans l'organisme humain après un traitement antibiotique, les phases d'absorption et d'élimination de la pharmacocinétique d'un comprimé de ciprofloxacine sont présentées ci-après.<sup>44</sup> Au niveau de l'absorption, après une administration de doses allant de 100 à 750 mg, les concentrations sériques maximales obtenues sont comprises entre 0,56 et 3,7  $\mu\text{g/mL}$  et doses-dépendantes. Un traitement avec de tels comprimés en ciprofloxacine ne permettrait donc pas d'induire le promoteur  $P_{S086}$ , par exemple, au niveau sanguin. De plus, Navalón et al. se sont intéressés, en 2000, à la détermination de la concentration urinaire par spectrofluorimétrie en phase solide.<sup>45</sup> Après une prise orale de 500 mg de ciprofloxacine par des patients humains, les concentrations urinaires déterminés par spectrofluorimétrie en phase solide allaient de 137 $\pm$ 2 à 176 $\pm$ 3  $\mu\text{g/mL}$  (trois urines testées) et étaient comparables aux concentrations obtenues avec la méthode HPLC de référence (136 $\pm$ 2 à 178 $\pm$ 2  $\mu\text{g/mL}$ ). Ces concentrations sont nettement supérieures aux concentrations induisant le promoteur  $P_{S086}$  et sont en faveur, au même titre que les

concentrations sériques, de l'absence d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> dans l'organisme humain à la suite d'une antibiothérapie.

## B. CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LES ANTIBIOTIQUES

Les urines et fèces des patients contaminés par les antibiotiques ainsi que les principaux procédés de l'industrie pharmaceutiques (synthèse chimique, formulation, fermentation, extraction) génèrent des eaux dites usées qui ne sont pas totalement épurées par les usines de traitement de l'eau.<sup>46,47</sup> Après épuration, ces eaux sont déversées dans les milieux naturels et des résidus médicamenteux peuvent se répandre dans les sols et les milieux aquatiques (eaux de surface, eaux souterraines, milieux marins). De plus, les antibiotiques peuvent être disséminés dans l'environnement, via les urines et fèces animales, après avoir été utilisés dans l'élevage des animaux et la prévention des maladies animales.<sup>48</sup> Un communiqué de presse publié par l'OMS en 2017 souligne d'ailleurs le fait que « dans certains pays, approximativement 80% des antibiotiques importants pour la médecine humaine sont consommés dans le secteur animal, et en grande partie, pour favoriser la croissance chez des animaux sains ». Enfin, les antibiotiques peuvent contaminer le milieu aquatique lors du traitement des maladies animales telles que les infections des poissons en pisciculture.<sup>49</sup> Les éleveurs les utilisent aussi en prévention pour éviter la propagation de maladies dès lors que la population de poissons en captivité est relativement dense (jusqu'à 50 kg de poissons par m<sup>3</sup> d'eau).

## C. CONCENTRATIONS EN CIPROFLOXACINE RETROUVÉES DANS LES EAUX ENVIRONNEMENTALES ET POTENTIEL D'INDUCTION DU PROMOTEUR P<sub>S086</sub>

Pour avoir une idée plus précise des concentrations environnementales en ciprofloxacine, les résultats de deux études portées sur le sujet sont présentés ci-dessous. Seules les concentrations molaires retrouvées dans les eaux environnementales sont évoquées afin de rester comparable avec la concentration molaire d'induction mais il serait également intéressant d'aborder les concentrations massiques retrouvées dans les sols et notamment le milieu agricole. Watkinson et al. se sont intéressés, dans une étude publiée en 2008, à la présence d'antibiotiques dans les bassins versants du sud-est de Queensland en Australie.<sup>50</sup> Au cours de ce travail, la ciprofloxacine a été détecté dans les effluents d'hôpitaux à une concentration médiane de 0,0025 µg/mL et dans les influents d'usines de traitement des eaux usées à une concentration médiane de 0,0006 µg/mL. En revanche, cet antibiotique n'a pas été détecté dans les eaux de consommation humaine ni les eaux environnementales. Les

concentrations en ciprofloxacine retrouvées dans les effluents d'hôpitaux peuvent donc permettre l'induction du promoteur P<sub>S086</sub> même si cette dernière n'est pas maximale. En revanche, les concentrations retrouvées dans les influents d'usines de traitement des eaux usées sont trop faibles pour induire ce promoteur. Par ailleurs, Khan et al. ont cherché à évaluer, en 2013, les charges en antibiotiques anthropogéniques dans le nord du Pakistan et l'occurrence des gènes de résistance aux antibiotiques dans cette région.<sup>51</sup> Au niveau de l'une des industries de formulation étudiées, des concentrations en ciprofloxacine de 0,0062 µg/mL ont été retrouvées. De plus, un niveau de 31 µg/mL de ciprofloxacine a été détecté dans un effluent d'usine de traitement des eaux usées qui avait reçu des eaux polluées provenant d'environ 90 fabricants de produits semi-ouvrés (en vrac). Cette étude montre qu'il est possible de retrouver des concentrations en ciprofloxacine pouvant induire le promoteur P<sub>S086</sub> au niveau des industries de formulation et des concentrations nettement supérieure à l'induction dans des effluents d'usines de traitement des eaux usées.

#### D. BILAN SUR LA LOCALISATION DES CONCENTRATIONS EN CIPROFLOXACINE POUVANT INDUIRE DES PROMOTEURS BACTÉRIENS

Les concentrations en ciprofloxacine retrouvées dans l'organisme humain après une antibiothérapie sont donc nettement supérieures aux concentrations pouvant induire le promoteur P<sub>S086</sub>. Si les urines sont éliminées dans les canalisations, il est possible que les concentrations en ciprofloxacine retrouvées dans le sang atteignent le domaine d'induction après diffusion en fin de traitement. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact d'un traitement à la ciprofloxacine sur l'induction du promoteur P<sub>S086</sub> notamment en fin de traitement. Les effluents d'hôpitaux et les eaux retrouvées au niveau des industries de formulation peuvent, quant à elles, contenir des concentrations en ciprofloxacine inductrices du promoteur P<sub>S086</sub>. Concernant les eaux des industries de formulation, la concentration en ciprofloxacine retrouvée est même relativement proche de la concentration d'induction maximale. En revanche, les eaux environnementales et celles pour la consommation humaine ne semblent pas contenir de ciprofloxacine. Il est probable que les traitements des eaux usées par les usines de traitement permettent d'épurer suffisamment les eaux usées et ainsi d'éliminer totalement la ciprofloxacine. Une dilution des eaux usées réalisée en amont du traitement, au niveau des rejets à l'égout, peut aussi expliquer les faibles concentrations en ciprofloxacine retrouvées dans les influents d'usines de traitement d'eaux usées en Australie. Cependant, il ne faut pas généraliser ces résultats comme le montre le haut niveau de ciprofloxacine non inducteur et détecté dans les effluents des usines de traitement des eaux pollués dans le nord du Pakistan. Même si la concentration en ciprofloxacine retrouvée dans ces eaux est

supérieure à l'induction, il suffirait d'un certain temps de diffusion pour retrouver des concentrations inductrices. La ciprofloxacine peut donc se retrouver à des concentrations pouvant stimuler le transfert de gènes d'antibiorésistance dans l'environnement par des ICE de type SXT dont la mobilité est contrôlée par le promoteur  $P_{S086}$ .

Seul le promoteur  $P_{S086}$  a été étudié dans ce travail mais il serait intéressant d'évaluer l'impact des concentrations en ciprofloxacine retrouvées sur d'autres promoteurs bactériens. De plus, le manque de données sur les concentrations inductrices des promoteurs bactériens par les antibiotiques en général souligne l'intérêt d'évaluer leur potentiel impact dans l'organisme vivant après une antibiothérapie ou dans l'environnement. Au niveau environnemental, il serait notamment intéressant de cibler les régions du globe mal contrôlées et relativement polluées qui pourraient contenir de grandes concentrations en antibiotiques à l'origine d'un niveau élevé d'induction de promoteurs bactériens. Toutes les informations manquantes sur les concentrations inductrices démontrent l'intérêt du modèle de diffusion développé dans cette thèse et permettant d'établir une cartographie des concentrations actives en antibiotiques. En localisant la concentration d'induction maximale d'un promoteur bactérien autour d'une source en antibiotique donnée, le transfert des éléments génétiques mobiles et donc des gènes de résistance aux antibiotiques pourrait ainsi être évalué, ce qui contribuerait à renforcer la surveillance de l'antibiorésistance.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Organisation Mondiale de la Santé. Résistance aux antibiotiques. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/résistance-aux-antibiotiques> (page consultée le 06/02/2019)
- 2) SINGLETON P. Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6<sup>ème</sup> édition. Dunod Ed. England. 2004, 542 p.
- 3) CAVALLO J.-D. Concentrations critiques, spectre d'activité des antibiotiques. Disponible sur : <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/du/lyon/concentrations-spectre-cavallo-duciv-sept-2016.pdf> (page consultée le 10/11/2018)
- 4) GAUDY C., BUXERAUD J. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Elsevier Ed. France. 2005, 269 p.
- 5) DAVIES J. Are antibiotics naturally antibiotics? J. Ind. Microbiol Biotechnol., 2006, 33 (7), pp.496-499.
- 6) TREMBLAY Y.D.N., HATHROUBI S., JACQUES M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire, 2014, 78 (2), pp.110-116.
- 7) PRICE K.E., NAIMIE A.A., GRIFFIN E.F., BAY C., O'TOOLE G.A. Tobramycin-Treated *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Enhances *Streptococcus constellatus* 7155 Biofilm Formation in a Cystic Fibrosis Model System. Journal of Bacteriology, 2015, 198 (2), pp.237-247.
- 8) HORII T., MORITA M., MURAMATSU H., MURANAKA Y., KANNO T., MAEKAWA M. Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 51 (5), pp.1175-1179.
- 9) DA RE S., PLOY M.-C. Antibiotiques et réponse SOS bactérienne : une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. Med Sci, 2012, 28 (2), pp.179-184.
- 10) SCORNEC H., BELLANGER X., GUILLOTEAU H., GROSHENRY G., MERLIN C. Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72 (10), pp.2722–2728.
- 11) PAGÈS J.-M. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. Med Sci, 2004, 20 (3), pp. 346-351.
- 12) LESSEUR P. Développement et Santé. Antibiotiques : modes d'action, mécanismes de la résistance. Disponible sur : <https://devsante.org/articles/antibiotiques-modes-d-action-mecanismes-de-la-resistance> (page consultée le 17/02/2019)
- 13) MAURIN M. Mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries à gram positif. Disponible sur : <http://umvf.omsk-osma.ru/infectiologie/www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/du-grenoble/ResGramplus-duGrenoble08-maurin.pdf> (page consultée le 22/02/2019)

- 14)** InterPro. Protein sequence analysis & classification. Tetracycline resistance leader peptide, TetM (IPR012992) Disponible sur : <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR012992> (page consultée le 17/02/2019)
- 15)** CHU Rouen Normandie. Catalogue et Index des Sites Médicaux de langue Française. Transfert horizontal de gène. Descripteur MeSH. Disponible sur : <http://www.chu-rouen.fr/page/transfert-horizontal-de-gene> (page consultée le 02/06/2019)
- 16)** ÚBEDA C., MAIQUES E., KNECHT E., LASA Í., NOVICK R.P., PENADÉS J.R. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 2005, 56 (3), pp. 836-844.
- 17)** DAHMANE N. Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICES<sub>St3</sub> et des facteurs influençant leur mobilité. Thèse de doctorat d'université. Université de Lorraine, 2017, 184 p.
- 18)** CORBINAIS C. Etude des premières étapes de la transformation naturelle chez *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat d'université. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015, 164 p.
- 19)** BORDELEAU E., GHINET M.G., BURRUS V. Diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2012, 2 (2), pp. 119-124.
- 20)** SPAGNOLETTI M., CECCARELLI D., RIEUX A., FONDI M., TAVIANI E., FANI R., COLOMBO M.M., COLWELL R.R., BALLOUX F. Acquisition and Evolution of SXT-R391 Integrative Conjugative Elements in the Seventh-Pandemic *Vibrio cholerae* Lineage. *mBio*, 2014, 5 (4), 9 p.
- 21)** MARRERO J., WALDOR M.K. The SXT/R391 Family of Integrative Conjugative Elements Is Composed of Two Exclusion Groups. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (8), pp. 3302-3305.
- 22)** Pharmaceutical Input and Elimination from Local Sources. Les résidus pharmaceutiques dans le système aquatique - un défi pour l'avenir. Panorama et activités du projet de coopération européenne PILLS. Disponible sur : [http://www.pills-project.eu/content/136/documents/110317\\_PillsBrochure-fr.pdf](http://www.pills-project.eu/content/136/documents/110317_PillsBrochure-fr.pdf) (page consultée le 02/05/2019)
- 23)** Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement. Bienvenue. Disponible sur : <http://www.lcpme.cnrs-nancy.fr/lcpme/spip.php?article78> (page consultée le 06/02/2019)
- 24)** Laboratoire Réactions et Génie des Procédés - UMR 7274. Disponible sur : <http://lrgp-nancy.cnrs.fr/> (page consultée le 06/02/2019)
- 25)** SAATDJIAN E. Les bases de la mécanique des fluides et des transferts de chaleur et de masse pour l'ingénieur. 1<sup>ère</sup> édition. Les Editions Sapia Ed. France. 2009, 517 p.
- 26)** GNIP-CNAM. Viscosité. Disponible sur : [http://gpip.cnam.fr/ressources-pedagogiques-ouvertes/hydraulique/co/3grain\\_viscositePLUS\\_1.html](http://gpip.cnam.fr/ressources-pedagogiques-ouvertes/hydraulique/co/3grain_viscositePLUS_1.html) (page consultée le 04/12/2018)
- 27)** BHASKARAN R., COLLINS L. Introduction to CFD Basics. Disponible sur : <http://dragonfly.tam.cornell.edu/teaching/mae5230-cfd-intro-notes.pdf> (page consultée le 10/11/2018)
- 28)** ANSYS Fluent Software: CFD Simulation. Disponible sur : <https://www.ansys.com/fr-fr/products/fluids/ansys-fluent> (page consultée le 07/10/2018)

- 29)** COMSOL. CFD Software for Simulating Fluid Flow Applications. Disponible sur : <https://www.comsol.fr/cfd-module> (page consultée le 07/10/2018)
- 30)** Formules de Physique - Diffusion dans les Fluides. Disponible sur : <http://www.formules-physique.com/categorie/1121> (page consultée le 01/12/2018)
- 31)** BUCH A., RAKIB M., STAMBOULI M. Techniques de l'ingénieur. Transfert de matière dans une phase. Disponible sur : <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/transfert-de-matiere-en-genie-des-procedes-42326210/transfert-de-matiere-j1075/transfert-de-matiere-dans-une-phase-j1075niv10001.html> (page consultée le 02/12/2018)
- 32)** MONTES L. Partie 1 : Techniques de dopage. Disponible sur : [http://montes.phelma.grenoble-inp.fr/mems/Cours/Diffusion\\_implantation\\_LM.pdf](http://montes.phelma.grenoble-inp.fr/mems/Cours/Diffusion_implantation_LM.pdf) (page consultée le 09/12/2018)
- 33)** CHANDRASEKAR V., KNABEL S.J., ANANTHESWARAN R.C. Modeling development of inhibition zones in an agar diffusion bioassay. *Food Science & Nutrition*, 2015, 3 (5), pp. 394-403.
- 34)** LALPURIA M., KARWA V., ANANTHESWARAN R.C., FLOROS J.D. Modified agar diffusion bioassay for better quantification of Nisaplin®. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114 (3), pp. 663-671.
- 35)** SEBTI I., BLANC D., CARNET-RIPOCHE A., SAUREL R., COMA V. Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels. *Journal of Food Engineering*, 2004, 63 (2), pp. 185-190.
- 36)** COOPER K.E., WOODMAN D. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1946, 58 (1), pp.75-84.
- 37)** COOPER K.E., LINTON A.H., SEHGAL S.N. The Effect of Inoculum Size on Inhibition Zones in Agar Media Using Staphylococci and Streptomycin. *J. gen. Microbiol.*, 1958, 18, pp. 670-687.
- 38)** KIM D.-J., CHUNG. S.-G., LEE S.-H., CHOI J.-W. Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (21), pp. 4620-4622.
- 39)** SIGMA-ALDRICH. MERCK. Ciprofloxacin 17850. Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/17850> (page consultée le 17/02/2019)
- 40)** BERTHOLD TECHNOLOGIES. NightShade LB 985 In vivo Plant Imaging System. Disponible sur : <https://www.berthold-bio.com/in-vivo-imaging-systems/details/product/nightshade-lb-985/action/show.html> (page consultée le 07/10/2018)
- 41)** VICTOR and VICTOR V. Multilabel Readers. Disponible sur : [https://shop.perkinelmer.com/Content/RelatedMaterials/SpecificationSheets/SPC\\_VICTOR3\\_VICTOR3VMultilabelPlateCntr.pdf](https://shop.perkinelmer.com/Content/RelatedMaterials/SpecificationSheets/SPC_VICTOR3_VICTOR3VMultilabelPlateCntr.pdf) (page consultée le 10/11/2018)
- 42)** CRANK J. The mathematics of diffusion. 2<sup>ème</sup> édition. Oxford University Press. 1979, 414 p.
- 43)** SEGHIER A. Effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur le transfert de l'élément SXT vecteur d'antibio-résistance. Mémoire. Université de Lorraine, 2017/2018, 37 p.

- 44)** VIDAL. eVIDAL. CIPROFLOXACINE MYLAN 250 mg cp pellic. Disponible sur : [https://evidal.vidal.fr/medicament/ciprofloxacine\\_mylan\\_250\\_mg\\_cp\\_pellic-20303-pharmacocinetique.html](https://evidal.vidal.fr/medicament/ciprofloxacine_mylan_250_mg_cp_pellic-20303-pharmacocinetique.html) (page consultée le 20/05/2019)
- 45)** NAVALON A., BALLESTEROS O., BLANC R., VÍLCHEZ J.L. Talanta. Determination of ciprofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. Talanta, 2000, 52 (5), pp. 845-852.
- 46)** CALAMARI D., ZUCCATO E., CASTIGLIONI S., BAGNATI R., FANELLI R. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. Environmental Science and Technology, 2003, 37 (7), pp. 1241-1248.
- 47)** GADIPELLY C., PÉREZ-GONZÁLEZ A., YADAV G.D., ORTIZ I., IBÁÑEZ R., RATHOD V.K., MARATHE K.V. Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014, 53 (29), pp. 11571-11592.
- 48)** Organisation Mondiale de la Santé. Cessons d'utiliser des antibiotiques chez des animaux en bonne santé. Disponible sur : <http://www.who.int/fr/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance> (page consultée le 02/12/2018)
- 49)** DE VENDEUIL R., CHARLES G. L'élevage du poisson remis en question. Disponible sur : [https://www.lexpress.fr/actualite/societe/environnement/l-elevage-du-poisson-remis-en-question\\_855714.html](https://www.lexpress.fr/actualite/societe/environnement/l-elevage-du-poisson-remis-en-question_855714.html) (page consultée le 02/12/2018)
- 50)** WATKINSON A.J., MURBY E.J., KOLPIN D.W., COSTANZO S.D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. Science of the Total Environment, 2009, 407 (8), pp. 2711-2723.
- 51)** KHAN G.A., BERGLUND B., KHAN K.M., LINDGREN P.-E., FICK J. Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities - A study in Pakistan. PLoS One, 2013, 8 (6), 8 p.

## *LISTE DES ANNEXES*

Annexe I : Mécanismes d'action des antibiotiques en thérapeutique

Annexe II : Photographies des boîtes de Petri obtenues à la lumière visible après 7 heures d'incubation (manipulation 1)

Annexe III : Évolution de l'inhibition et de l'induction en fonction du temps de diffusion pour différentes quantités de ciprofloxacine (manipulation 1)

Annexe IV : Détermination des temps d'incubation nécessaires pour avoir un facteur d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> interprétable (manipulation 1)

Annexe V : Photographies des boîtes de Petri obtenues à la lumière visible après 7,5 heures d'incubation (manipulation 2)

Annexe VI : Évolution de l'inhibition et de l'induction en fonction du temps de diffusion pour différentes quantités de ciprofloxacine (manipulation 2)

Annexe VII : Évolution de la concentration en ciprofloxacine en fonction de x (avec y = 0,6 cm et D = 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>/s) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures

Annexe VIII : Évolution de la concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour différentes diffusivités et un temps de diffusion de 7,5 heures

Annexe IX : Évolution de la concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour une diffusivité de 10<sup>-10</sup>m<sup>2</sup>/s et un temps de diffusion de 7,5 heures

## Annexe I : Mécanismes d'action des antibiotiques en thérapeutique

Les antibiotiques sont classés en fonction de leur mode d'action<sup>4</sup>:

- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
- Inhibition de la synthèse des protéines (transcription ou traduction)
- Inhibition du métabolisme de l'ADN
- Altération de l'intégrité de la membrane plasmique

### I. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

#### 1) β-lactamines

Les β-lactamines présentent une analogie avec le substrat naturel des PLP de la membrane plasmique et peuvent ainsi inhiber la synthèse du peptidoglycane en bloquant le fonctionnement de ces enzymes.<sup>4</sup> L'effet est d'abord bactériostatique puis bactéricide dès lors que des autolysines viennent lyser la bactérie à la suite de la dégradation du peptidoglycane.

Les β-lactamines incluent les pénicillines des groupes G, V, M et A, les uréidopénicillines, les carboxypénicillines et les céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération dont les indications sont très variées. Des bactéries sont résistantes aux β-lactamines en produisant des β-lactamases qui clivent les noyaux β-lactames.<sup>2</sup> Pour faire face à ces résistances, l'acide clavulanique, un inhibiteur de β-lactamase, est utilisé en association avec les β-lactamines comme par exemple l'Augmentin® (amoxicilline/acide clavulanique).

#### 2) Glycopeptides

Les glycopeptides se lient au dipeptide terminal du peptidoglycane pour empêcher le fonctionnement normal des PLP et ainsi entraîner l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane puis la mort de la bactérie.<sup>4</sup> Ils comprennent la vancomycine et la teicoplanine et ont plusieurs indications telles que les infections pulmonaires et ostéoarticulaires.

#### 3) Fosfomycine

La fosfomycine se fixe sur la pyruvyltransférase, une enzyme impliquée dans la formation d'un précurseur du peptidoglycane, et provoque l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane puis la mort de la bactérie.<sup>4</sup> Cette molécule est indiquée par exemple dans le traitement des méningites et endocardites.

## II. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines (transcription/traduction)

### 1) Aminosides

Les aminosides se fixent sur l'ARN ribosomal 16S, constituant de la sous-unité 30S du ribosome pour altérer la traduction de l'ARN messenger et entraîner la production de protéines anormales.<sup>4</sup> Ces dernières s'incorporent également dans la membrane cytoplasmique et compromettent son intégrité. En altérant la perméabilité membranaire, les aminosides peuvent pénétrer plus massivement au sein de la bactérie et se fixer en grand nombre sur le ribosome pour bloquer la synthèse protéique. Les aminosides, tels que la streptomycine et la kanamycine, sont des antibiotiques à large spectre (actifs contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives).<sup>2</sup>

### 2) Macrolides et apparentés

Les macrolides et apparentés se fixent sur l'ARN ribosomal 23S de la sous-unité 50S du ribosome entraînant une inhibition du peptide en formation.<sup>4</sup> Ils sont habituellement bactériostatiques en provoquant une terminaison prématurée de la synthèse polypeptidique.<sup>2</sup> Les macrolides, tels que l'érythromycine, la clarithromycine et la spiramycine sont indiqués dans les infections de gravité modérée à germes sensibles telles que les infections des voies aériennes supérieures, etc.<sup>4</sup>

Les apparentés contiennent les lincosamides (comme la clindamycine) et les synergistines (comme la pristinamycine) qui sont indiqués par exemple dans les infections à Staphylocoque en toutes localisations (sauf méningée) et en particulier ostéoarticulaires.

### 3) Tétracyclines

Les tétracyclines interrompent la synthèse protéique en se fixant de manière irréversible sur la sous-unité 30S du ribosome et en empêchant la fixation de nouveaux aminoacyl-ARNt (ARN de transfert).<sup>4</sup> Les cyclines de 1<sup>ère</sup> génération (tétracycline, etc.) et 2<sup>ème</sup> génération (doxycycline) sont indiquées par exemple dans les infections aiguës des voies respiratoires.

### 4) Rifamycines

Les rifamycines inhibent la transcription de l'ADN en ARN messenger en se fixant sur une sous-unité de l'ARN polymérase et en bloquant son action.<sup>4</sup> Les antibiotiques macrocycliques (rifampicine ou rifampine) sont actifs contre les bactéries Gram-positives (y compris les mycobactéries et staphylocoques) et contre certaines bactéries Gram-négatives (*Brucella*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Legionella*).<sup>2</sup>

#### 5) Acide fusidique

L'acide fusidique inhibe la synthèse protéique en se fixant sur le facteur d'élongation EF-G.<sup>4</sup> Cette liaison empêche la fixation de nouveaux amino-acyl-ARNt et la poursuite de la synthèse protéique est bloquée. L'acide fusidique est indiqué dans les infections staphylococciques, notamment dans leurs localisations cutanées, osseuses et articulaires (en dehors des infections urinaires et méningées).

#### 6) Oxazolidinones

Les oxazolidinones forment une classe plus récente d'antibiotiques dont l'AMM date de 2001.<sup>4</sup> Le seul représentant est le linézolide qui se fixe sur la partie 23S du ribosome bactérien et empêche la formation du complexe d'initiation 70S de la traduction. Cet antibiotique est notamment indiqué dans les pneumonies.

### III. Antibiotiques inhibant le métabolisme de l'ADN

#### 1) Quinolones

Les quinolones bloquent la réplication de l'ADN en se fixant sur le complexe ADN-topoisomérase.<sup>4</sup> La topoisomérase ne peut alors pas modifier la topologie de l'ADN et le passage du superenroulement au relâchement du chromosome bactérien n'est pas possible. Ces antibiotiques sont bactéricides : ils stabilisent les coupures d'ADN et déclenchent ainsi des phénomènes d'autolyse. Les quinolones de première génération (acide nalidixique, etc.) et de deuxième génération (fluoroquinolones), telles que la norfloxacine ou la ciprofloxacine, sont notamment indiqués dans les infections urinaires, les maladies sexuellement transmissibles et les infections gynécologiques, etc.

#### 2) Imidazolés

Les nitro-imidazolés se lient dans le cytoplasme à des protéines réductrices telles que les ferrédoxines (composés du transport des électrons).<sup>2,4</sup> La réduction du groupe nitro permet la production de dérivés cytotoxiques à durée de vie courte et pouvant cliver l'ADN (ce phénomène touche uniquement les bactéries anaérobies strictes). Les imidazolés, tel que le métronidazole, sont indiqués dans le traitement curatif des infections péritonéales et génitopelviennes par exemple.<sup>4</sup>

#### 3) Sulfamides antibactériens

L'association sulfamides/triméthoprime regroupe deux antimétabolites qui vont entrer en compétition avec les substrats naturels de la synthèse des folates. Ces derniers sont des substrats carbonés utilisés par les bactéries dans la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN).<sup>4</sup> Ainsi, la fabrication des acides nucléiques est diminuée et la croissance bactérienne

est ralentie. Les sulfamides antibactériens, tels que la sulfadiazine et le sulfasalazine, sont principalement indiqués dans les infections urinaires basses à germe banal, non compliquées (surtout des germes à Gram négatif) lors de cystites par exemple.

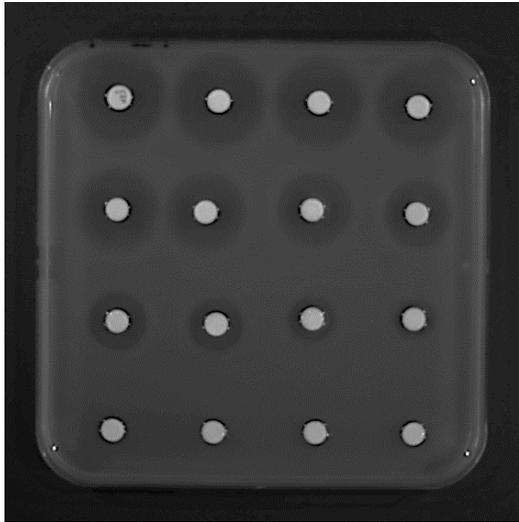
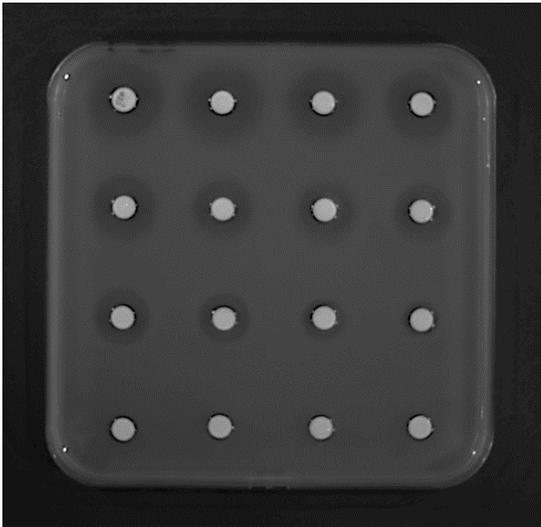
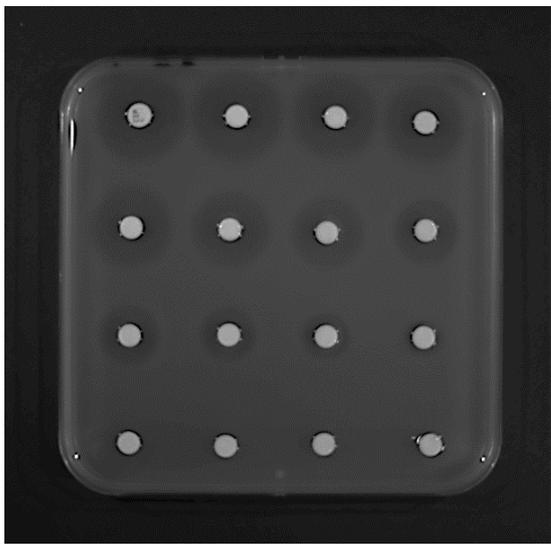
#### 4) Nitrofuranes

Les nitrofuranes, telle que la nitrofurantoïne, tirent leur activité de la réduction du groupement nitro par certaines bactéries aérobies.<sup>4</sup> Cette réduction produit des dérivés réduits capables de provoquer des lésions de l'ADN à la différence des nitro-imidazolés pour lesquels seules les bactéries anaérobies avaient cette faculté. Ces antibiotiques sont indiqués dans le traitement de la cystite aigue non compliquée de la femme due à des bactéries sensibles.

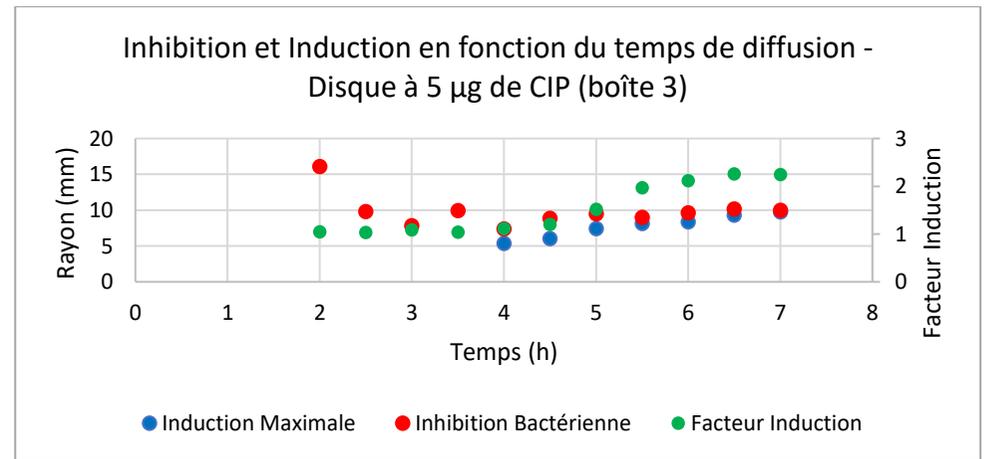
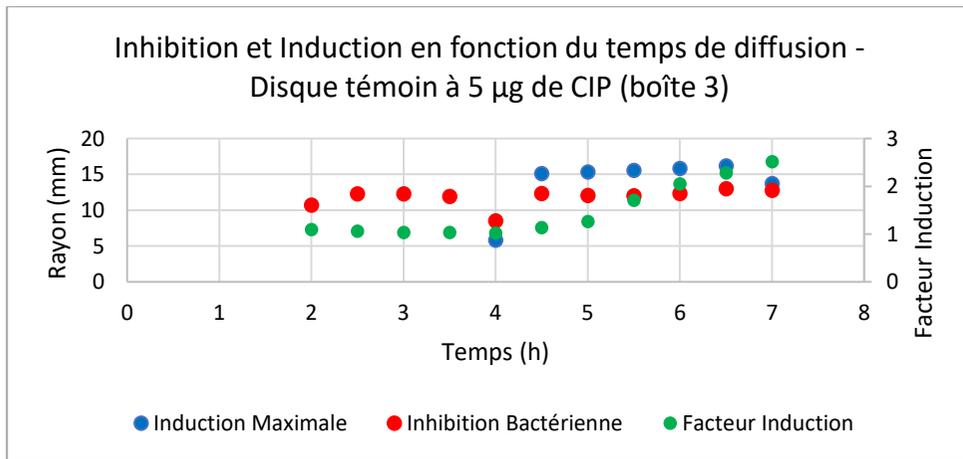
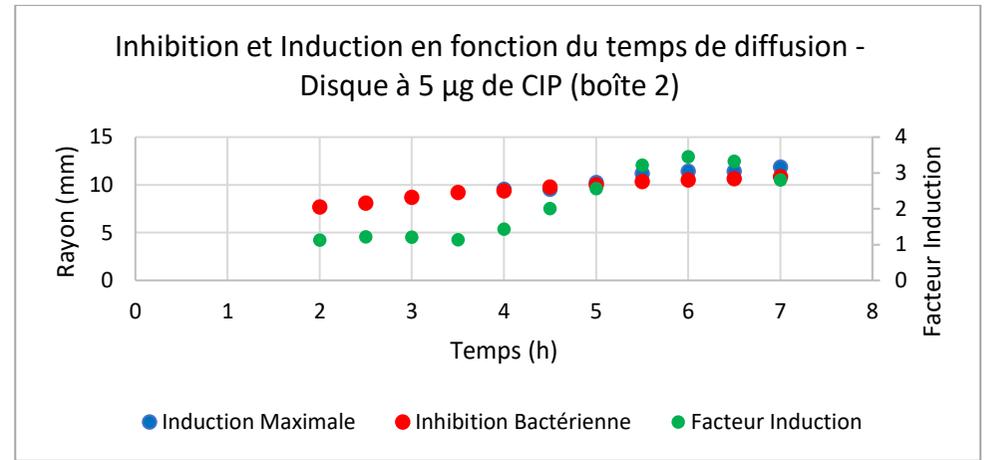
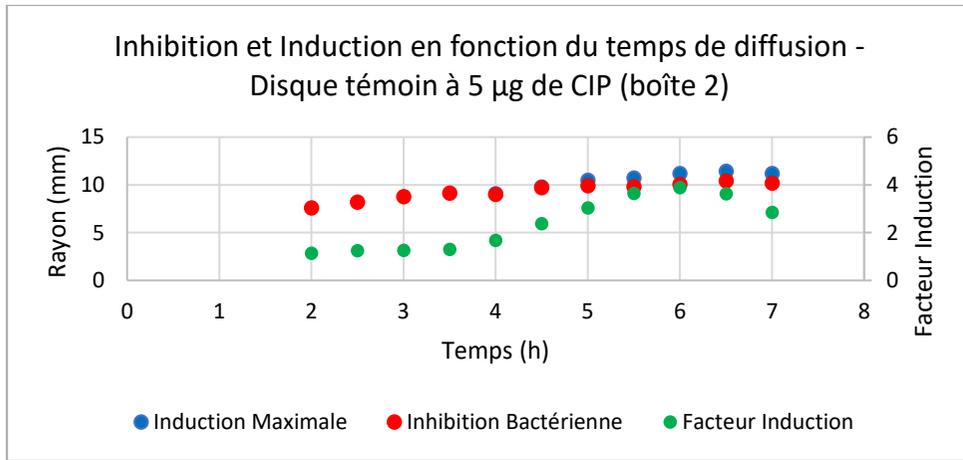
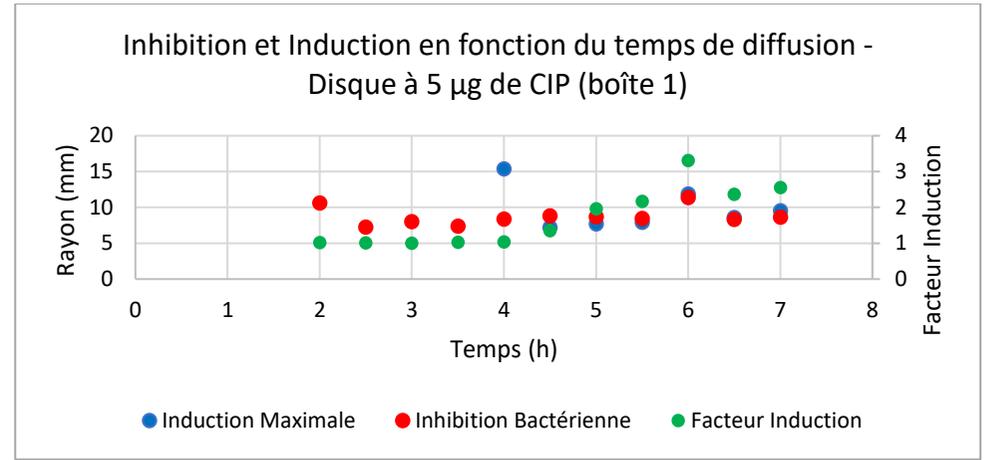
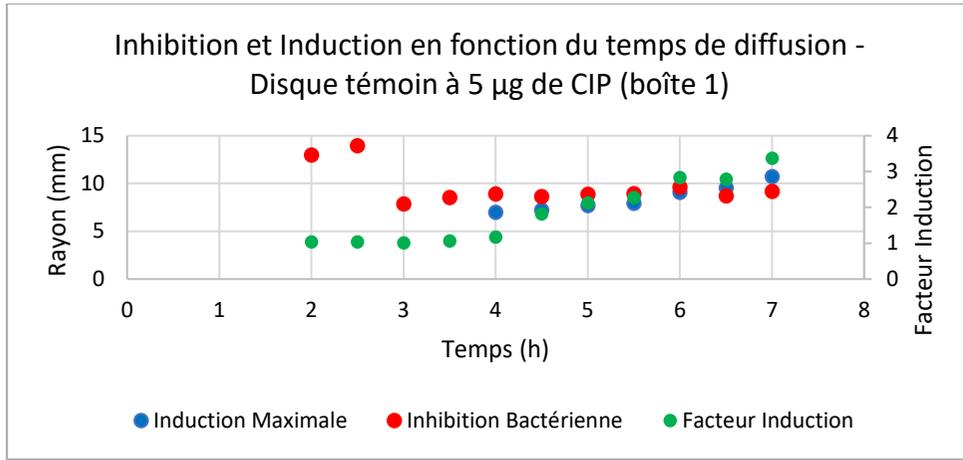
#### IV. Antibiotiques altérant la membrane cytoplasmique

Il s'agit des polymyxines (dont la plus connue est la colistine), qui altèrent la membrane plasmique après avoir désorganisé la membrane externe de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif.<sup>4</sup> Ces antibiotiques sont notamment indiqués en tant qu'antiseptique intestinal mais aussi dans les infections rénales et urogénitales à germes sensibles lorsque les traitements usuels sont exclus.

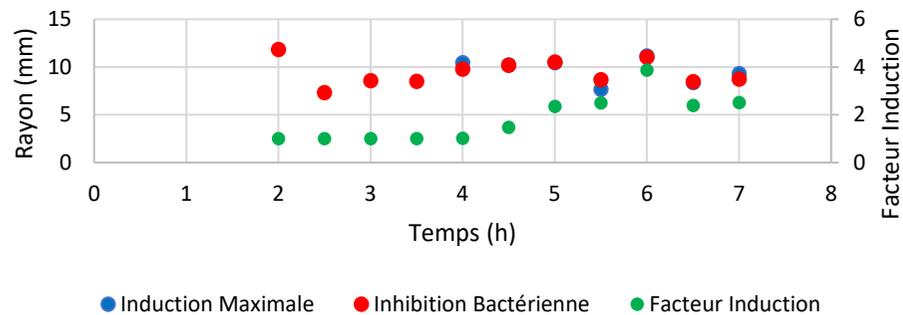
Annexe II : Photographies des boîtes de Petri obtenues à la lumière visible après 7 heures d'incubation (manipulation 1)

	Lumière visible
Boîte de Petri 1	
Boîte de Petri 2	
Boîte de Petri 3	

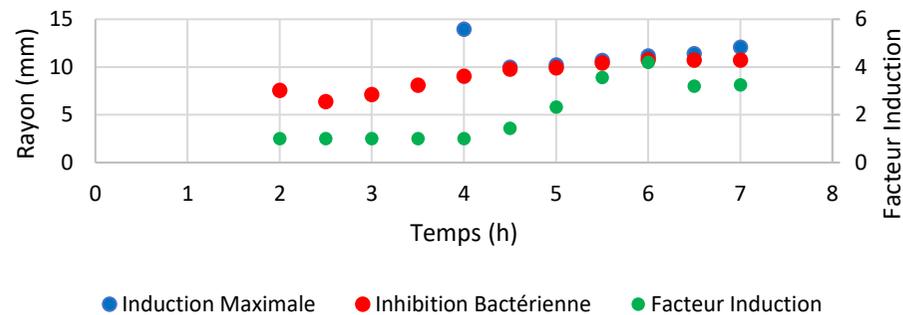
Annexe III : Évolution de l'inhibition et de l'induction en fonction du temps de diffusion pour différentes quantités de ciprofloxacine (manipulation 1)



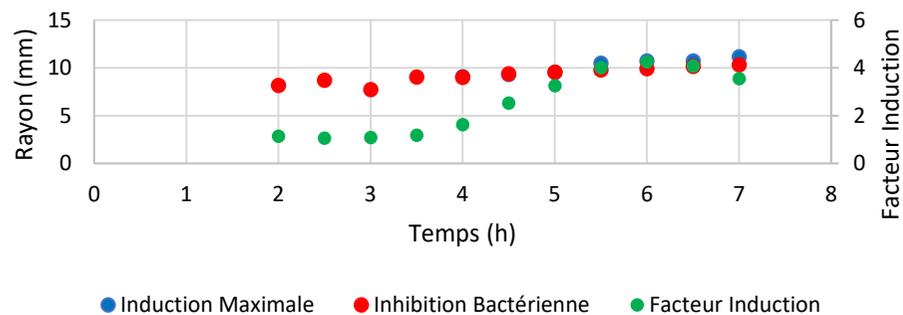
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 2,5 µg de CIP (boîte 1)



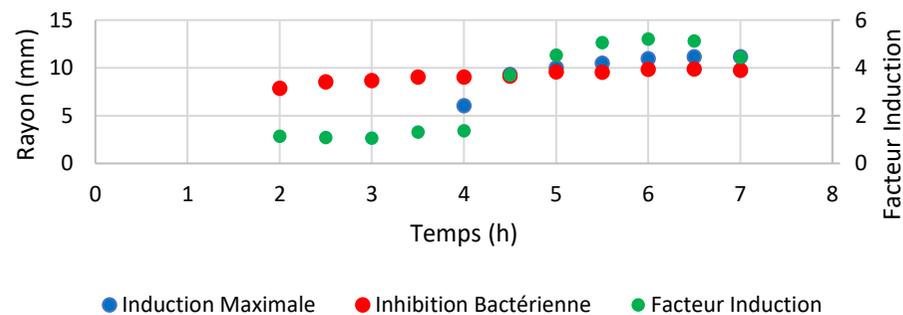
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 1,25 µg de CIP (boîte 1)



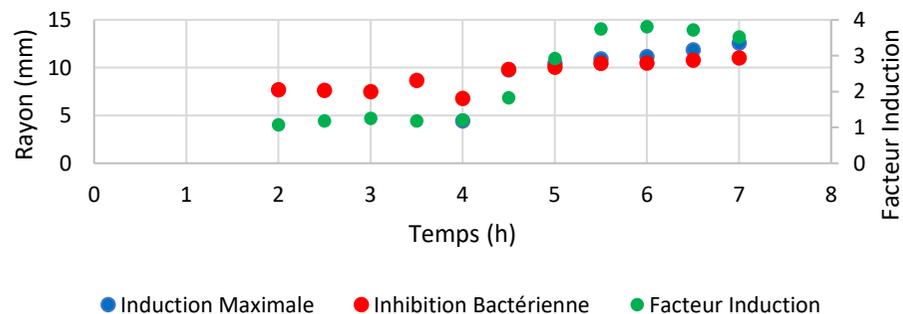
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 2,5 µg de CIP (boîte 2)



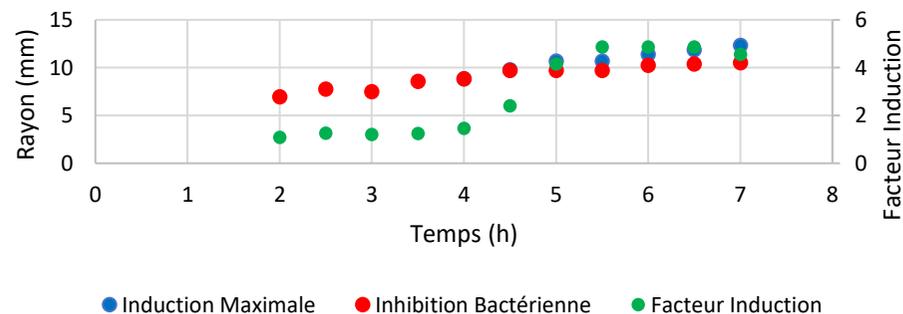
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 1,25 µg de CIP (boîte 2)



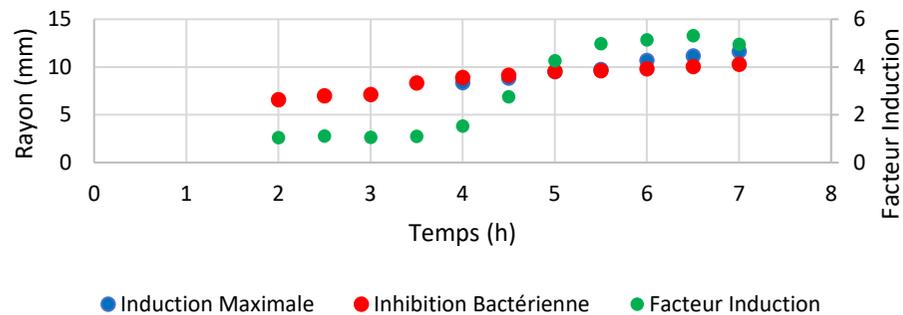
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 2,5 µg de CIP (boîte 3)



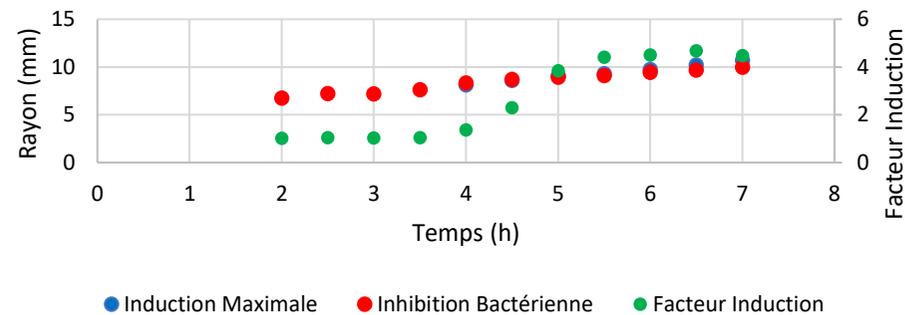
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 1,25 µg de CIP (boîte 3)



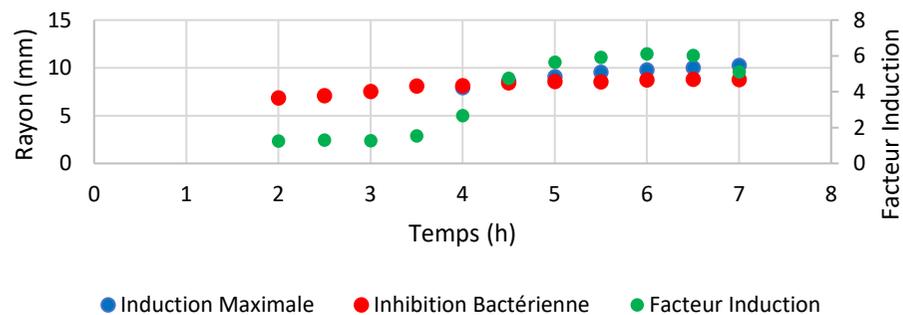
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,625 µg de CIP (boîte 1)



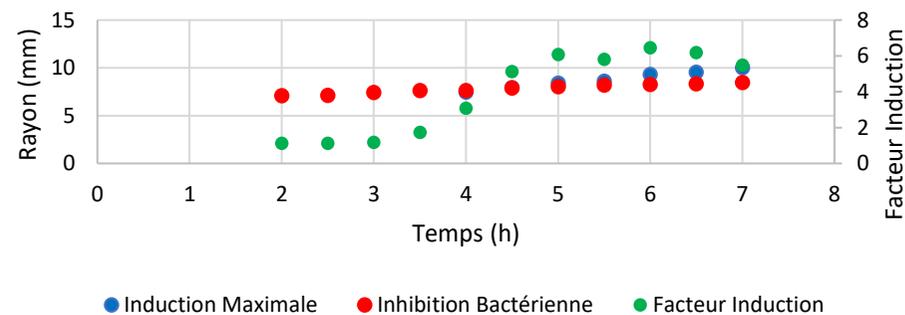
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,3125 µg de CIP (boîte 1)



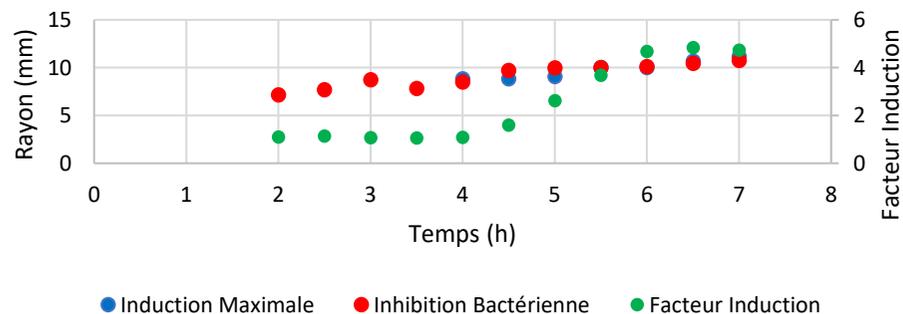
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,625 µg de CIP (boîte 2)



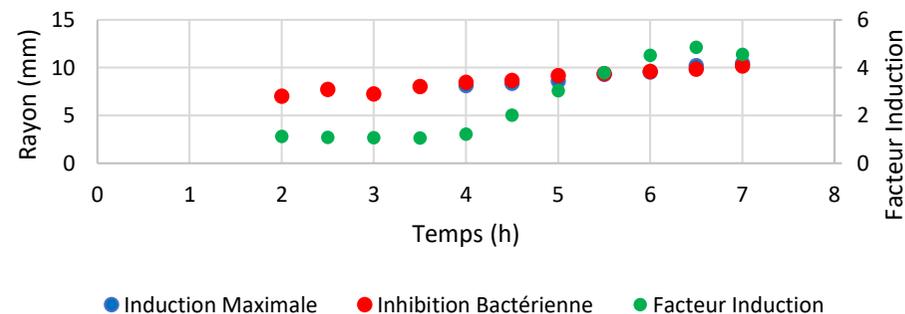
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,3125 µg de CIP (boîte 2)



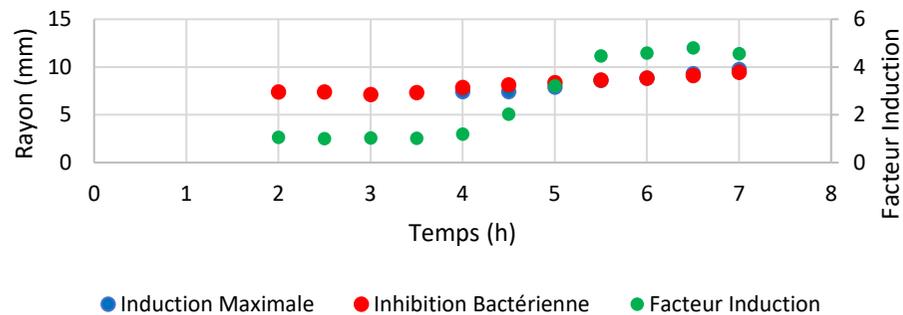
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,625 µg de CIP (boîte 3)



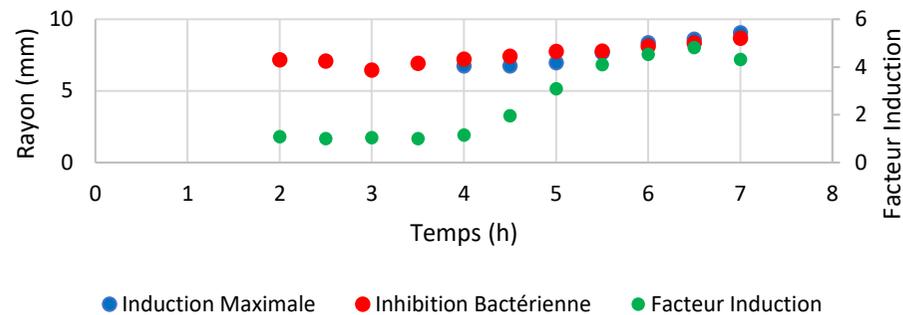
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,3125 µg de CIP (boîte 3)



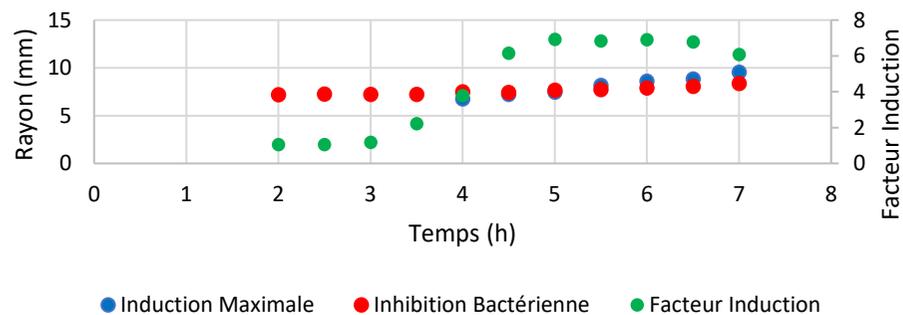
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,1563 µg de CIP (boîte 1)



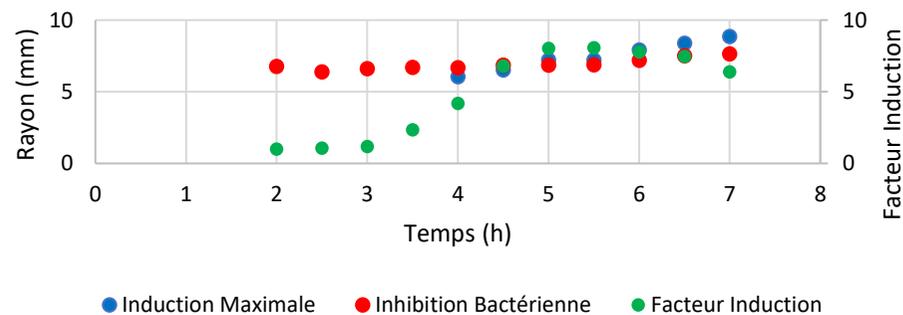
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0781 µg de CIP (boîte 1)



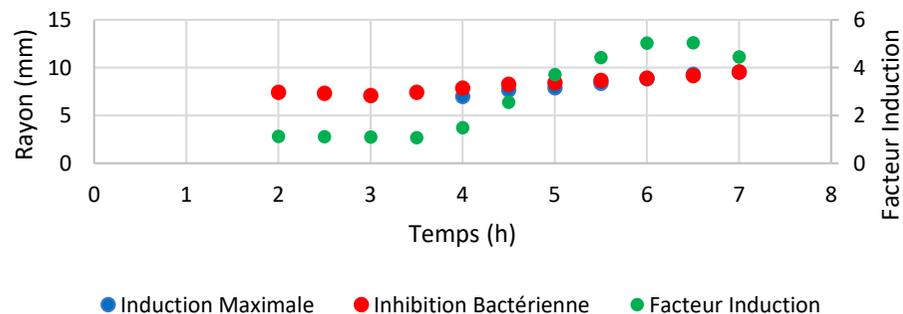
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,1563 µg de CIP (boîte 2)



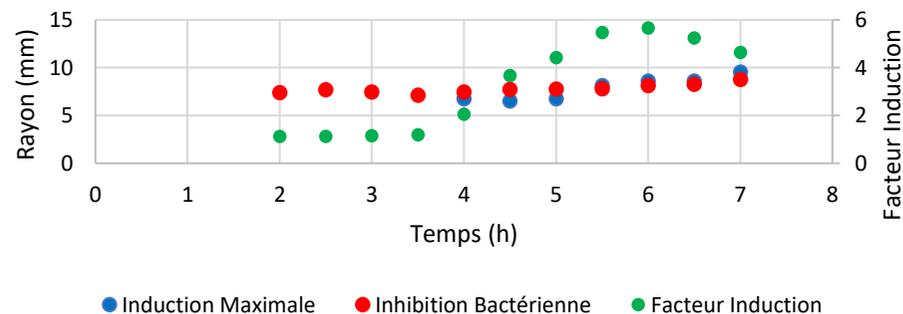
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0781 µg de CIP (boîte 2)



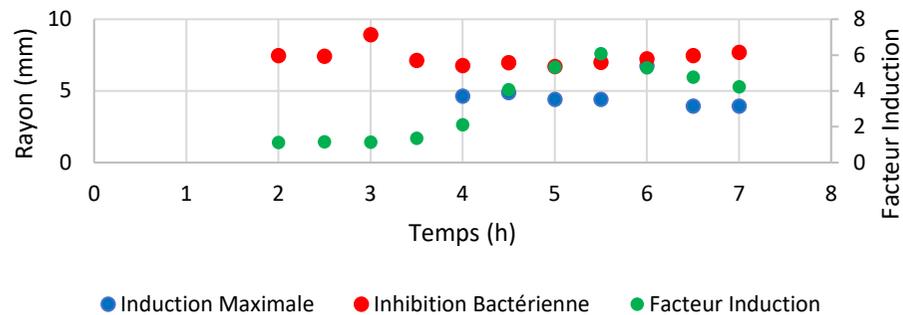
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,1563 µg de CIP (boîte 3)



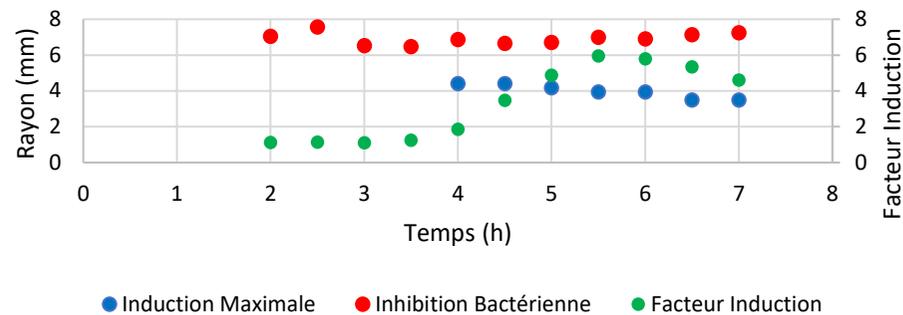
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0781 µg de CIP (boîte 3)



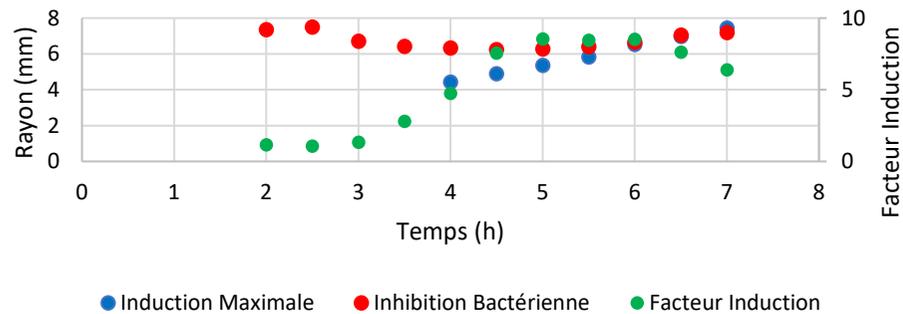
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0391 µg de CIP (boîte 1)



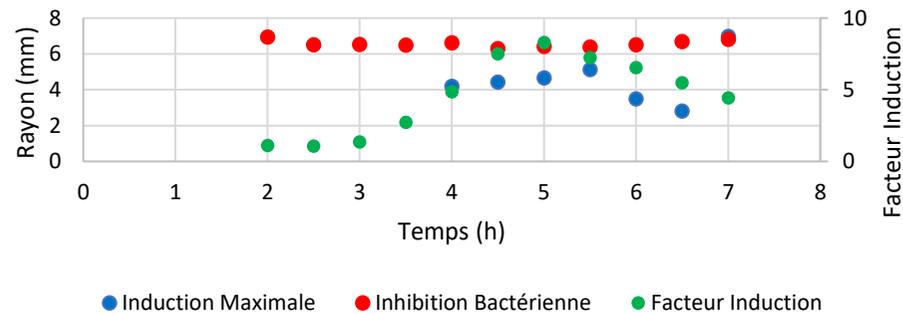
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0195 µg de CIP (boîte 1)



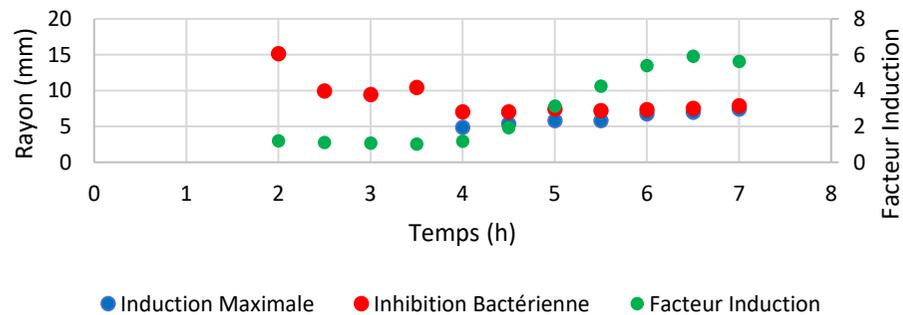
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0391 µg de CIP (boîte 2)



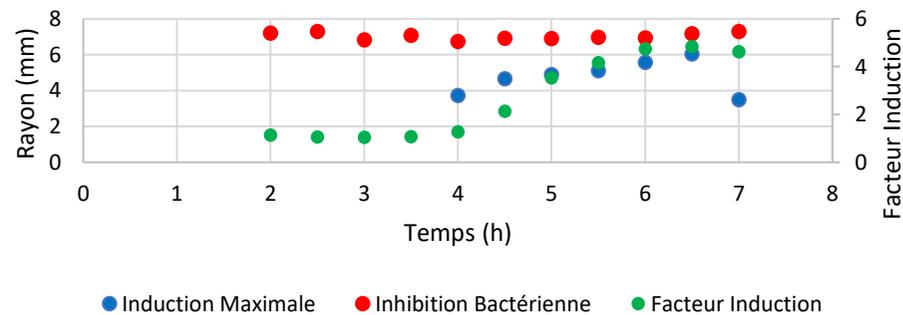
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0195 µg de CIP (boîte 2)



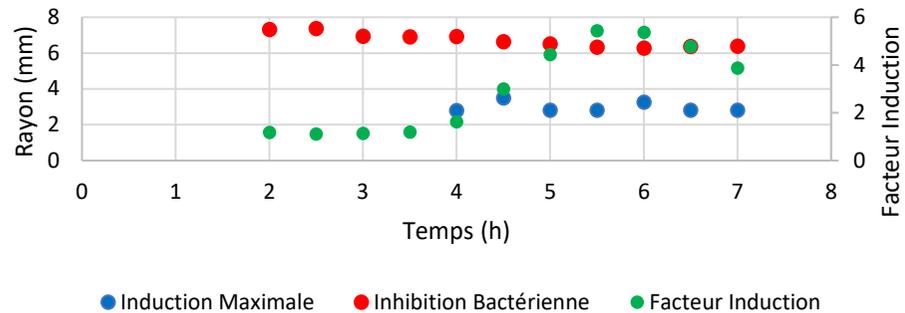
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0391 µg de CIP (boîte 3)



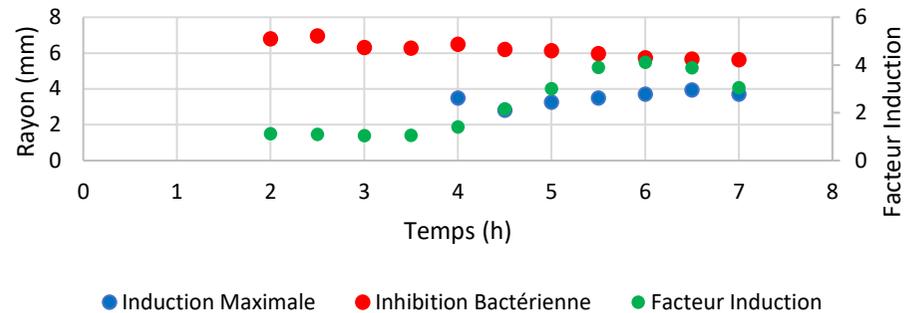
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0195 µg de CIP (boîte 3)



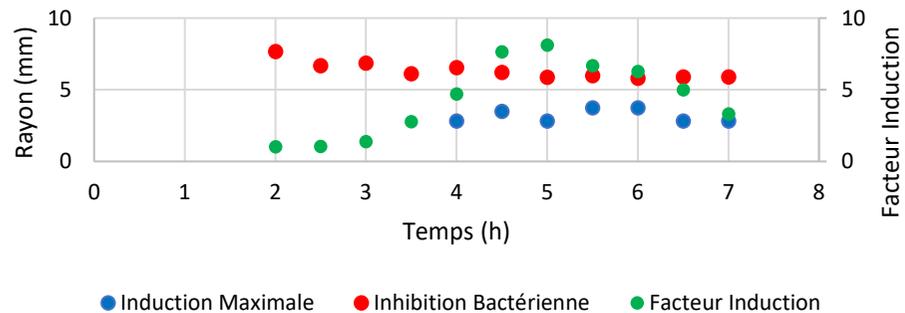
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0098 µg de CIP (boîte 1)



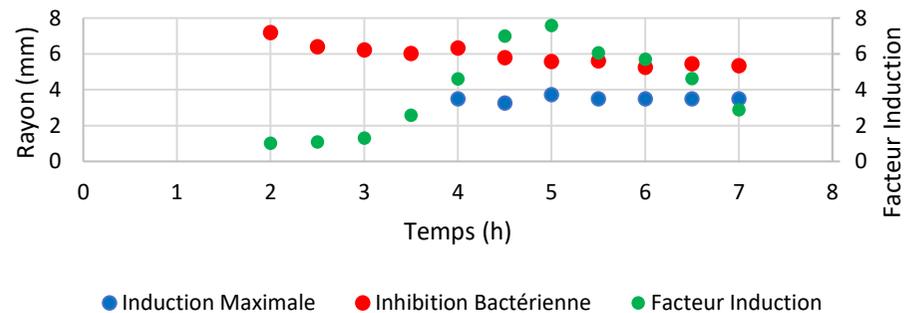
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0049 µg de CIP (boîte 1)



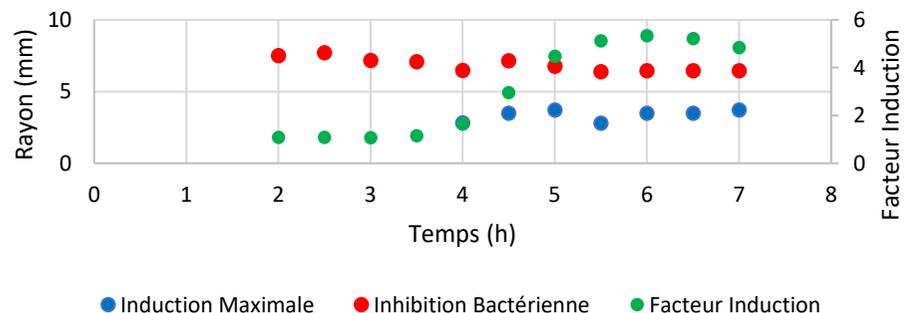
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0098 µg de CIP (boîte 2)



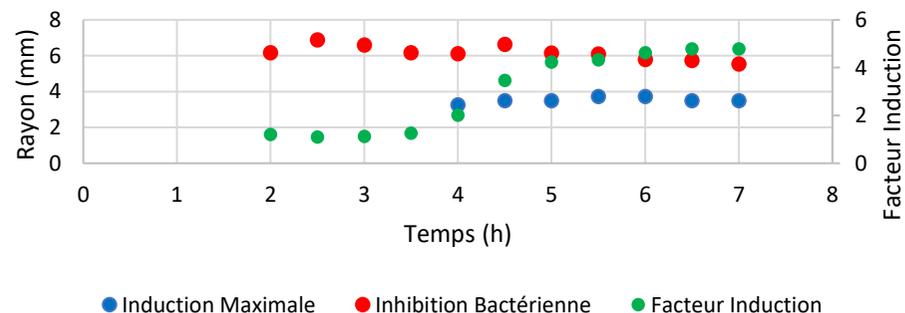
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0049 µg de CIP (boîte 2)



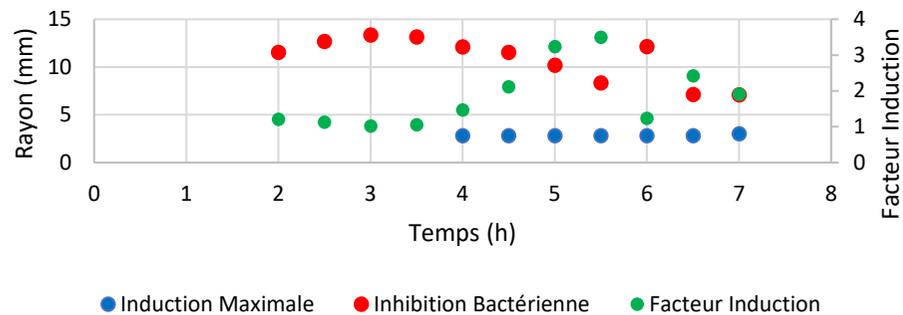
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0098 µg de CIP (boîte 3)



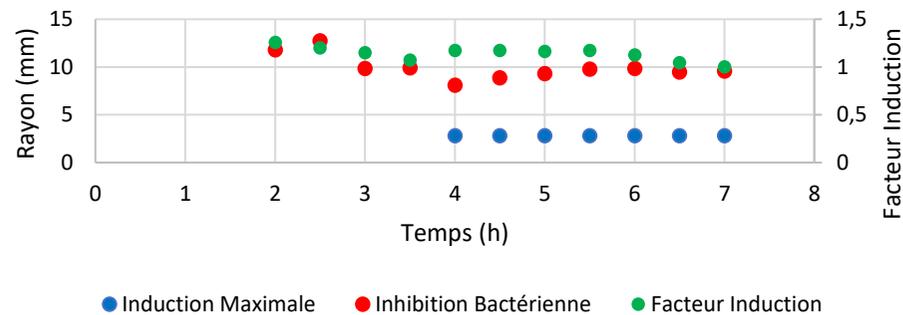
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0049 µg de CIP (boîte 3)



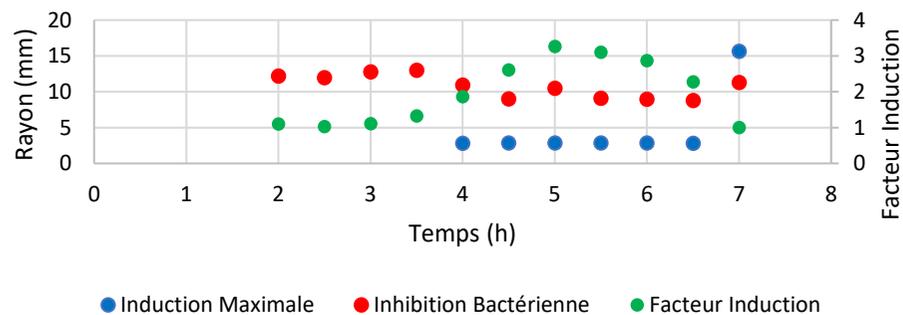
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0024 µg de CIP (boîte 1)



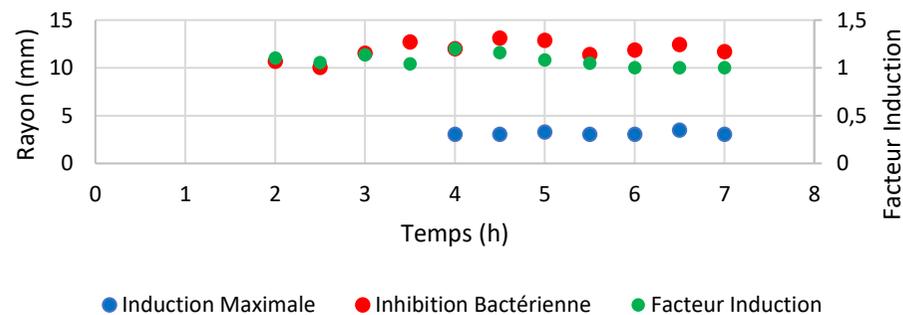
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0012 µg de CIP (boîte 1)



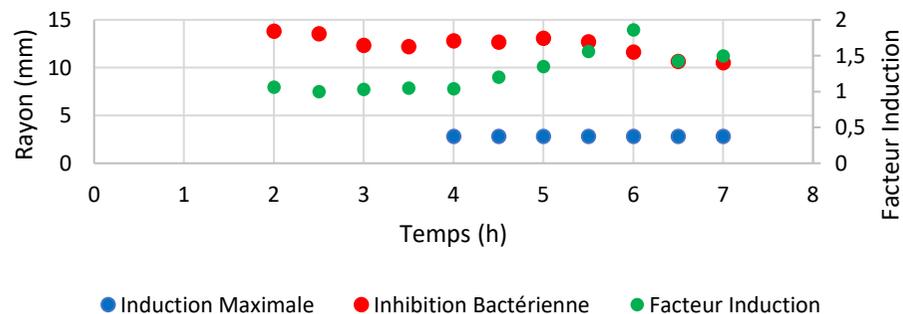
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0024 µg de CIP (boîte 2)



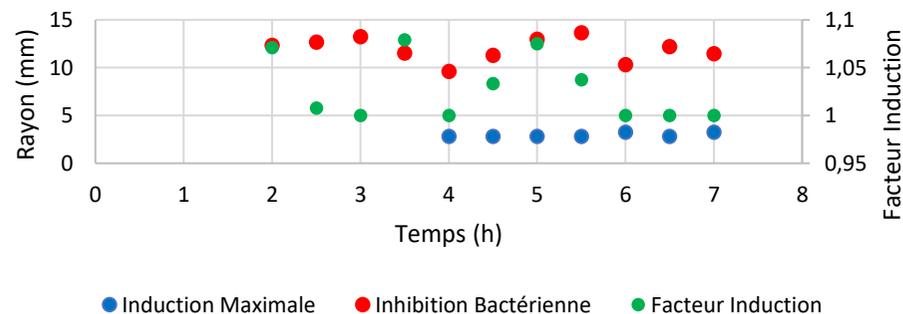
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0012 µg de CIP (boîte 2)



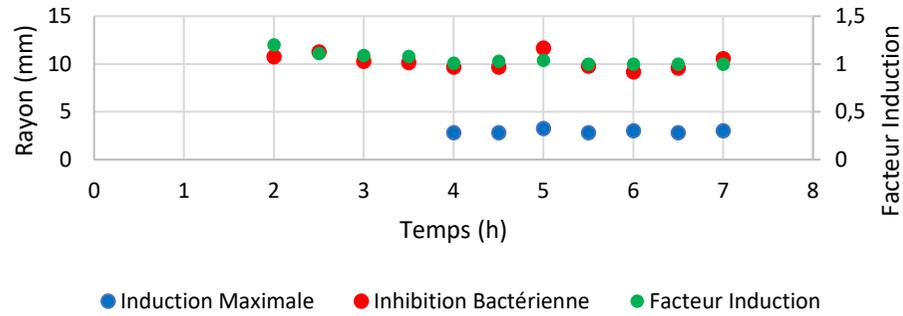
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0024 µg de CIP (boîte 3)



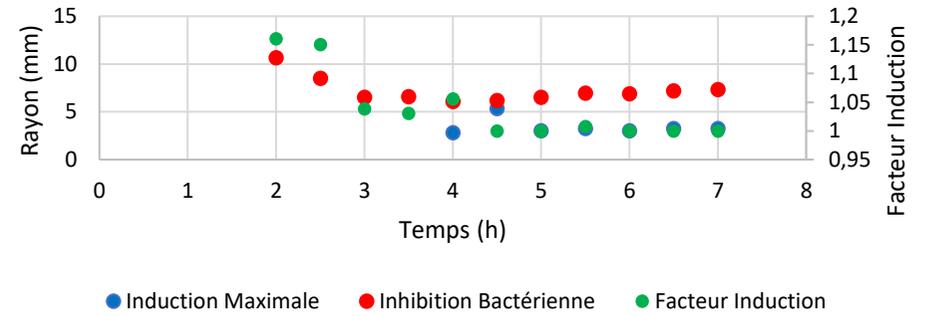
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0012 µg de CIP (boîte 3)



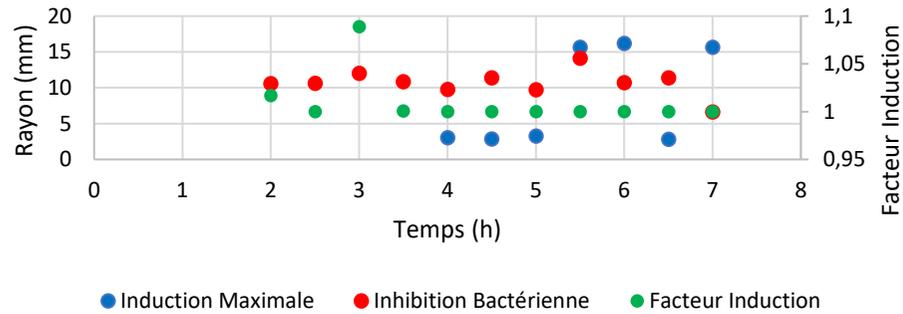
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0006 µg de CIP (boîte 1)



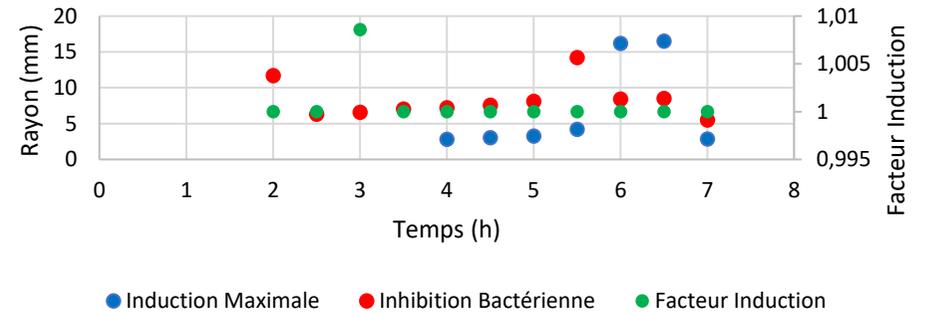
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0003 µg de CIP (boîte 1)



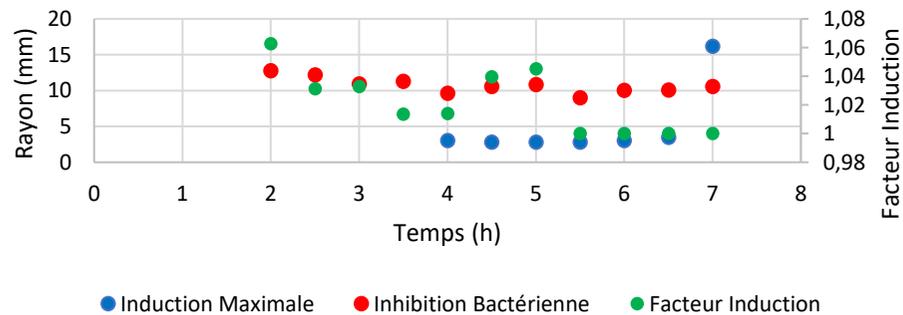
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0006 µg de CIP (boîte 2)



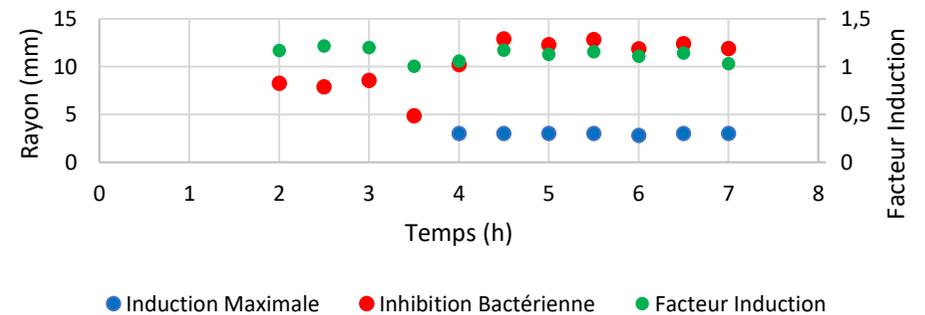
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0003 µg de CIP (boîte 2)



Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0006 µg de CIP (boîte 3)



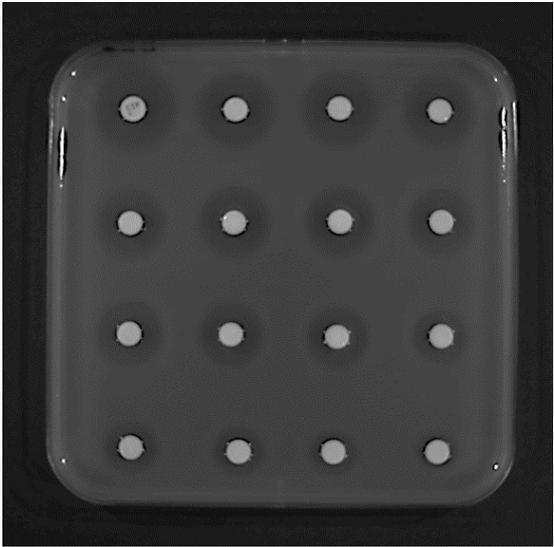
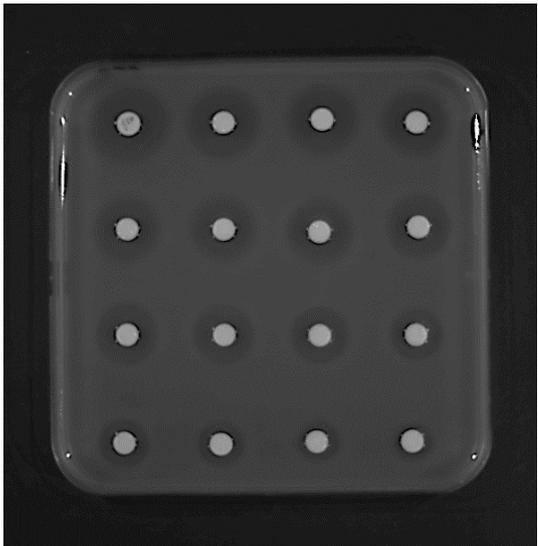
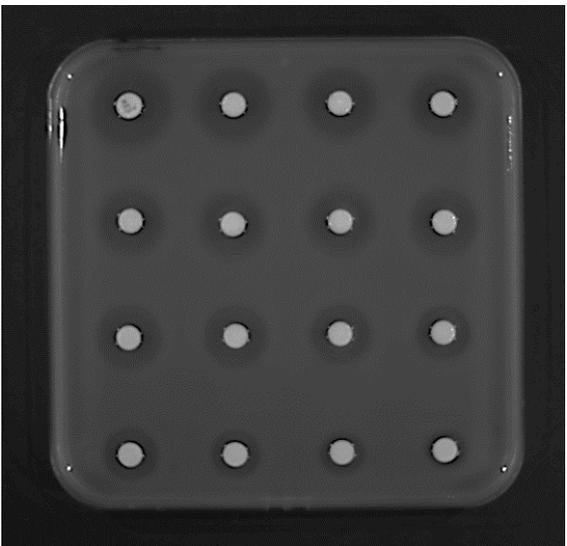
Inhibition et Induction en fonction du temps de diffusion -  
Disque à 0,0003 µg de CIP (boîte 3)



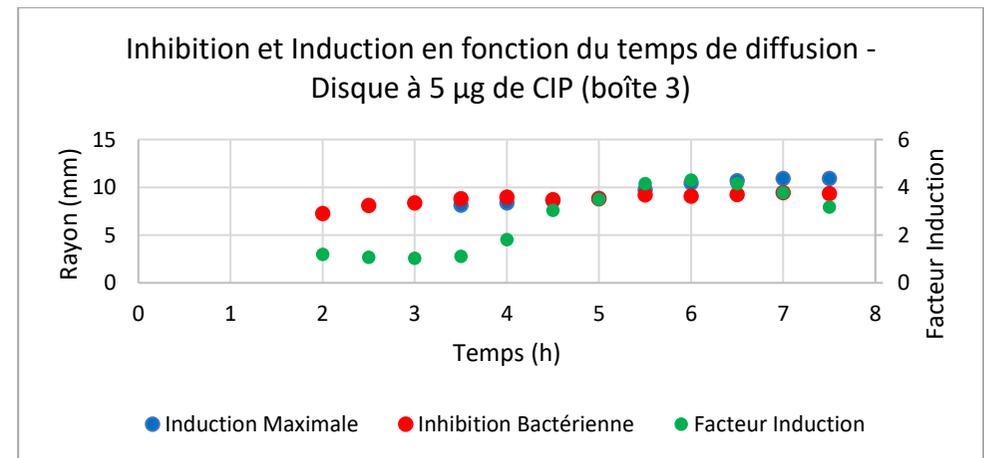
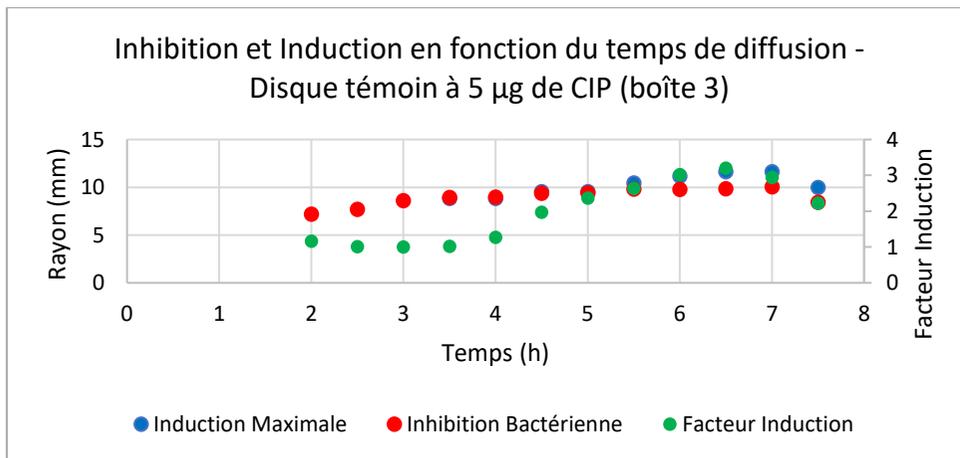
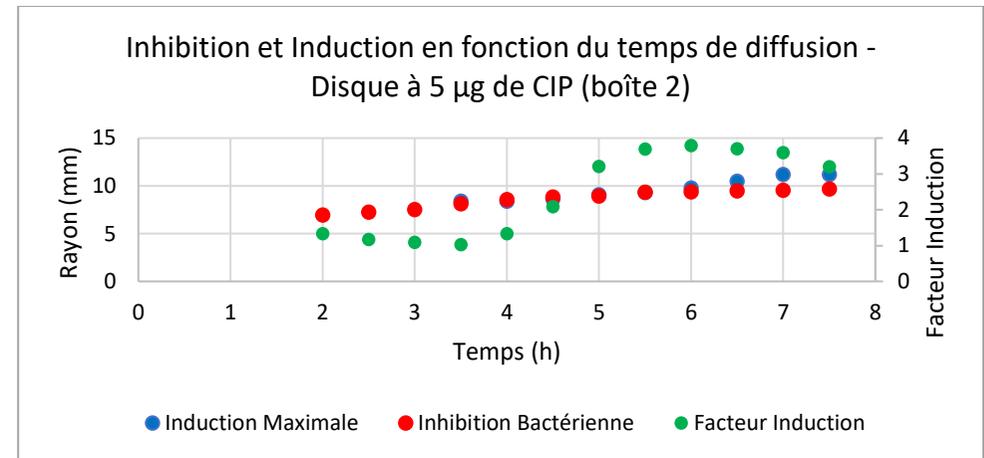
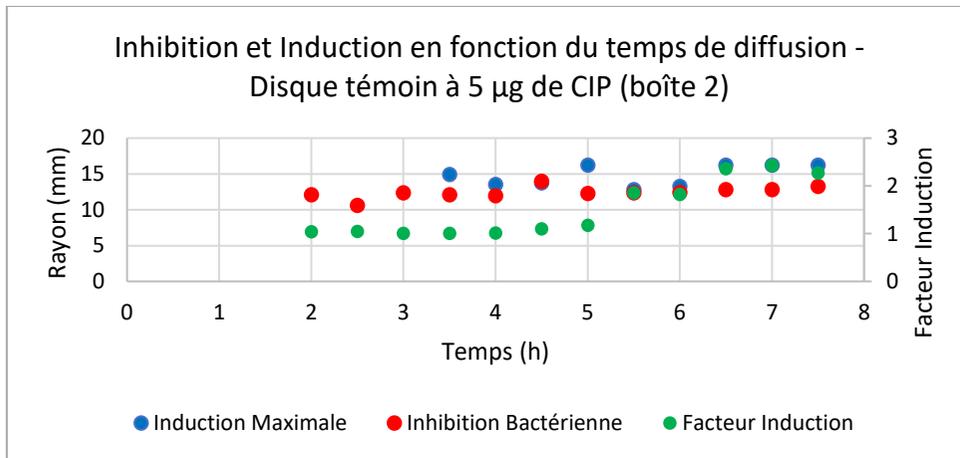
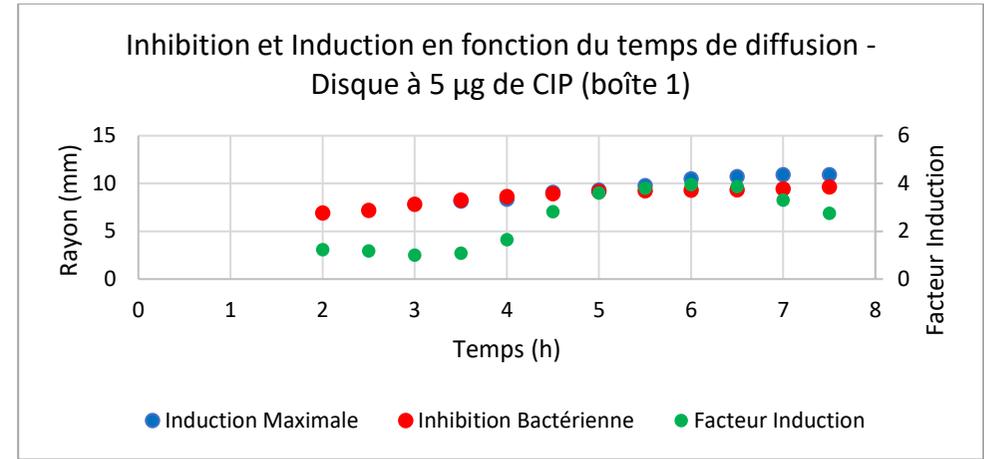
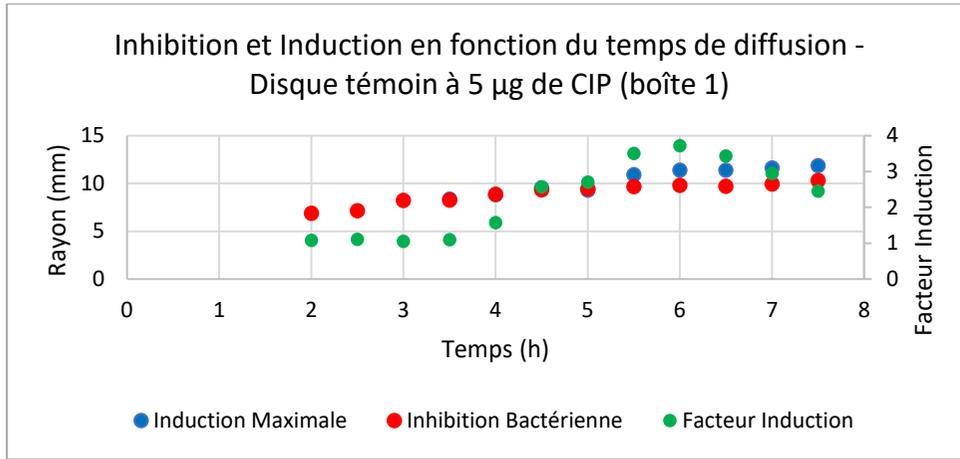
Annexe IV : Détermination des temps d'incubation nécessaires pour avoir un facteur d'induction du promoteur P<sub>S086</sub> interprétable (manipulation 1)

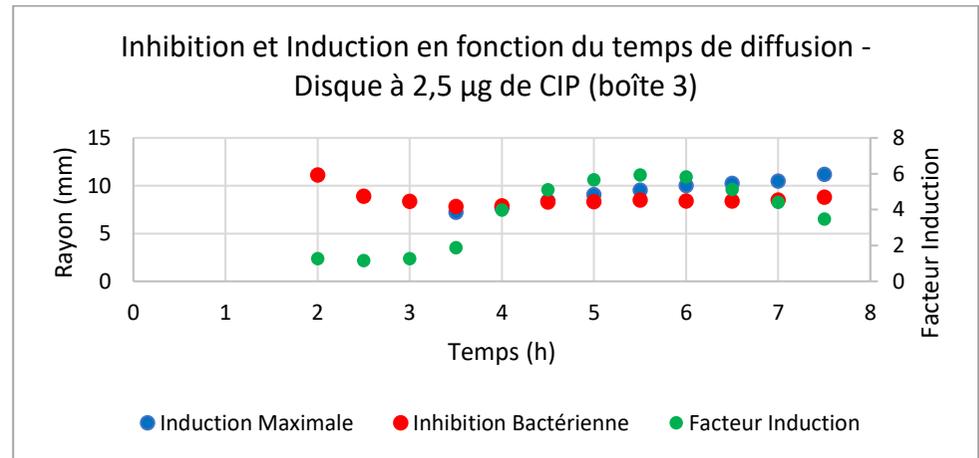
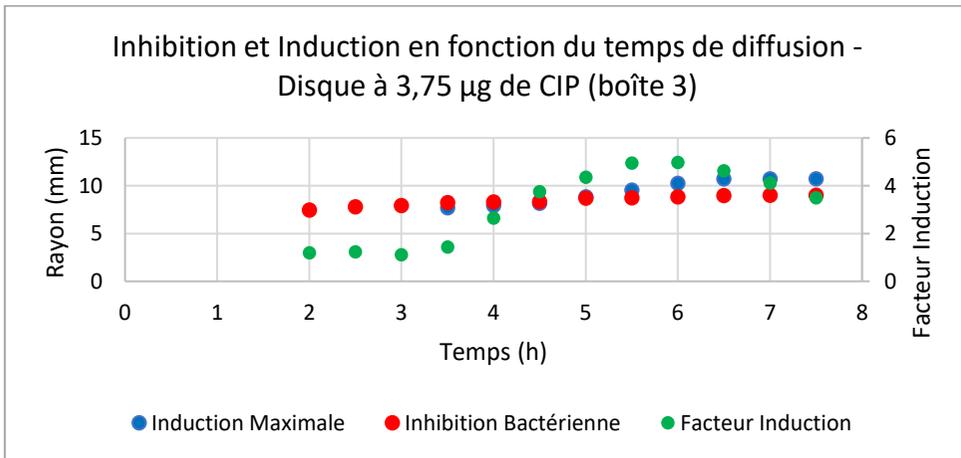
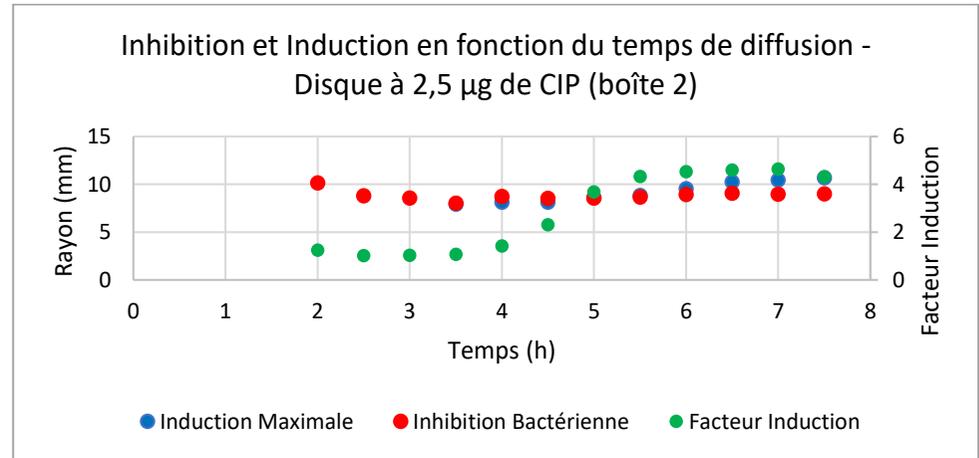
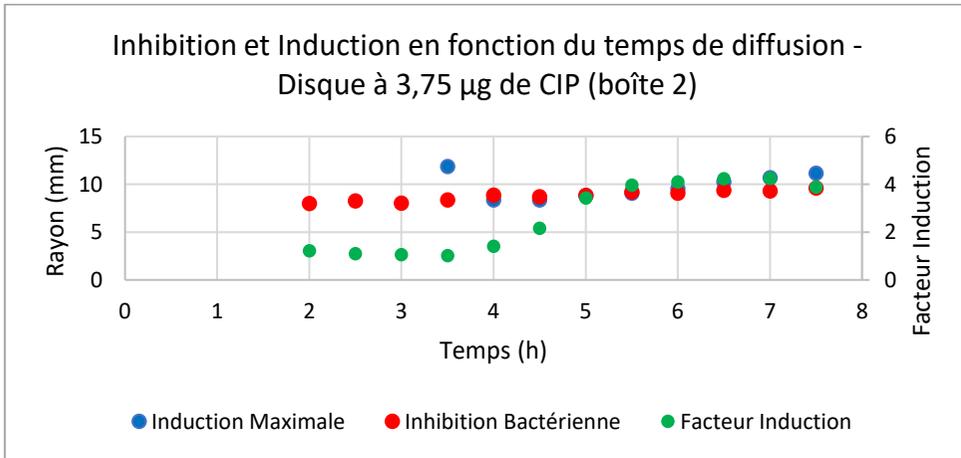
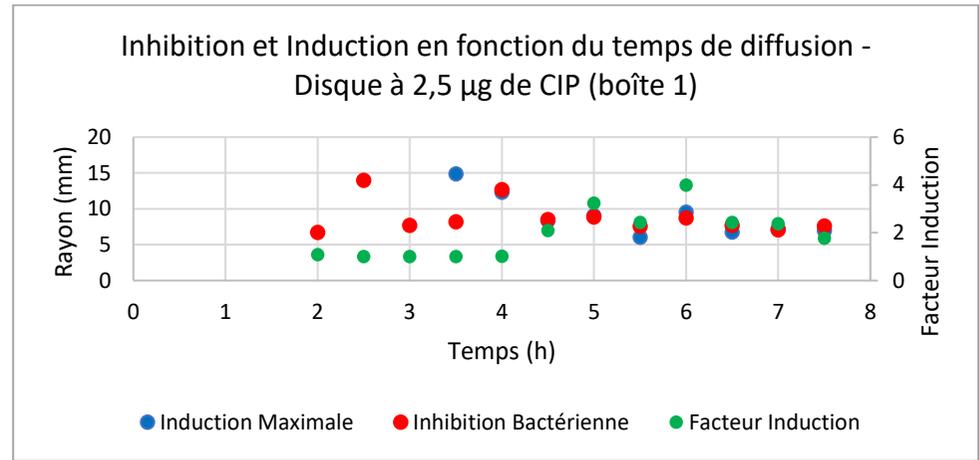
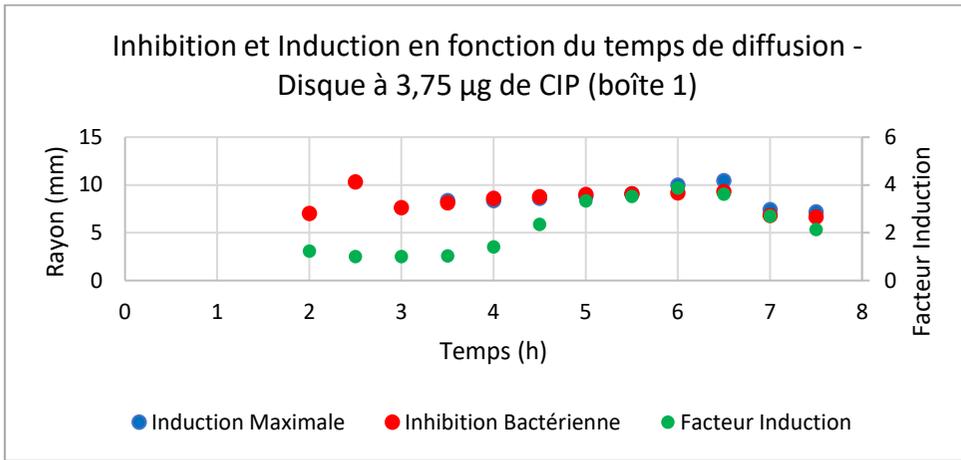
Diffusion CIP en milieu LB gélosé (manipulation 1)		Temps d'incubation requis pour avoir bruit de fond moyen > limite de quantification de 100 cps (h)	Temps d'incubation requis pour avoir intensité de luminescence maximale moyenne > limite de quantification de 100 cps (h)	Temps requis pour avoir un facteur d'induction interprétable (h)
Disque 0 5 µg CIP	Boîte 1	4,5	4,5	4,5
	Boîte 2	5,5	4,5	5,5
	Boîte 3	5,5	5,5	5,5
Disque 1 5 µg CIP	Boîte 1	5	4,5	5
	Boîte 2	5,5	4,5	5,5
	Boîte 3	5,5	5	5,5
Disque 2 2,5 µg CIP	Boîte 1	5	4,5	5
	Boîte 2	5,5	4,5	5,5
	Boîte 3	5,5	4,5	5,5
Disque 3 1,25 µg CIP	Boîte 1	5,5	4,5	5,5
	Boîte 2	5,5	4,5	5,5
	Boîte 3	5,5	4,5	5,5
Disque 4 0,625 µg CIP	Boîte 1	5	4	5
	Boîte 2	5,5	4	5,5
	Boîte 3	6	5	6
Disque 5 0,3125 µg CIP	Boîte 1	5	4	5
	Boîte 2	5,5	4	5,5
	Boîte 3	5,5	4,5	5,5
Disque 6 0,1563 µg CIP	Boîte 1	5	4,5	5
	Boîte 2	5,5	4	5,5
	Boîte 3	5,5	4,5	5,5
Disque 7 0,0781 µg CIP	Boîte 1	5,5	4,5	5,5
	Boîte 2	5,5	4	5,5
	Boîte 3	6	4,5	6
Disque 8 0,0391 µg CIP	Boîte 1	5	4	5
	Boîte 2	6	4	6
	Boîte 3	7	5	7
Disque 9 0,0195 µg CIP	Boîte 1	5	4	5
	Boîte 2	6	4	6
	Boîte 3	6,5	4,5	6,5
Disque 10 0,0098 µg CIP	Boîte 1	5,5	4	5,5
	Boîte 2	6	4	6
	Boîte 3	6,5	4,5	6,5
Disque 11 0,0049 µg CIP	Boîte 1	6	4,5	6
	Boîte 2	6,5	4	6,5
	Boîte 3	7	4,5	7
Disque 12 0,0024 µg CIP	Boîte 1	6	4	6
	Boîte 2	7	4,5	7
	Boîte 3	N/A	6	N/A
Disque 13 0,0012 µg CIP	Boîte 1	6	5	6
	Boîte 2	7	7	7
	Boîte 3	N/A	N/A	N/A
Disque 14 0,0006 µg CIP	Boîte 1	6	6	6
	Boîte 2	N/A	N/A	N/A
	Boîte 3	N/A	N/A	N/A
Disque 15 0,0003 µg CIP	Boîte 1	6,5	6,5	6,5
	Boîte 2	N/A	N/A	N/A
	Boîte 3	N/A	N/A	N/A

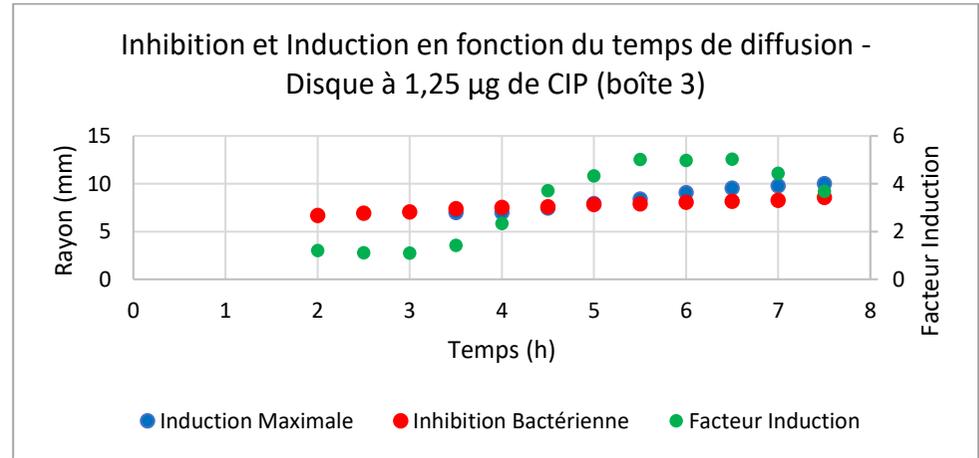
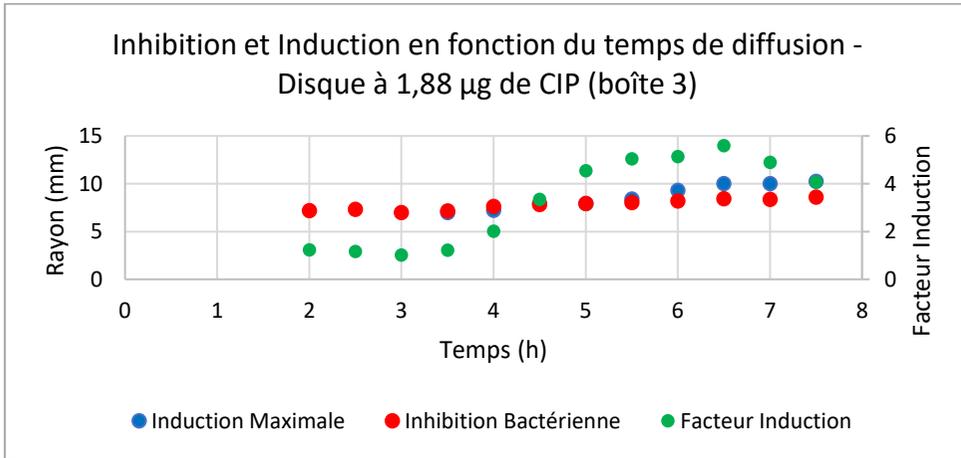
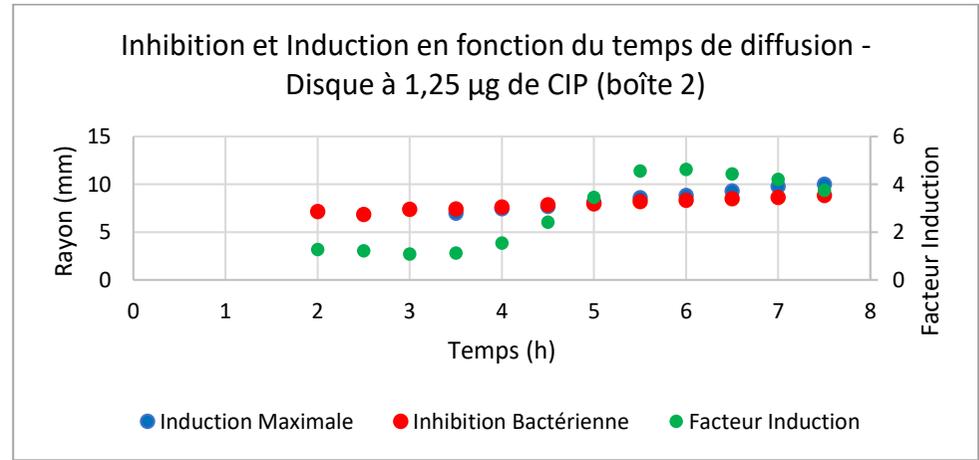
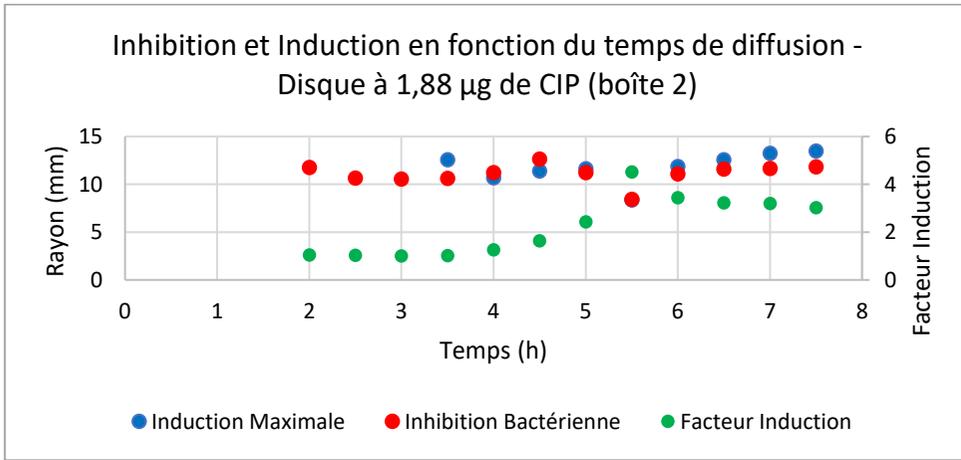
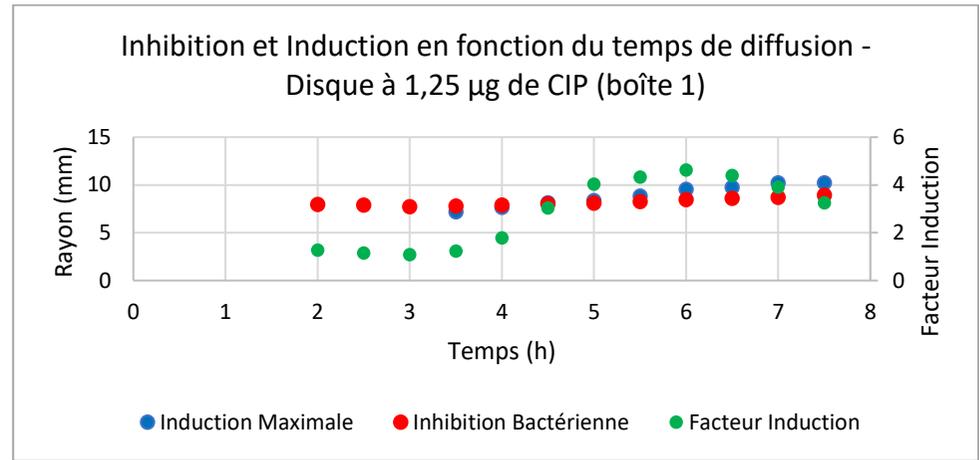
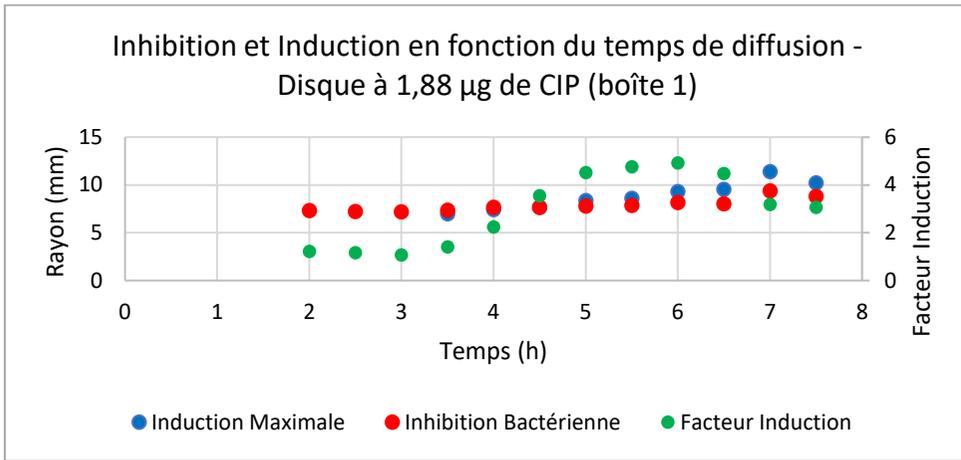
Annexe V : Photographies des boîtes de Petri obtenues à la lumière visible après 7,5 heures d'incubation (manipulation 2)

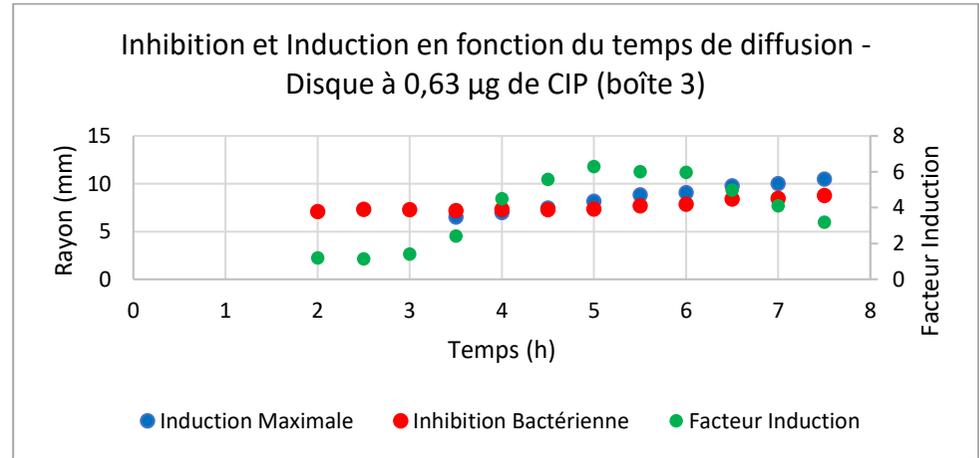
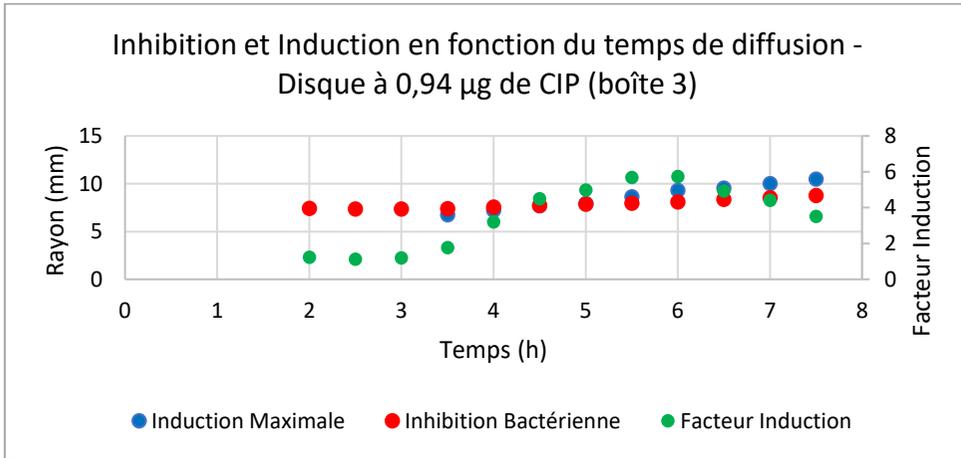
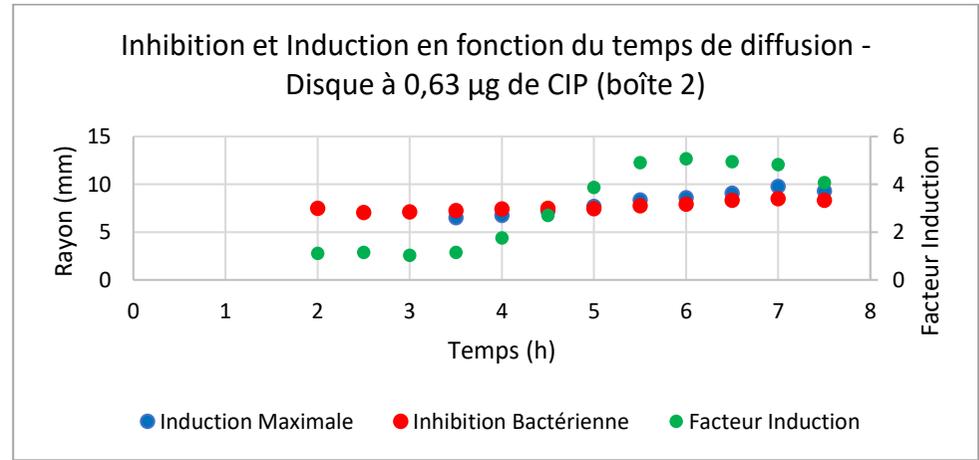
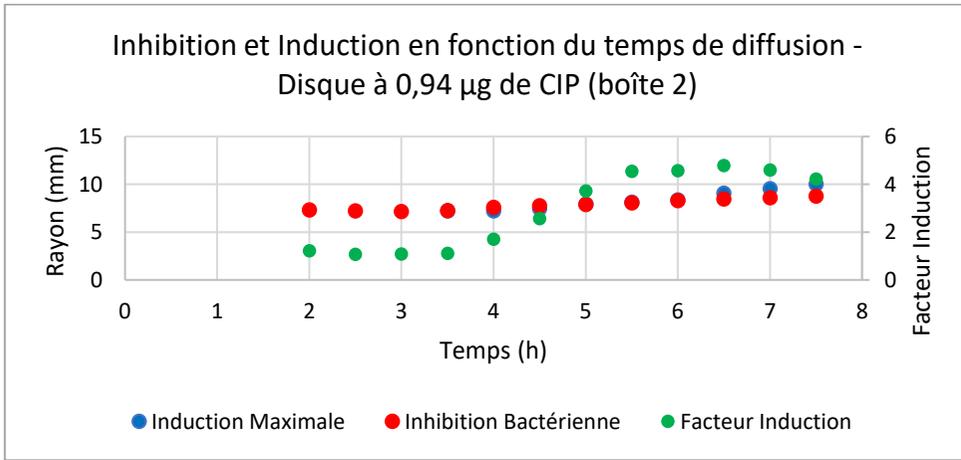
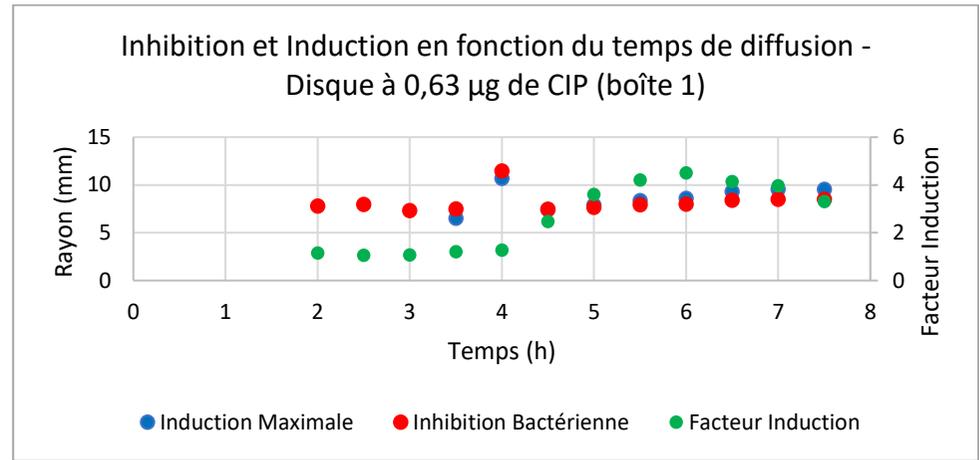
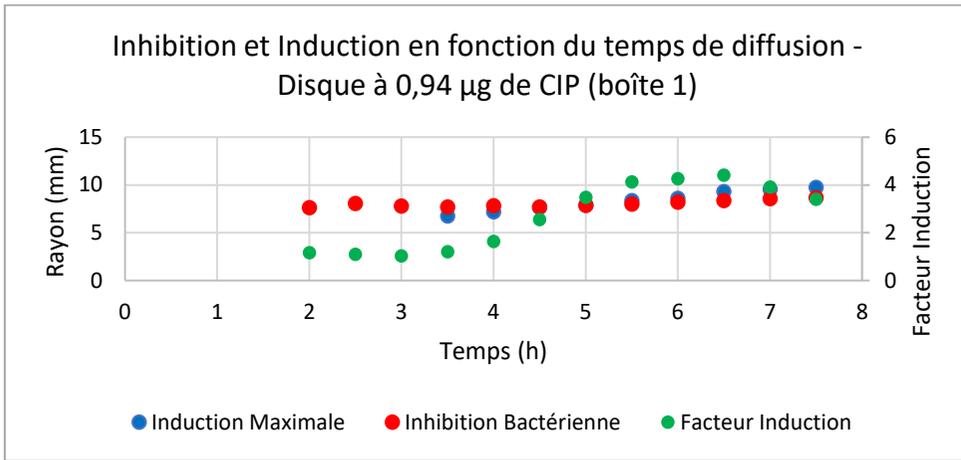
	Lumière visible
<b>Boîte de Petri 1</b>	
<b>Boîte de Petri 2</b>	
<b>Boîte de Petri 3</b>	

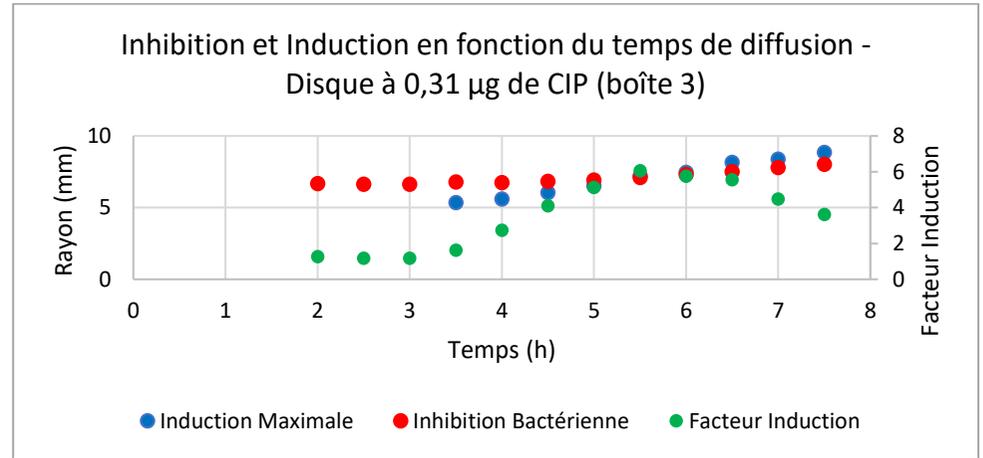
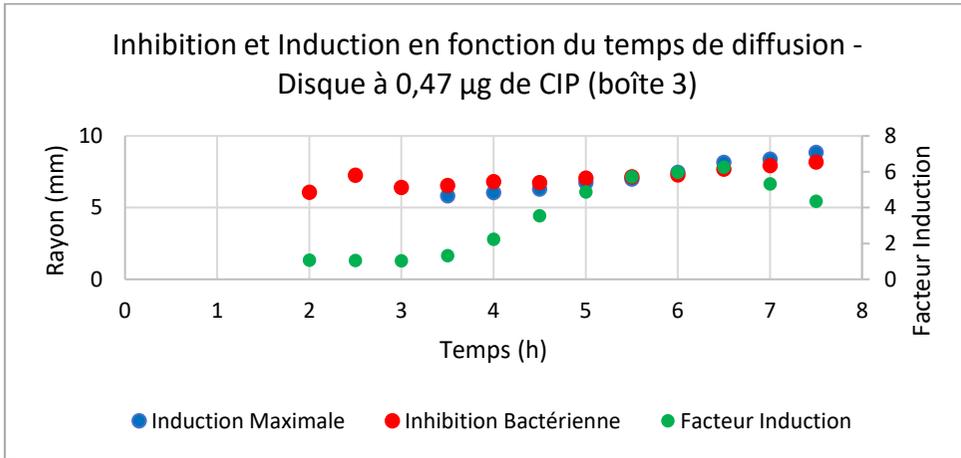
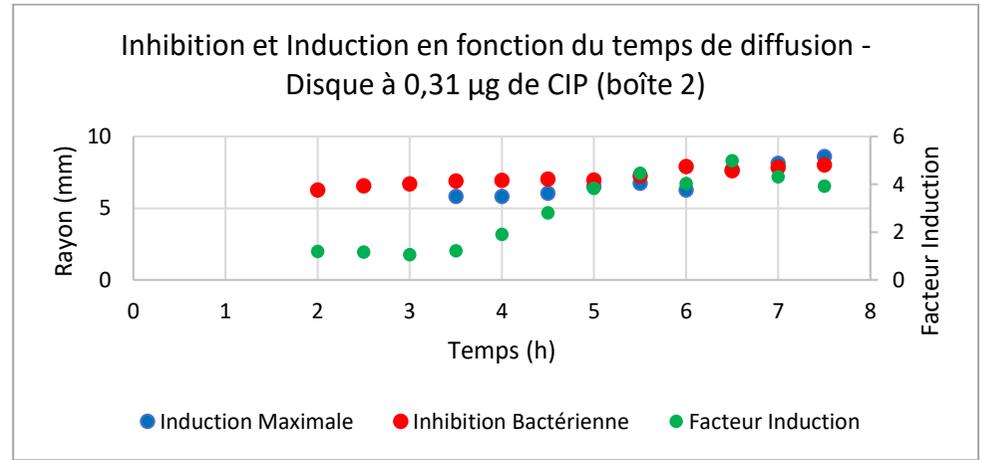
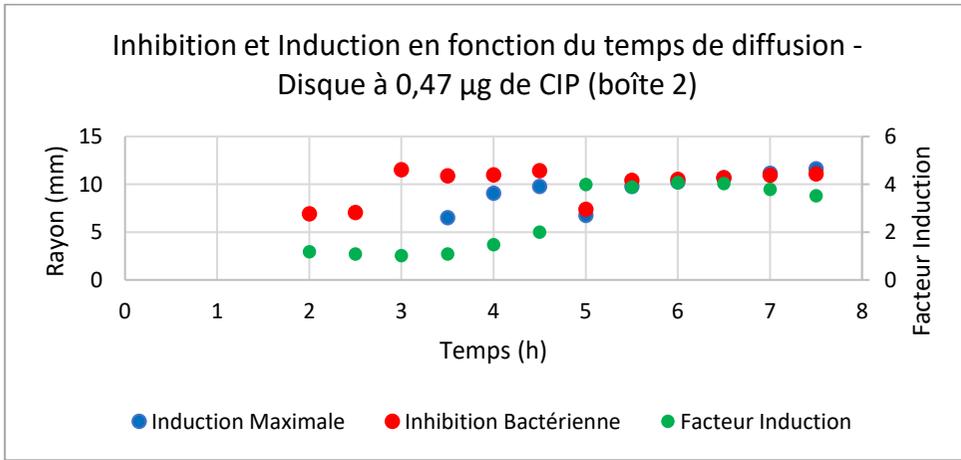
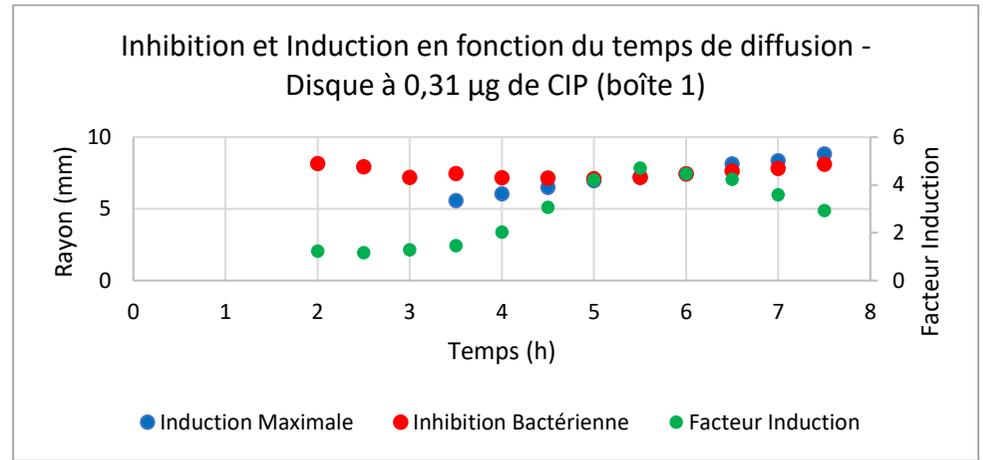
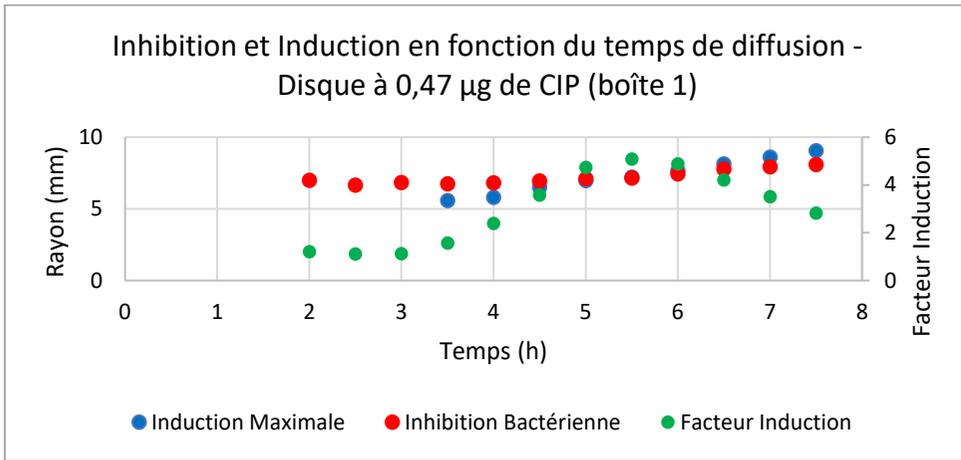
Annexe VI : Évolution de l'inhibition et de l'induction en fonction du temps de diffusion pour différentes quantités de ciprofloxacine (manipulation 2)

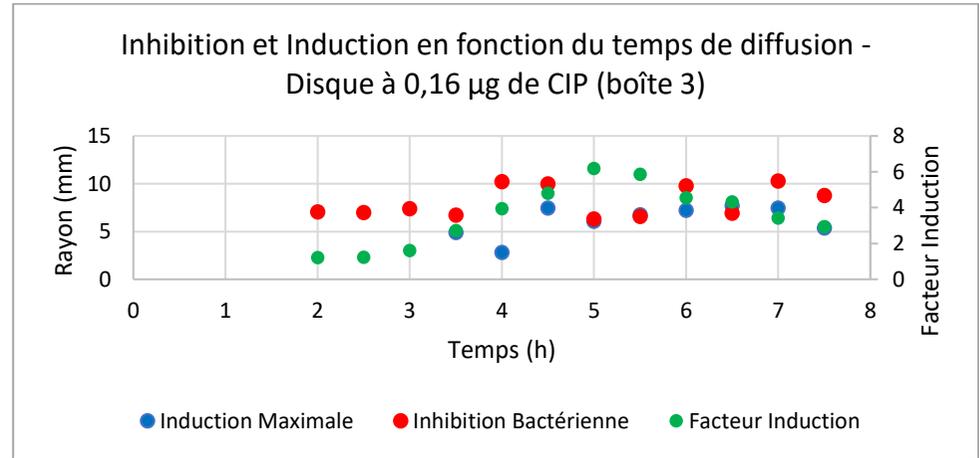
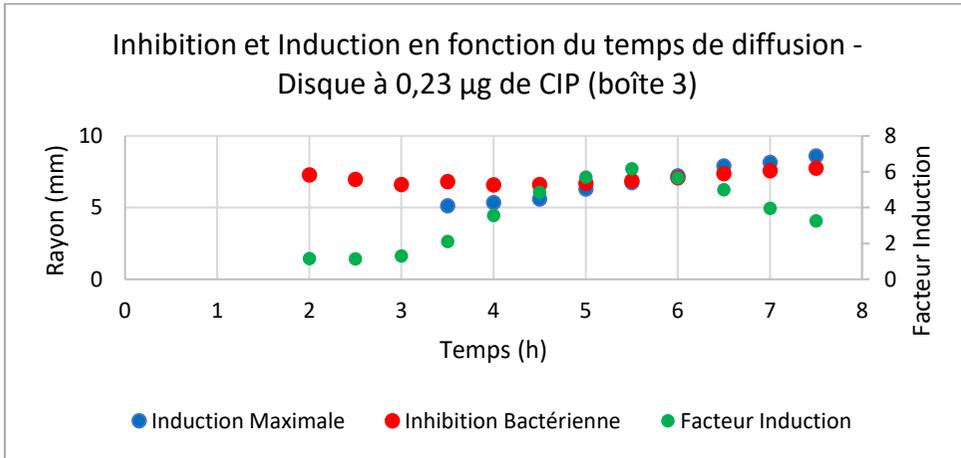
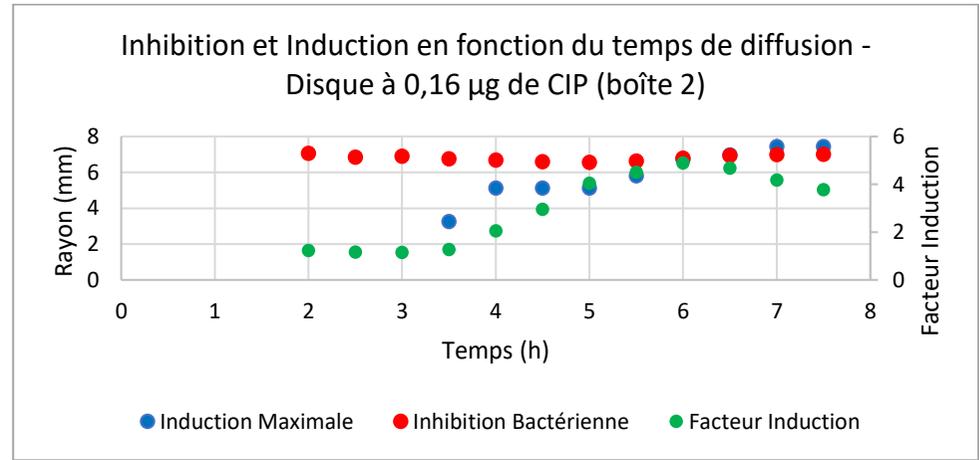
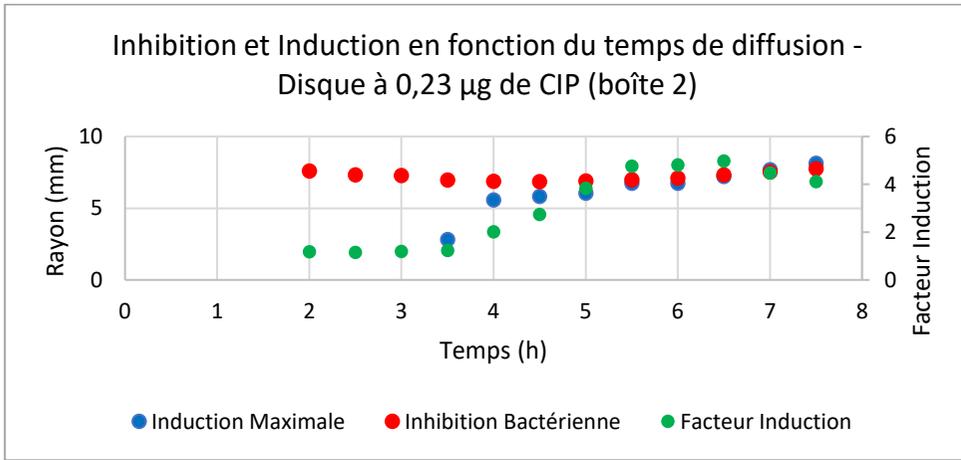
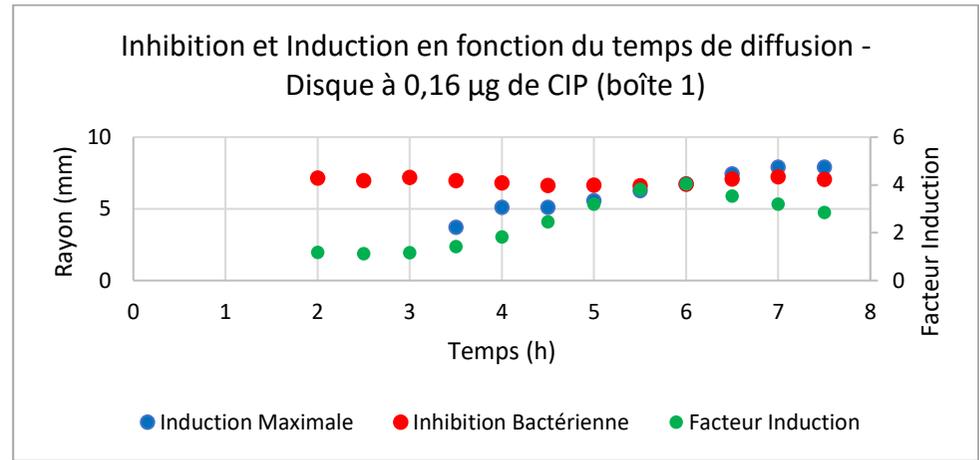
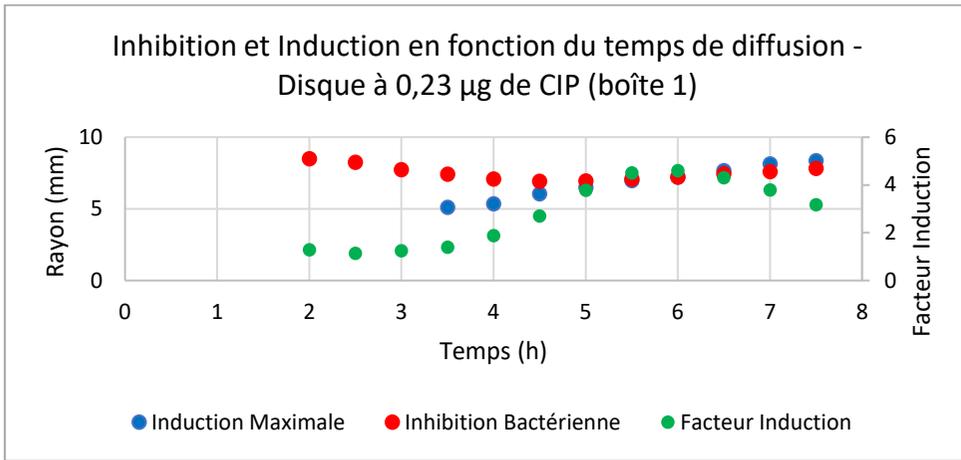


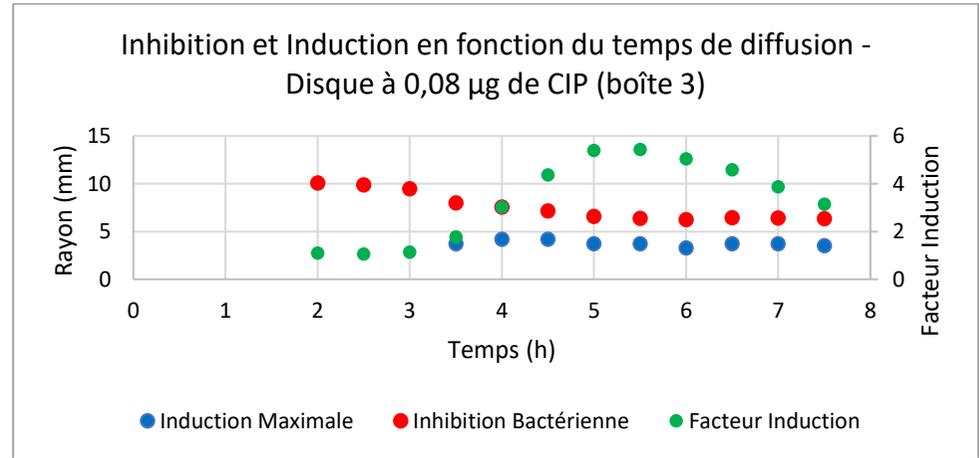
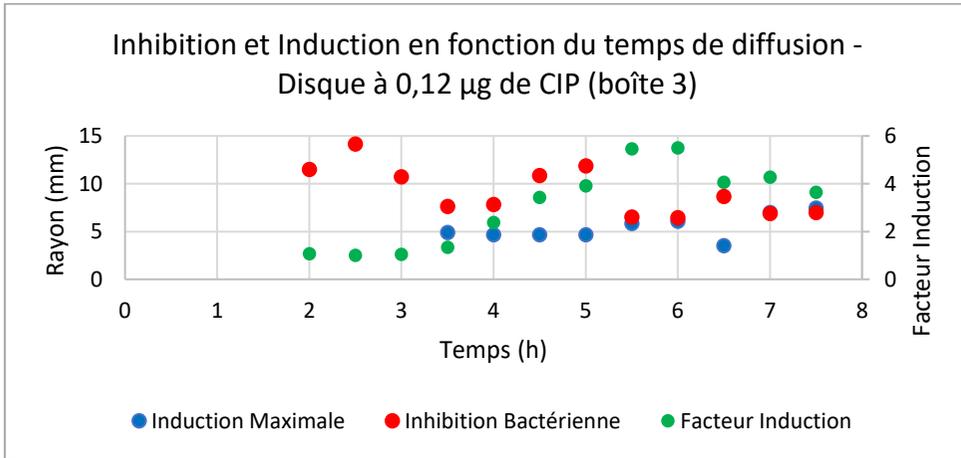
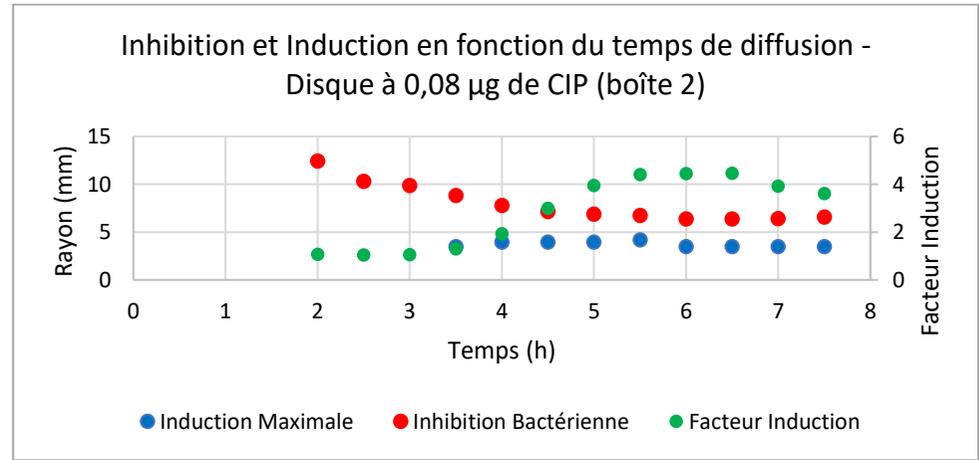
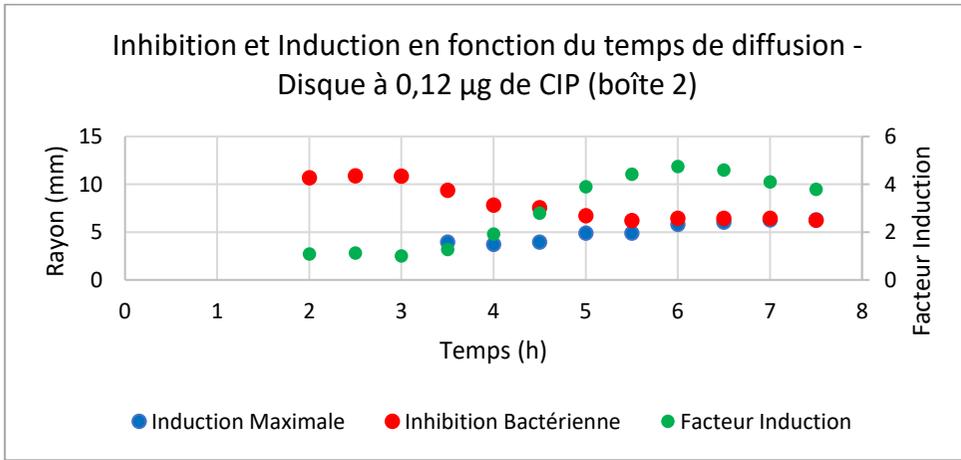
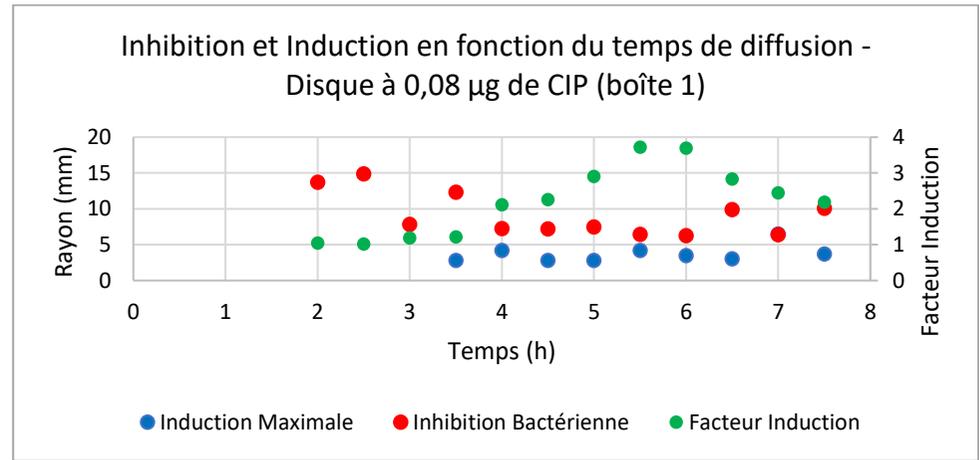
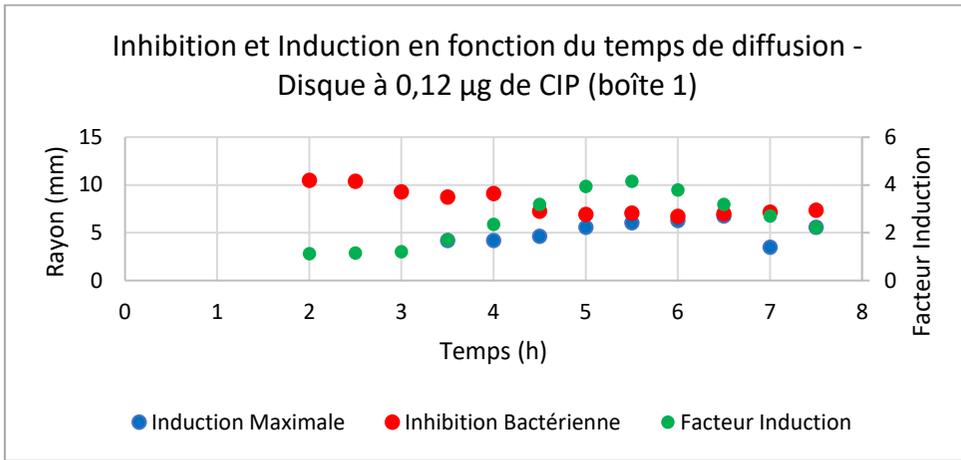


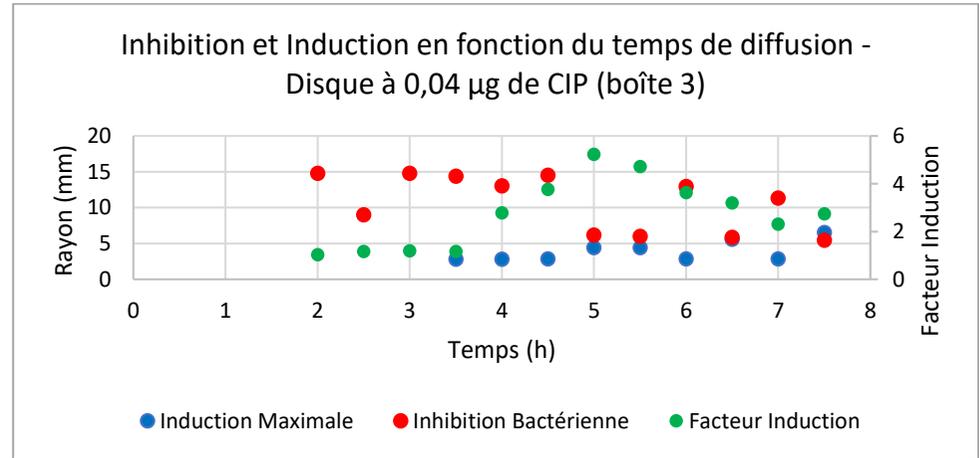
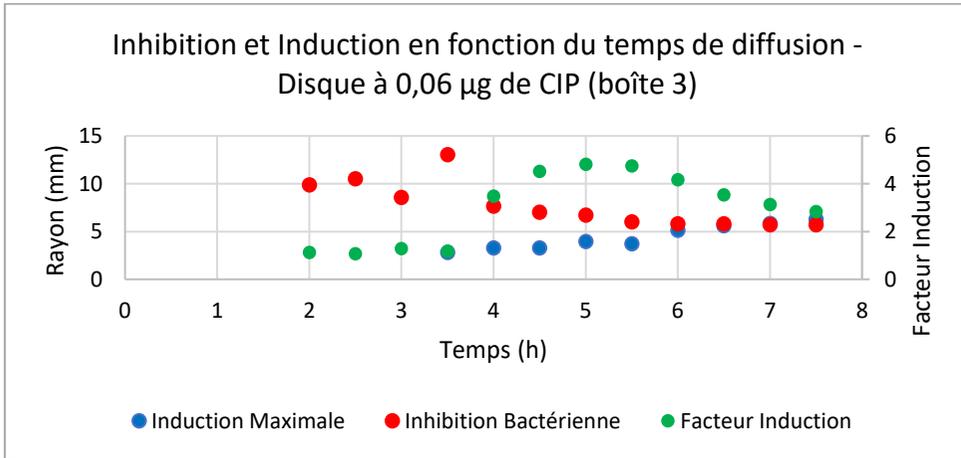
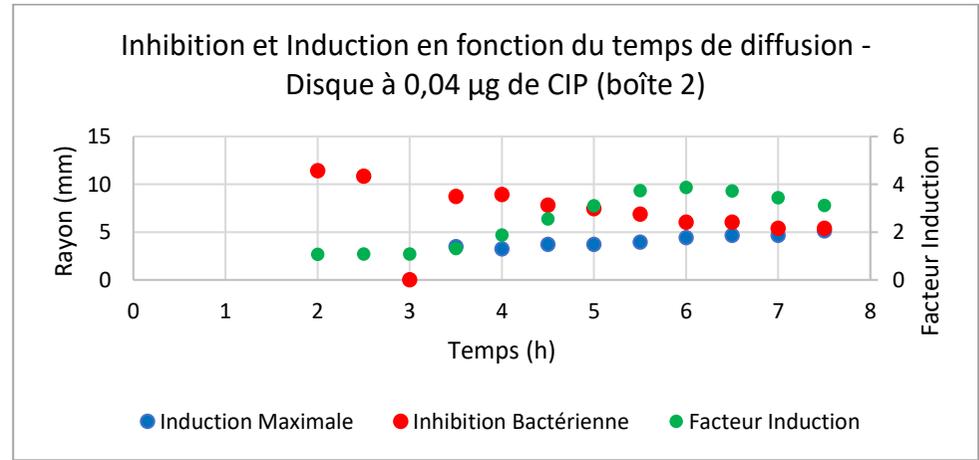
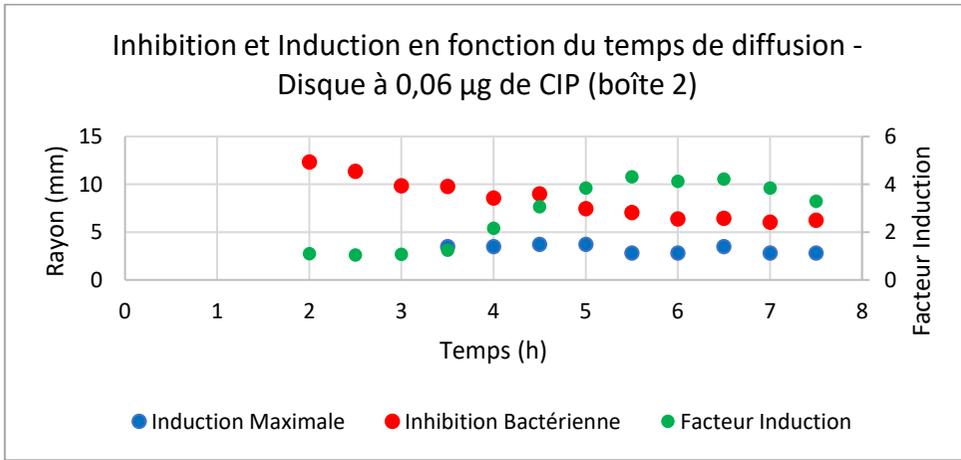
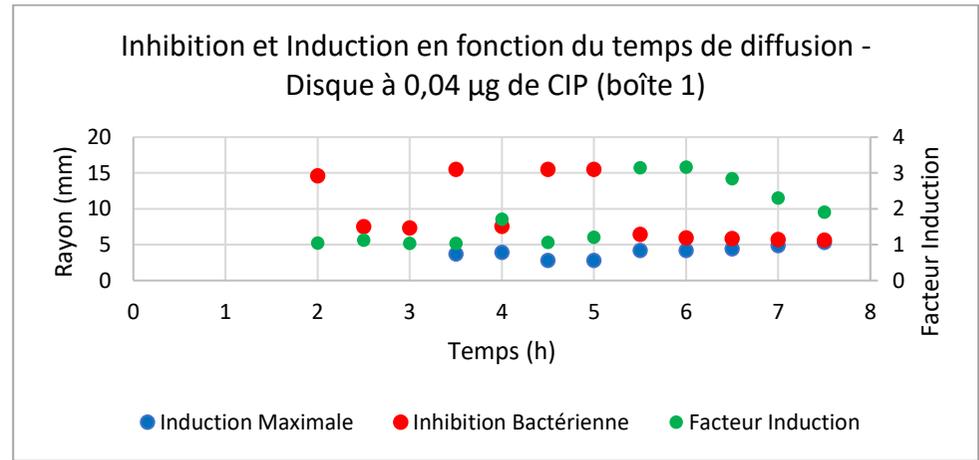
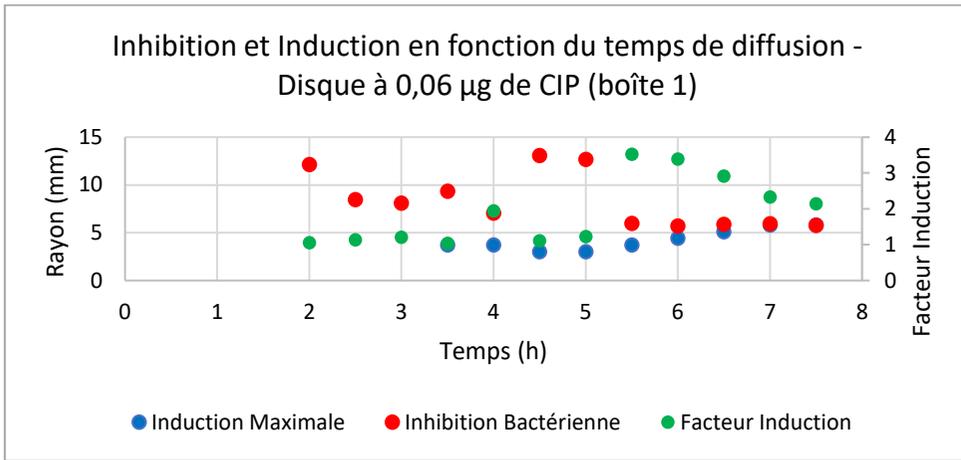






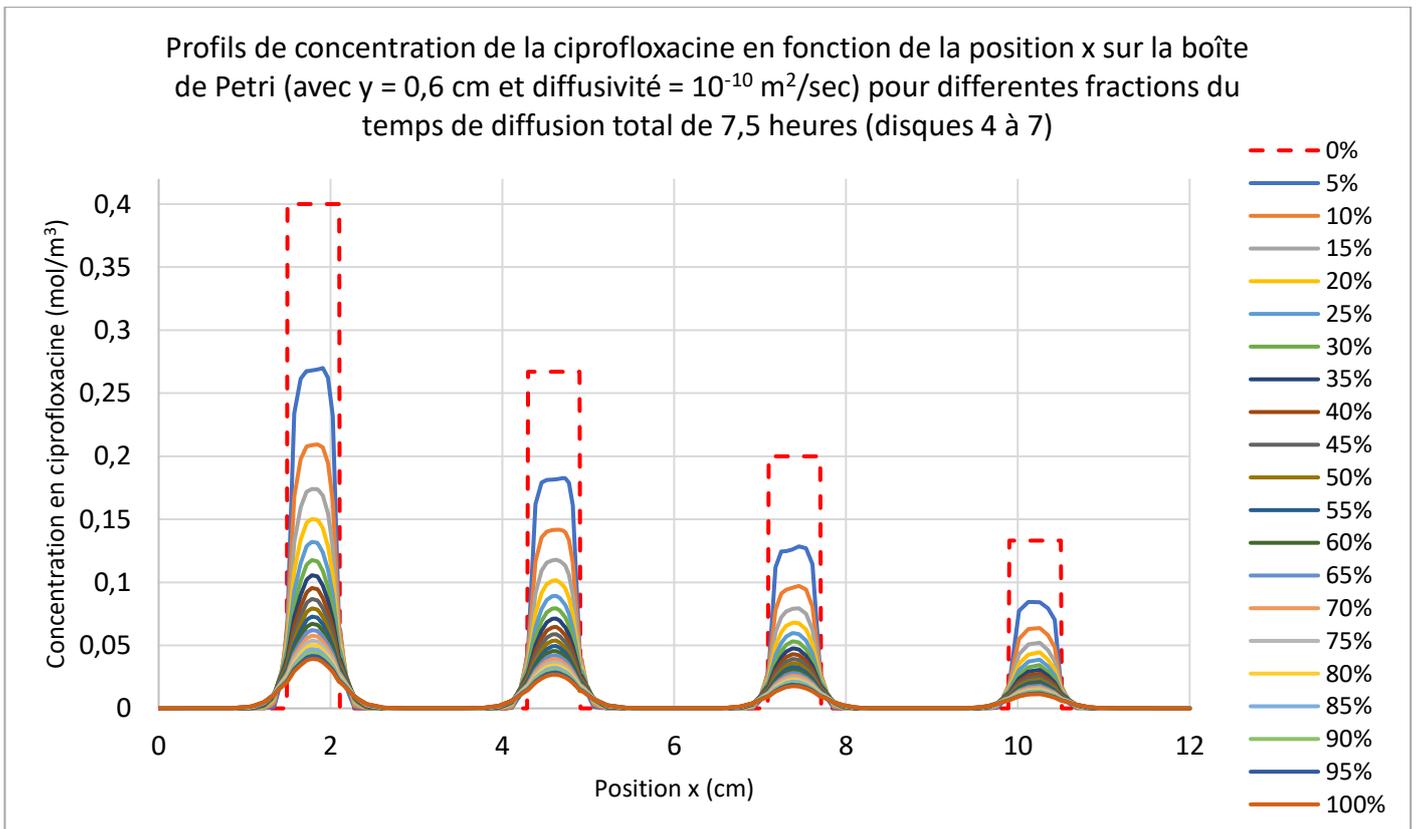
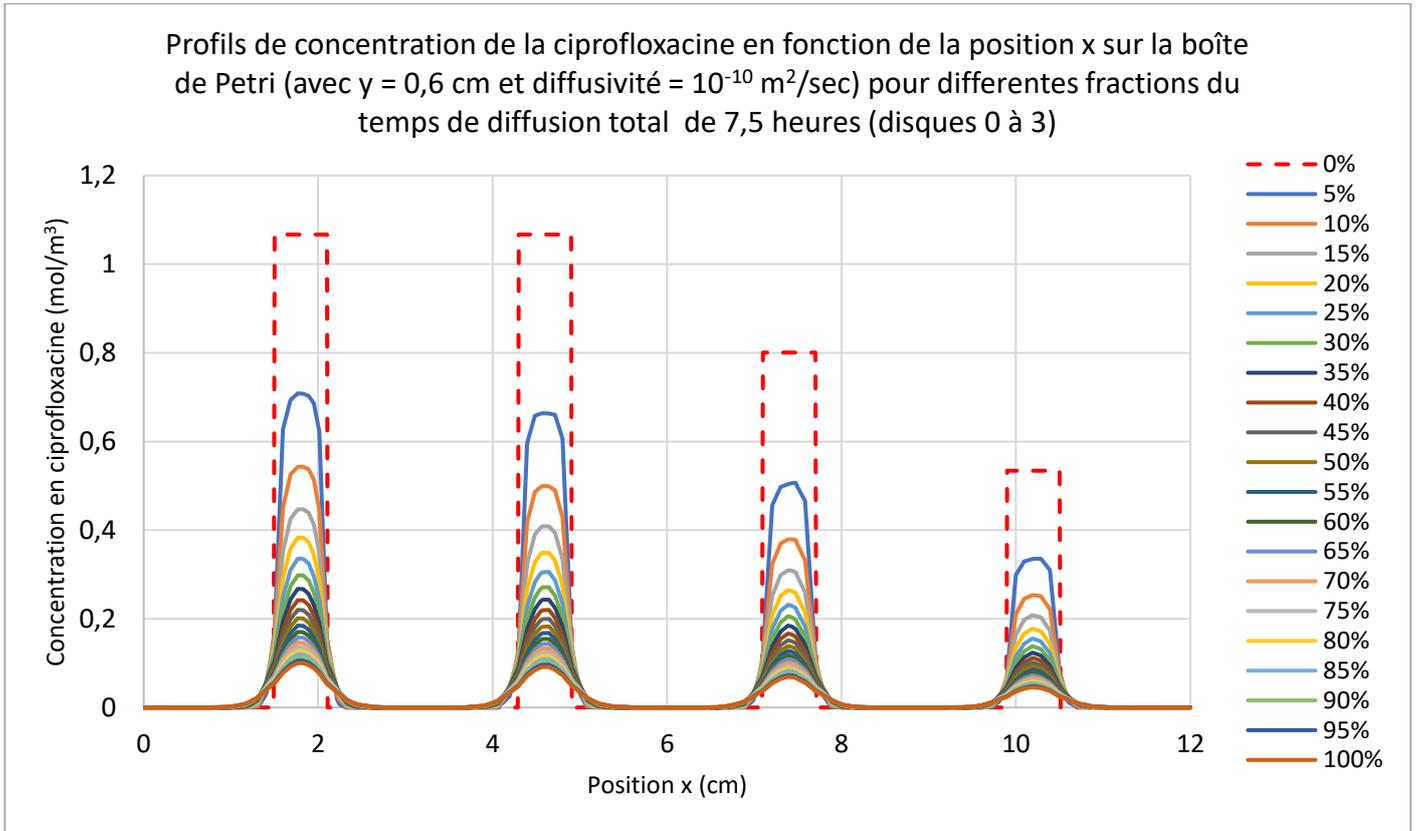




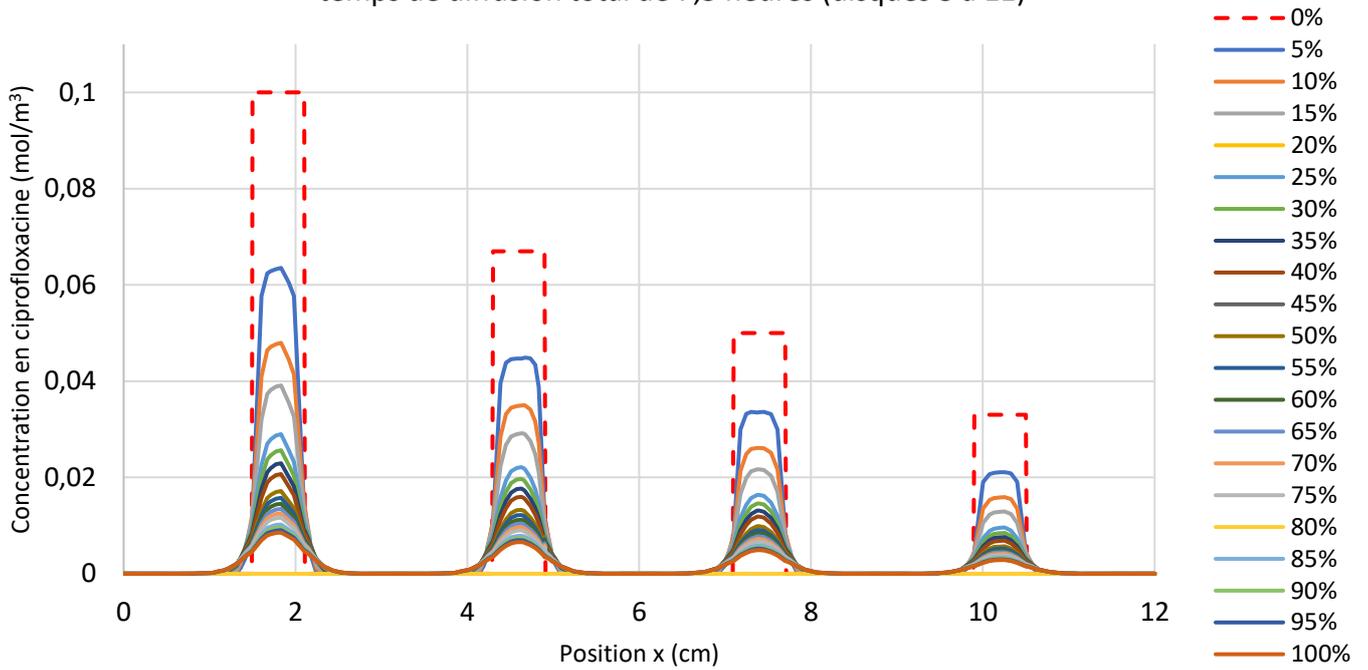


Annexe VII : Évolution de la concentration en ciprofloxacine en fonction de x (avec  $y = 0,6$  cm et

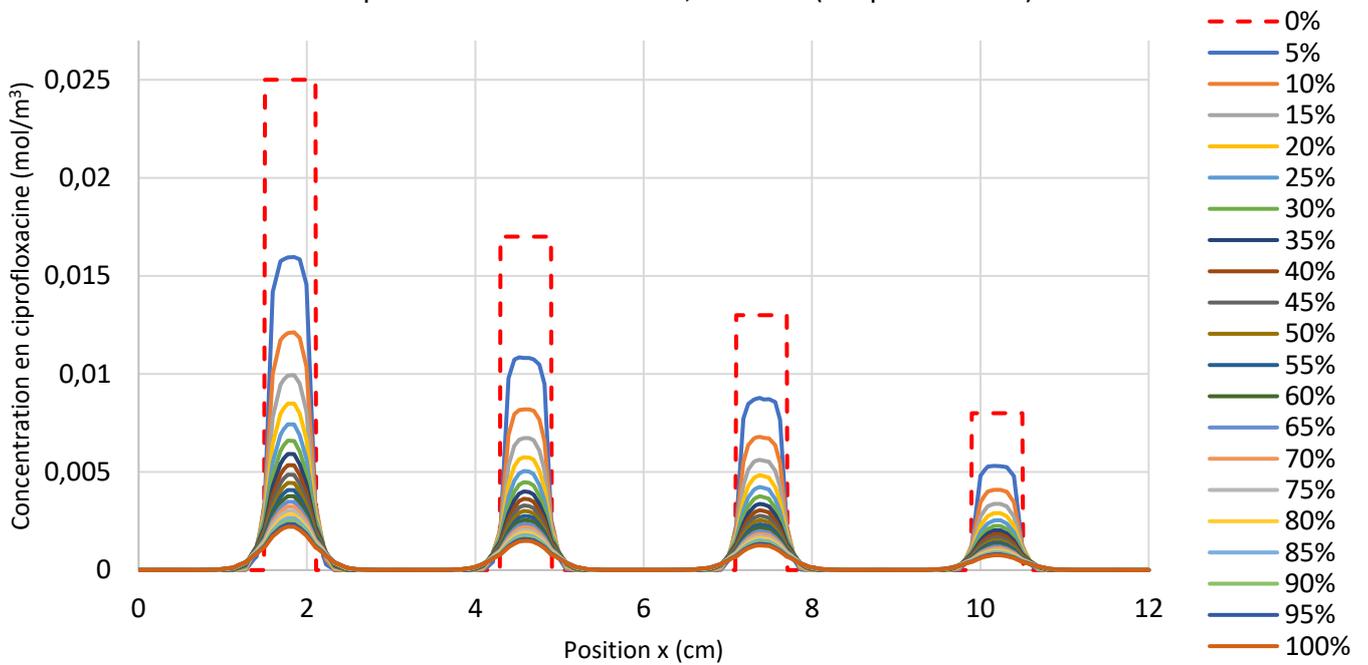
$D = 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures



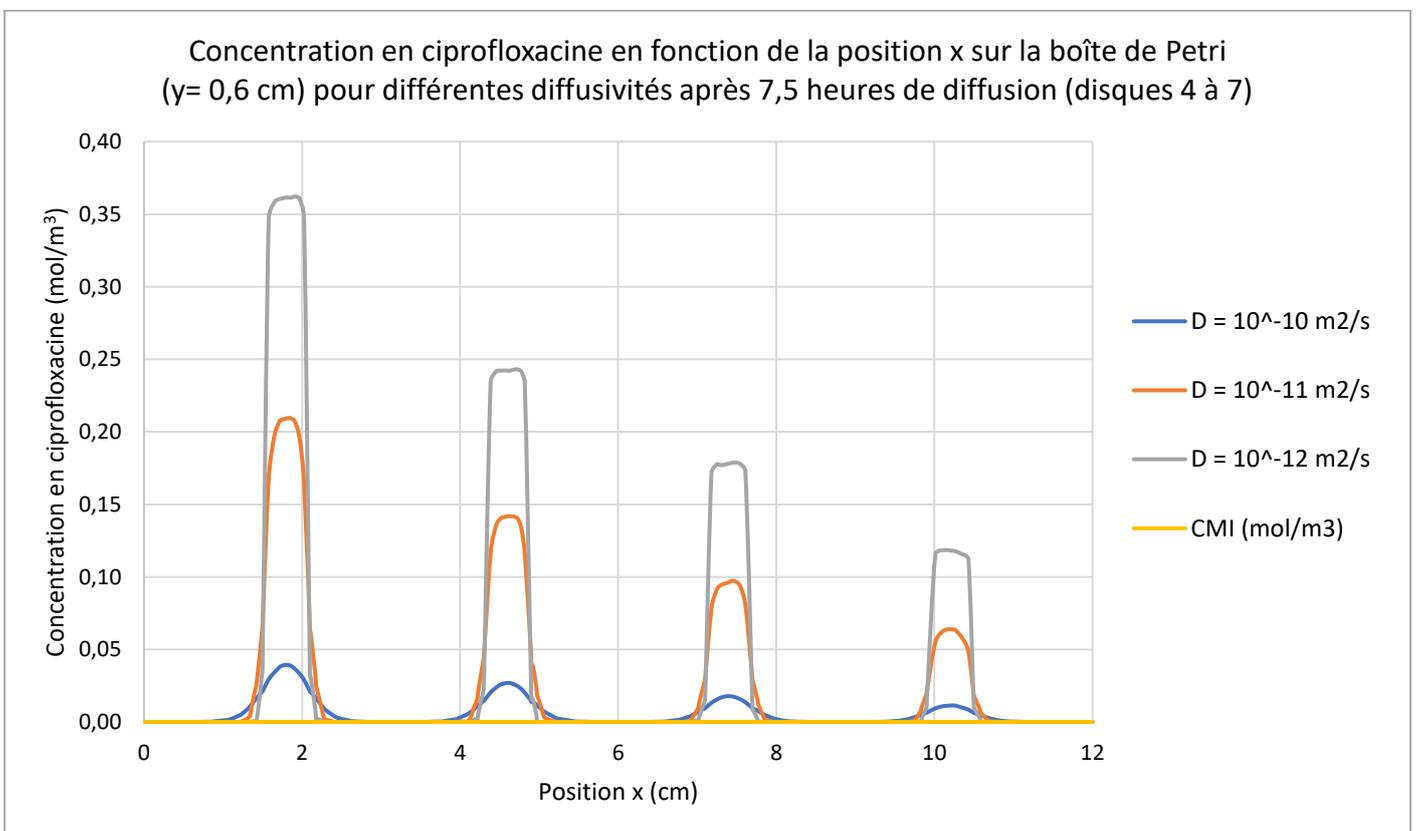
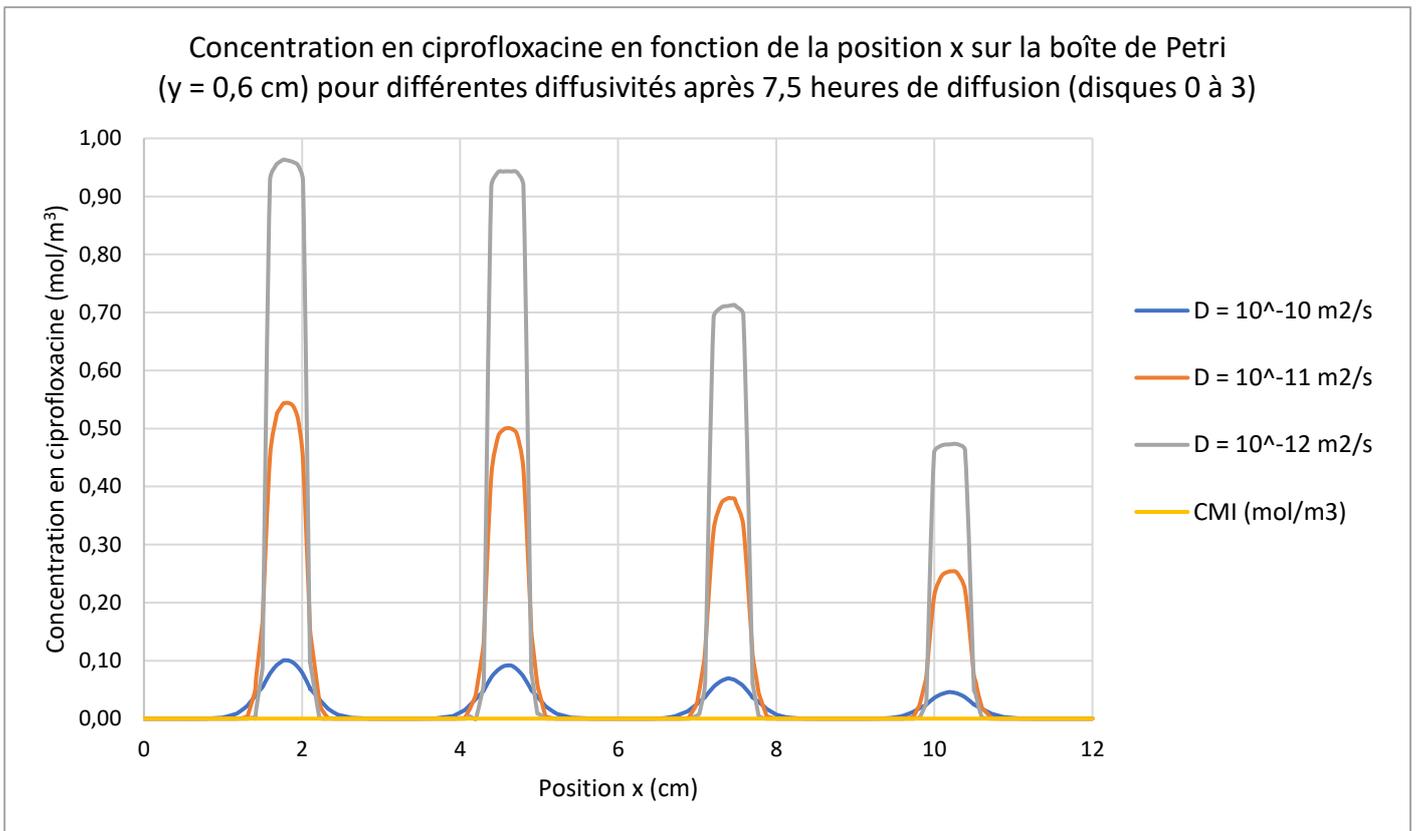
Profils de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (avec  $y = 0,6$  cm et diffusivité =  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/sec) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures (disques 8 à 11)



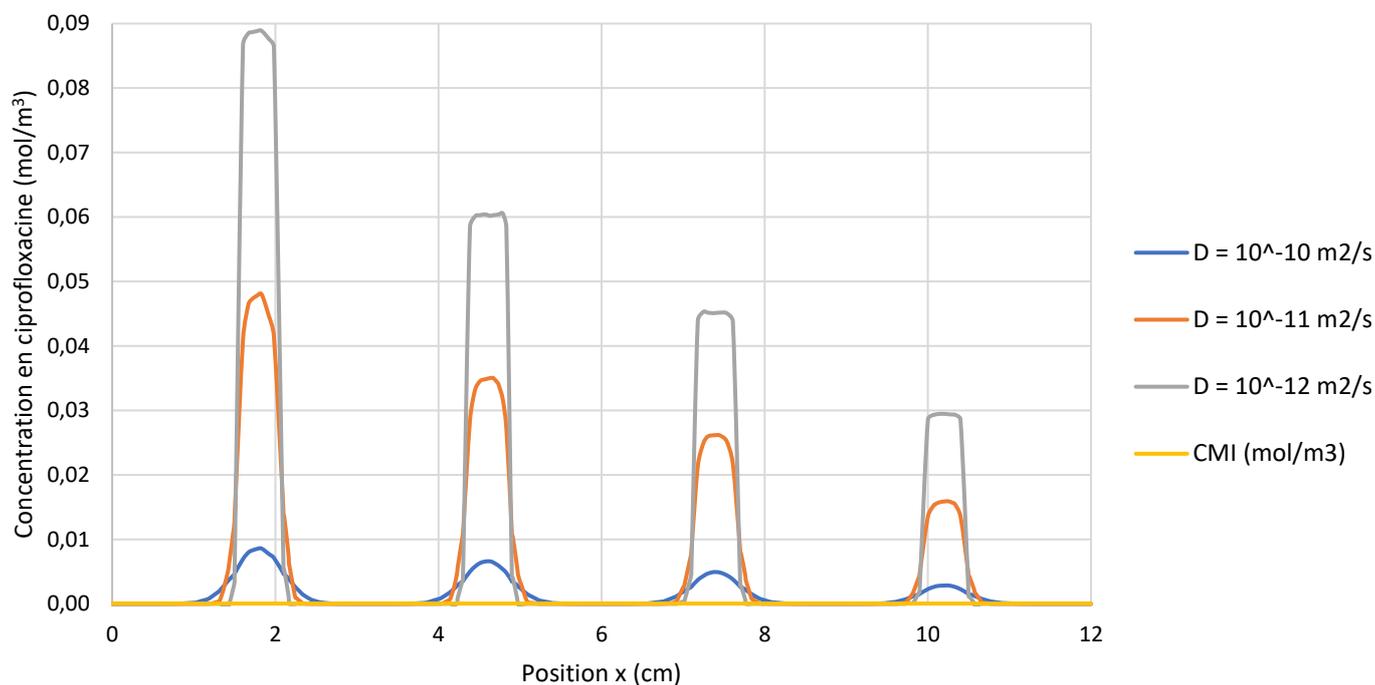
Profils de concentration de la ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (avec  $y = 0,6$  cm et diffusivité =  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/sec) pour différentes fractions du temps de diffusion total de 7,5 heures (disques 12 à 15)



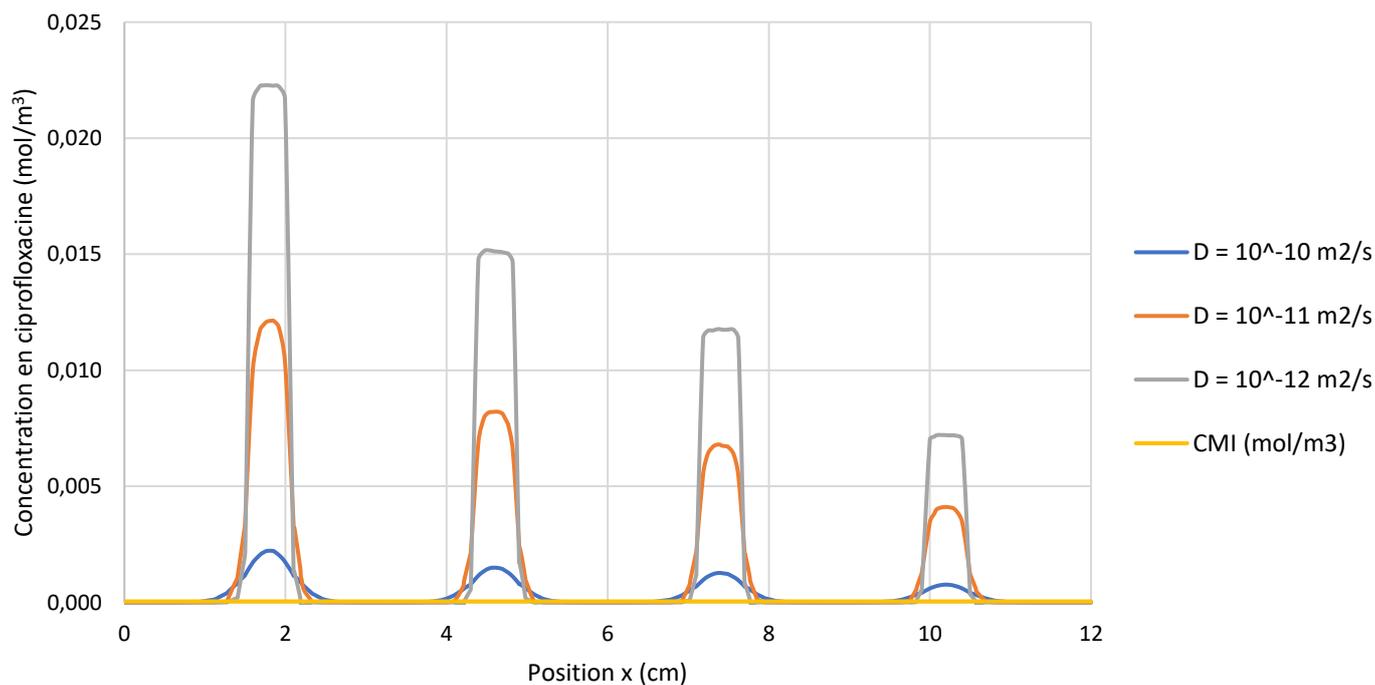
Annexe VIII : Évolution de la concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour différentes diffusivités et un temps de diffusion de 7,5 heures



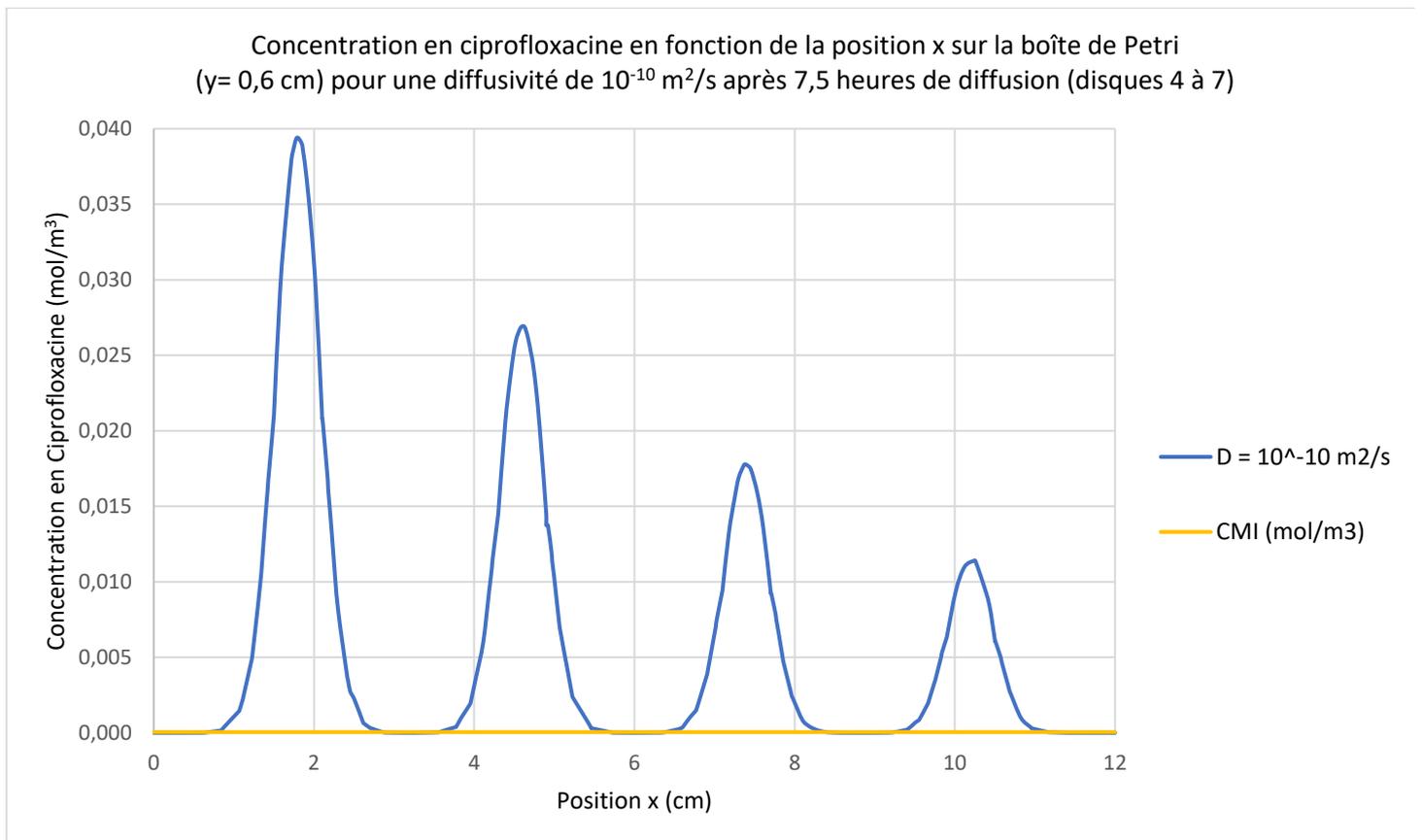
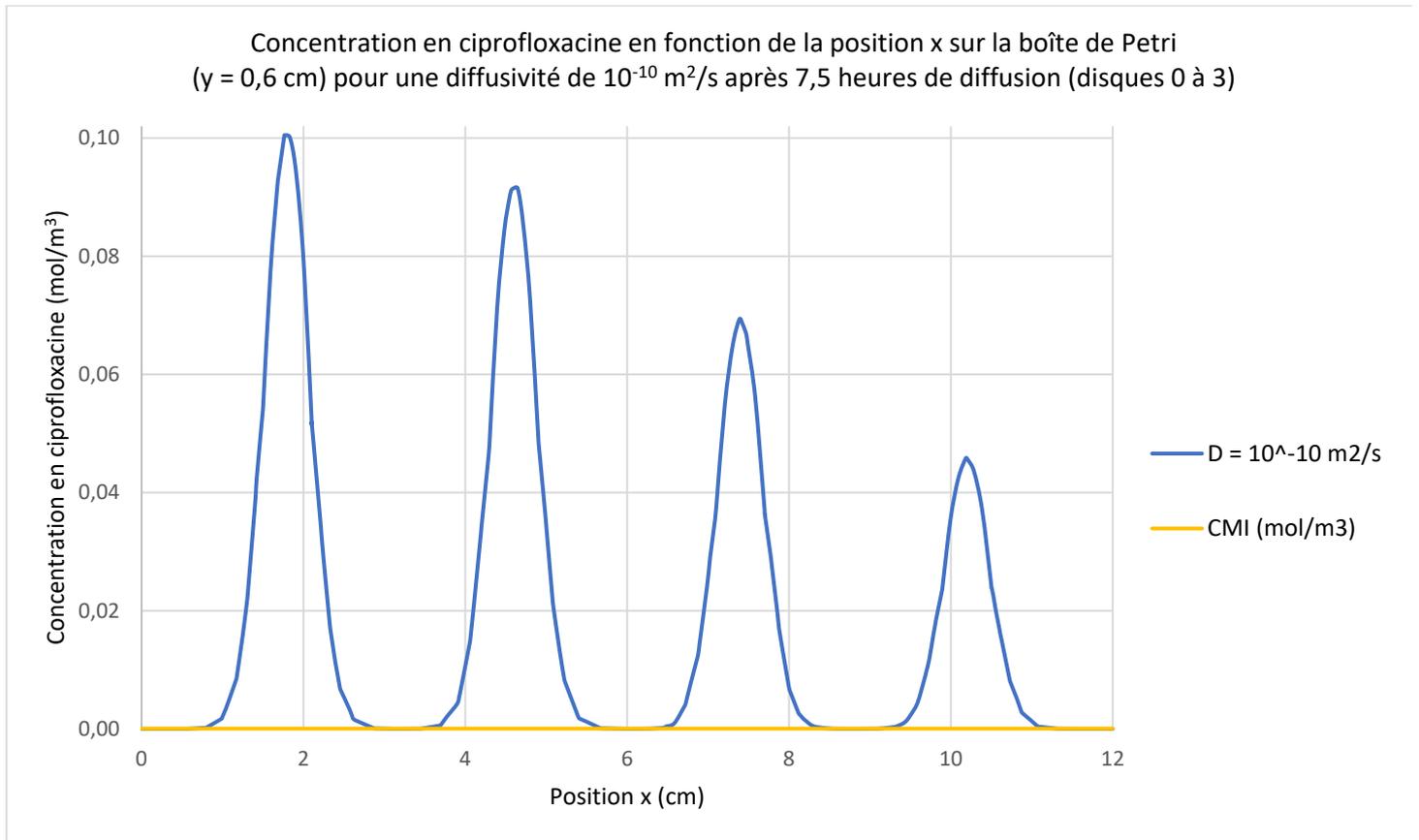
Concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y= 0,6 cm) pour différentes diffusivités après 7,5 heures de diffusion (disques 8 à 11)



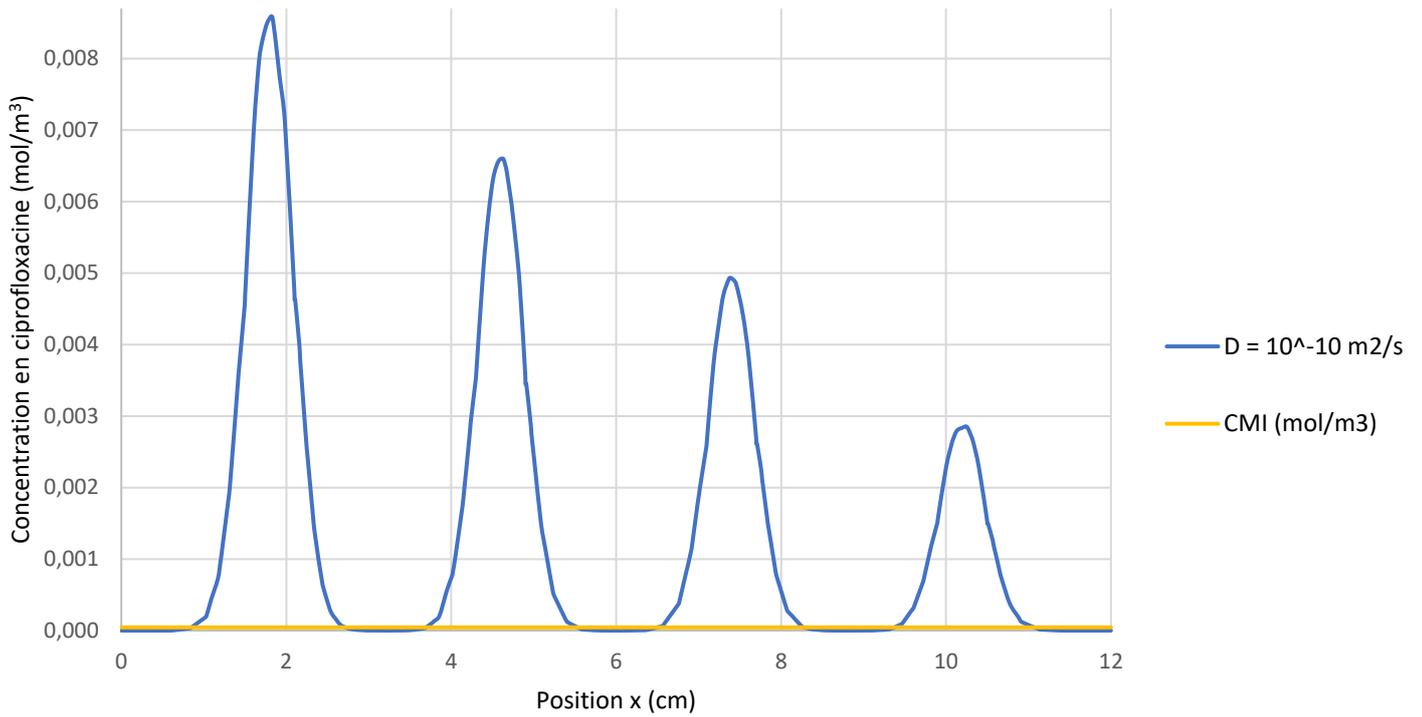
Concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour différentes diffusivités après 7,5 heures de diffusion (disques 12 à 15)



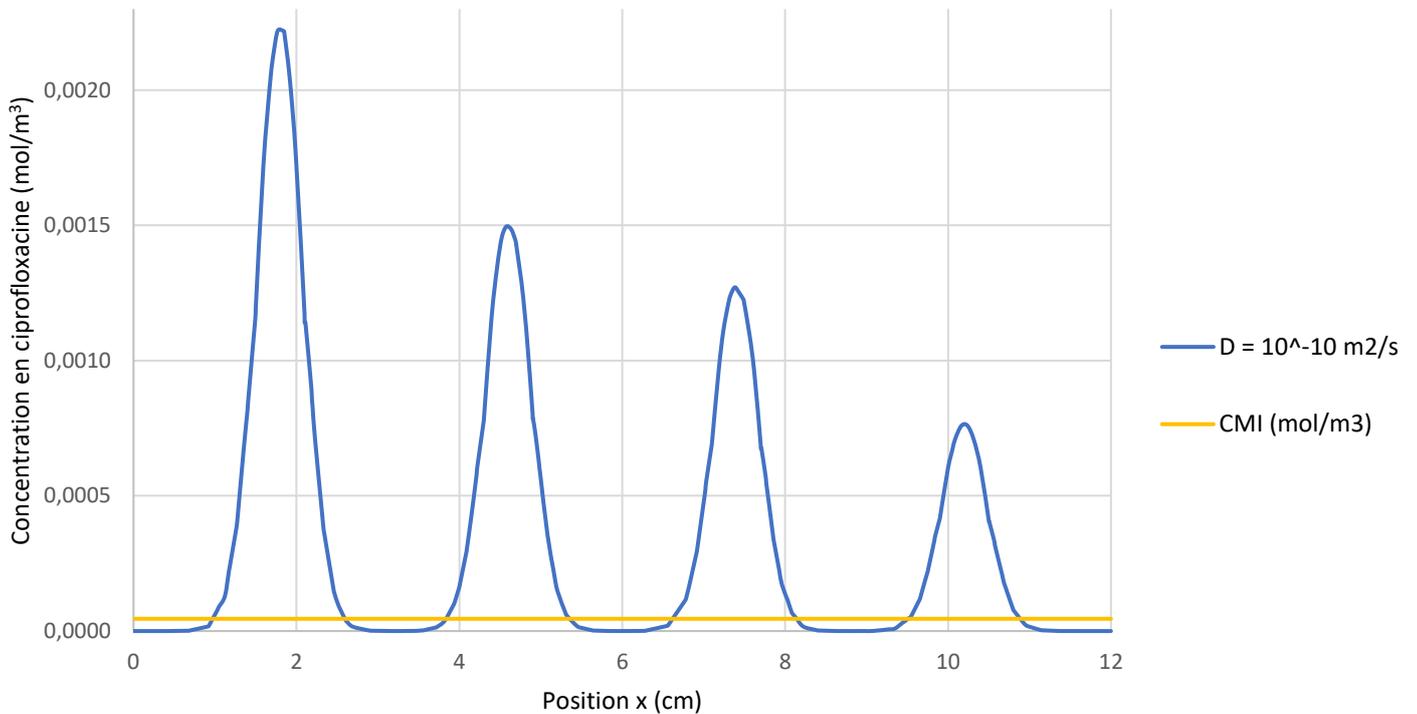
Annexe IX : Évolution de la concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour une diffusivité de  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s et un temps de diffusion de 7,5 heures



Concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y= 0,6 cm) pour une diffusivité de  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s après 7,5 heures de diffusion (disques 8 à 11)

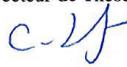
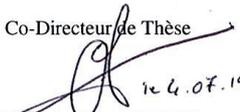


Concentration en ciprofloxacine en fonction de la position x sur la boîte de Petri (y = 0,6 cm) pour une diffusivité de  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s après 7,5 heures de diffusion (disques 12 à 15)



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 26/08/2019 à 14h00

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Kévin PETITCOLAS</p> <p><u>Sujet</u> : Modélisation de la diffusion des antibiotiques dans un milieu gélosé pour établir une cartographie des concentrations actives</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Dr. Raphaël DUVAL, Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine et Pharmacien      Directeur : Dr. Cécile LEMAITRE, Enseignant-Chercheur      Co-Directeur : M. Christophe MERLIN, Enseignant-Chercheur      Juges : Mme Marie-Noëlle PONS, Directeur de Recherches CNRS      M. Michel BOISBRUN, Enseignant-Chercheur et Pharmacien</p>	<p align="center">Vu,      Nancy, le 01/07/2019</p> <p>Le Président du Jury      Directeur de Thèse              Raphaël DUVAL      Mme Cécile LEMAITRE      Doyen,      M. Raphaël DUVAL</p> <p align="center">Co-Directeur de Thèse        M. Christophe MERLIN</p>
<p align="center">Vu et approuvé,      Nancy, le 5.07.2019</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie      de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">       Pr. Raphaël DUVAL     </p>	<p align="center">Vu,      Nancy, le 12 JUIL. 2019</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">       Pierre MUTZENHARDT     </p> <p align="center">N° d'enregistrement : 10783</p>

N° d'identification :

**TITRE :**

**Modélisation de la diffusion des antibiotiques dans un milieu gélosé pour établir une cartographie des concentrations actives**

**Thèse soutenue le 26/08/2019**

**Par Kévin PETITCOLAS**

**RESUME :**

En concentrations sub-inhibitrices, certains antibiotiques peuvent induire des promoteurs bactériens et favoriser le transfert de gènes d'antibiorésistance. A cet égard, il serait intéressant de pouvoir évaluer à quelles concentrations ces antibiotiques sont inducteurs pour déterminer leur capacité à transférer des gènes de résistance dans l'organisme à la suite d'une antibiothérapie et dans l'environnement. L'objectif de ces travaux de thèse est de contribuer à développer un outil de diagnostic permettant d'établir une cartographie des concentrations actives en antibiotique (CMI et concentration d'induction maximale).

Différentes quantités d'un antibiotique donné ont été imbibées dans des disques eux-mêmes déposés sur un milieu gélosé ensemencé par des biosenseurs bactériens (bactéries génétiquement modifiées pour émettre de la lumière en présence d'induction de promoteurs bactériens). Après un certain temps d'incubation, les rayons d'inhibition bactérienne obtenus pour ces différentes quantités d'antibiotique ont pu être mesurés sur des photographies obtenues à la lumière visible. La CMI de cet antibiotique a aussi pu être déterminée en milieu liquide. À la suite de ces expériences, des simulations numériques ont été effectuées pour retrouver ces rayons d'inhibition bactérienne, via la CMI trouvée expérimentalement, en faisant varier la diffusivité de l'antibiotique.

Une concordance entre les rayons d'inhibition bactérienne expérimental et numérique permettra de valider la méthode automatisée de détermination des concentrations actives en antibiotique (CMI et concentration d'induction maximale). La simple connaissance du rayon d'induction maximale du promoteur bactérien pourra ensuite permettre d'estimer, via le modèle de diffusion développé, la concentration correspondante et ainsi de prédire le potentiel de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'organisme à la suite d'une antibiothérapie ou dans l'environnement.

**MOTS CLES :** Antibiorésistance – Diffusion d'antibiotiques – Simulations numériques – Profils de concentration - Concentrations actives (CMI, Concentrations d'induction maximale de promoteurs bactériens)

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
		Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

**1 – Sciences fondamentales**

**3 – Médicament**

**5 – Biologie**

**2 – Hygiène/Environnement**

**4 – Alimentation – Nutrition**

**6 – Pratique professionnelle**