

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional
Le 6 mars 2017

par Mlle **TAKOUDJU Eve-Marie**

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février 2012

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Emergence de la résistance aux fluoroquinolones *in vitro*
chez *Cutibacterium acnes* et caractérisation moléculaire
des mutations retrouvées dans le gène *gyrA*

Président du jury : Madame le Pr Nathalie CAROFF, PU, Professeur de Bactériologie - UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques - Nantes

Membres du jury :

Monsieur le Pr Eric BATARD, PU-PH, Professeur de Thérapeutique - UFR de Médecine - Nantes

Monsieur le Pr David BOUTOILLE, PU-PH, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales - UFR de Médecine - Nantes

Madame le Dr Aurélie GUILLOUZOUIC, PH, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière - CHU de Nantes

Monsieur le Dr Stéphane CORVEC, Directeur de Thèse, MCU-PH, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière - UFR de Médecine - Nantes

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail :

Mon jury de thèse,

Madame le Professeur Nathalie Caroff, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Vos captivants cours de Bactériologie à la faculté de Pharmacie ont largement participé à mon choix d'orientation professionnelle. Je vous adresse l'expression de ma considération.

Monsieur le Docteur Stéphane Corvec, pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail. Ce fût un très grand plaisir de travailler avec vous, tant pour votre disponibilité, votre rigueur, votre gentillesse que votre soutien dans l'élaboration de ce travail. Par votre énergie et votre enthousiasme, vous avez réussi à me transmettre votre passion pour la recherche. Pour tout cela, sachez que je vous suis infiniment reconnaissante.

Monsieur le Professeur David Boutilie, pour m'avoir permis de passer un semestre agréable et enrichissant au sein de votre service. Sincères remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et juger ce travail.

Monsieur le Professeur Eric Batard, pour me faire l'honneur et la gentillesse de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse.

Madame le Docteur Aurélie Guillouzouic, pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour avoir accepté de juger ce travail. J'ai énormément appris à tes côtés. Je te témoigne ici ma très vive reconnaissance.

Les professionnels que j'ai rencontrés tout au long de mon internat en biologie médicale,

Je remercie toute l'équipe du Service de Bactériologie-Hygiène du CHU de Nantes, pour votre savoir-faire, votre gentillesse et votre bonne humeur. Je tiens à remercier tout particulièrement les techniciennes, Elodie Belliot, Nathalie Defossé, Ghislaine Le Gargasson et Julie Marraillac.

Je remercie le laboratoire du Centre Hospitalier de Saint-Nazaire, et tout particulièrement les Docteurs Sonia Sachot-Ollivier et Damien Ali, pour votre accueil et pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je pense également à l'équipe du laboratoire de Bactériologie hospitalière du CHU de Rennes, pour votre accueil et votre encadrement durant ma première approche de la Bactériologie en laboratoire hospitalier.

J'aimerais également remercier Frédéric Pécorari et Stanimir Kambareff pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans ce travail.

Merci également aux Docteurs Jocelyne Caillon, Lydia Khatchatourian, Pascale Bémer, Elise Thomas, Guillaume Aubin et Lise Crémet, pour vos qualités professionnelles et pour m'avoir fait partager vos connaissances à différents instants de ce travail.

Ma famille,

A mes parents, pour votre amour et votre patience tout au long de mes études. Nul mot ne saurait exprimer à sa juste valeur votre soutien indéfectible. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier.

A mon frère et ma sœur, je n'en serais pas là sans vous. Je suis fier de tout ce qui nous unit. Merci pour votre précieux soutien et vos conseils en toute circonstance.

A celui avec qui je partage désormais ma vie,

Fabien, je te remercie d'être là pour moi, de m'encourager, et de me soutenir à chaque instant. Tu auras su être patient, m'écouter, m'aider et me changer les idées aux bons moments. Merci pour tout ! Vivement notre grand voyage du mois de mai prochain...

Et enfin, mes amis,

Marie, pour ces belles années du CP à la 5^{ème} année de faculté ! Pour ton soutien constant et tes nombreux conseils tout au long de ces années.

Sally et Leslie, pour tous les moments de joie et de bonheur mais aussi pour les moments plus difficiles. Vous êtes les plus belles rencontres de mon internat. Je vous remercie de votre amitié sans faille.

Cécilia, Emilie, Margot et Lydia pour vos amitiés précieuses et tous les moments de bonheur passés en vos compagnies.

Marion, Yann, Marie-Sarah, et tous mes anciens co-internes brestois : mon internat n'aurait pas été le même sans vous, je vous remercie pour cela.

Merci également à Flora, Camille, et Céline pour ces années d'études à la faculté de Pharmacie et ces longs moments passés à la bibliothèque universitaire.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	5
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	14
1^{ERE} PARTIE :.....	17
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA BACTERIE <i>CUTIBACTERIUM ACNES</i>.....	17
I- GENERALITES	18
A) Historique et taxonomie	18
B) Habitat	20
C) Caractères bactériologiques.....	21
a. Caractères morphologiques	21
b. Caractères cultureux	21
c. Caractères biochimiques.....	23
d. Facteurs de virulence bactériens.....	24
II- POUVOIR PATHOGENE	25
A) Acné	25
B) Infections profondes.....	26
a. Infections ostéo-articulaires.....	26
b. Autres types d'infections	27
III- <i>CUTIBACTERIUM ACNES</i> ET ANTIBIOTIQUES	29

A) Options thérapeutiques des infections à <i>C. acnes</i>	29
B) Résistances aux antibiotiques.....	30
a. Résistances naturelles	30
b. Résistances acquises	31
i. Les macrolides	31
ii. Les cyclines.....	32
iii. La rifampicine	32
iv. Le cotrimoxazole	33
2^{EME} PARTIE :	35
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA RESISTANCE AUX FLUOROQUINOLONES CHEZ LES BACTERIES A GRAM POSITIF.....	35
I- GENERALITES SUR LES FLUOROQUINOLONES	36
II- MECANISME D’ACTION DES FLUOROQUINOLONES.....	38
III- SPECTRE ANTIMICROBIEN DES FLUOROQUINOLONES.....	40
IV- MECANISMES DES RESISTANCES ACQUISES.....	41
A) Mécanismes des résistances chromosomiques.....	41
a. Résistance par modification de cible	41
i. Résistance par modification de l’ADN Gyrase.....	42
ii. Résistance par modification de la Topoisomérase IV.....	44
b. Résistance par défaut d’accumulation	45
B) Mécanismes des résistances plasmidiques	47
V- <i>CUTIBACTERIUM ACNES</i> ET FLUOROQUINOLONES	48
3^{EME} PARTIE :	51

TRAVAIL PERSONNEL.....	51
I- OBJECTIFS DE L'ETUDE	52
II- MATERIELS ET METHODES	52
A) Caractérisation par séquençage des gènes cibles principaux <i>gyrA</i> et <i>parC</i>	52
a. Origine des bactéries utilisées	52
b. Obtention des mutants <i>in vitro</i>	53
c. Technique d'extraction de l'ADN génomique	55
d. Amplification partielle des gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i>	55
e. Purification des produits de PCR.....	57
f. Séquençage nucléotidique	58
g. Purification des produits de séquençage.....	58
h. Analyse des séquences.....	58
i. Modélisation de la protéine GyrA de <i>C. acnes</i> et évaluation de l'impact des mutations.....	59
B) Caractérisation de mécanismes de résistance secondaire avec la recherche de résistance par production de pompes d'efflux actif.....	59
III- RESULTATS	60
A) Fréquence de mutation	60
B) Détection des mutations dans les gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i>	61
C) Caractérisation moléculaire des mutants résistants.....	63
D) Sélection d'un haut niveau de résistance aux quinolones	68
E) Modélisation de la zone QRDR de la protéine GyrA.....	70
F) Détection d'un mécanisme d'efflux à l'aide d'inhibiteurs d'efflux	71

G) Caractérisation moléculaire des souches cliniques du CHU de Nantes	72
IV- DISCUSSION.....	75
V- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant la nouvelle nomenclature de l'ancien genre <i>Propionibacterium sp.</i> , adapté de Scholz <i>et al.</i> , International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016.....	19
Figure 2 : Abondance relative des espèces de l'ancien genre <i>Propionibacterium</i> dans les différentes aires de la peau, déterminée par séquençage de l'ARN 16S de 10 individus, d'après Achermann <i>et al.</i> , Clinical Microbiology Reviews, Juillet 2014.....	20
Figure 3 : Coloration de Gram de <i>Cutibacterium acnes</i>	21
Figure 4 : Culture de <i>C. acnes</i> sur gélose Schaedler.....	22
Figure 5 : Culture de <i>C. acnes</i> en bouillon Schaedler formant des « boulettes de mie de pain »	22
Figure 6 : Représentation schématique de l'implication de <i>C. acnes</i> dans le développement de l'acné, d'après Brüggemann <i>et al.</i> , 2005	24
Figure 7 : Microbiologie des différents types d'infections ostéo-articulaires, d'après Lew <i>et al.</i> , Lancet, 2004.....	26
Figure 8 : Synthèse chimique de l'acide nalidixique.....	36
Figure 9 : Structure chimique du pharmacophore des quinolones.....	37
Figure 10 : Relation structure-activité des fluoroquinolones, d'après Andriole <i>et al.</i> , 2002..	38
Figure 11 : Mécanismes d'action des topoisomérases II et IV	38
Figure 12 : Structure de l'ADN gyrase et mécanisme d'action des quinolones.....	39
Figure 13 : Structure de la Topoisomérase IV et mécanisme d'action des quinolones.....	40
Figure 14 : Comparaison de la séquence protéique de la région QRDR de GyrA de différentes espèces bactériennes d'intérêt médical	42
Figure 15 : Comparaison de la séquence protéique de la région QRDR de ParC de différentes espèces bactériennes d'intérêt médical.....	44

Figure 16 : Représentation schématique des structures de chaque famille de pompes d'efflux actifs : familles des pompes MFS, ABC et SMR, d'après Schindler <i>et al.</i> , Drug Resistance Update, 2016.....	45
Figure 17 : Séquences protéiques des deux zones QRDR des protéines GyrA et ParC de la souche de référence ATCC 11827	56
Figure 18 : Gel d'électrophorèse d'agarose à 1,5 % confirmant l'amplification du gène <i>gyrA</i> pour sept mutants	57
Figure 19 : Histogramme de la répartition des différents mutants dans le gène <i>gyrA</i> en fonction des CMI (en mg/L)	61
Figure 20 : Comparaison des séquences protéiques de la région QRDR de la protéine ParC de la souche de référence ATCC 11827 et de 6 mutants, d'après la numérotation de <i>C. acnes</i> ..	66
Figure 21 : Histogramme de la répartition des CMI à la lévofloxacine des mutants « mutés » dans le gène <i>gyrA</i>	67
Figure 22 : Histogramme de la répartition des CMI à la lévofloxacine des mutants « non mutés » dans les gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i>	67
Figure 23 : Modèle tridimensionnelle de la sous unité A de la gyrase chez <i>C. acnes</i>	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques biochimiques permettant de différencier les différentes espèces de l'ancien genre <i>Propionibacterium sp.</i> (tableau adapté de Aubin <i>et al.</i> 2016, Kusano <i>et al.</i> 1997 et du livre Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2)	23
Tableau 2 : Types d'infections causées par <i>C. acnes</i> (tableau adapté de Achermann <i>et al.</i> , Clinical Microbiology Reviews, 2014.	29
Tableau 3 : Principales mutations impliquées dans la résistance aux macrolides, chez <i>C. acnes</i> , d'après Aubin <i>et al.</i> , Médecine et maladies infectieuses, 2014	31
Tableau 4 : Mécanismes de résistances aux antibiotiques chez <i>C. acnes</i>	34
Tableau 5 : Mutations GyrA chez des bactéries à Gram positif	43
Tableau 6 : Mutations GyrB chez des bactéries à Gram positif	43
Tableau 7 : Pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez différentes bactéries à Gram positif, adapté de Cattoir <i>et al.</i> , Pathologie Biologie, 2004.....	46
Tableau 8 : Principales publications rapportant une résistance aux fluoroquinolones chez des souches cliniques de <i>C. acnes</i>	49
Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i>	56
Tableau 10 : Fréquences de mutations à la lévofloxacine seule ou en association avec de l'amoxicilline (0,064 mg/L) ou de la rifampicine (0,007 mg/L)	61
Tableau 11 : CMI à la lévofloxacine des mutants résistants obtenus	62
Tableau 12 : Comparaison de la séquence protéique de la région QRDR de la protéine GyrA des 40 mutants avec leur CMI à la lévofloxacine par rapport à celle de la souche de référence ATCC 11827.....	64
Tableau 13 : Niveau de résistance des différents mutants présentant une mutation dans le gène <i>gyrA</i> (position mutée de la protéine GyrA).....	65

Tableau 14 : CMI aux différentes fluoroquinolones en fonction du génotype observé.....	66
Tableau 15 : Passage d'un bas niveau de résistance à un haut niveau de résistance chez quatre mutants.....	69
Tableau 16 : Détermination de la CMI à la lévofloxacine avec et sans inhibiteurs d'efflux pour la souche ATCC 11827 et les 6 mutants résistants sans mutation dans les gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i>	71
Tableau 17 : Caractéristiques des six souches cliniques de <i>C. acnes</i> considérées comme de sensibilité diminuée à la lévofloxacine lors de l'antibiogramme (diffusion en milieu gélosé)	72

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP-Binding-Cassette	PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	PRP	Protéines à motifs Pentapeptidiques Répétés
ARN	Acide RiboNucléique	Qnr	Quinolone resistance
ARNr 16S	ARN ribosomique 16S	QRDR	Quinolone Region Determining Resistance
ATCC	American Type Culture Collection	RT-PCR	Real-Time PCR
ATP	Adénosine TriPhosphate	SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Méricilline
BNR	Bas Niveau de Résistance	SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
CCCP	Carbonyl Cyanide M-ChloroPhenyl hydrazone	SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
CHU	Centre Hospitalier Universitaire	SMR	Small Multidrug Resistance
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice		
HNR	Haut Niveau de Résistance		
Maldi-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight		
MDR	MultiDrug Resistance		
MFS	Major Facilitator Superfamily		
MS	Spectrométrie de Masse		
PAβN	Phenyl-Arginine β Naphthylamide		
Pb	Paires de bases		
PCR	Polymerase Chain Reaction		

Introduction

Les infections ostéo-articulaires constituent des pathologies graves pouvant entraîner des complications fréquentes et importantes, mettant parfois en jeu le pronostic vital des patients (1). D'un point de vue étiologique, ces infections sont le plus souvent dues à des bactéries aérobies pyogènes à croissance rapide, notamment des genres *Staphylococcus* ou *Streptococcus* (2). Les infections ostéo-articulaires à bactéries anaérobies restent plus rares (3,4). Néanmoins, depuis plusieurs années les infections ostéo-articulaires, notamment à *Cutibacterium acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes*), sont de plus en plus rapportées (5).

C. acnes est une bactérie à Gram positif anaérobie, commensale des flores cutanée et buccale ainsi que des tractus gastro-intestinal et uro-génital (6). Elle est impliquée dans une pathologie cutanée inflammatoire chronique, l'acné. Cette bactérie est également considérée comme pathogène émergent et opportuniste dans de nombreuses infections plus profondes. Elle est souvent retrouvée, notamment lors d'infections en présence d'un matériel étranger, incluant les infections ostéo-articulaires sur prothèses, le plus souvent sur prothèses d'épaules (5), ou encore lors d'endocardites sur valves prothétiques (7).

C. acnes demeure sensible à de nombreux antibiotiques, notamment à la clindamycine, ou encore aux β -lactamines. De nombreuses souches cliniques de *C. acnes* issues d'acné plus sévère présentent néanmoins, des résistances acquises telles que des résistances aux macrolides ou aux cyclines (8, 9). Devant une infection ostéo-articulaire à *C. acnes*, un traitement est instauré par clindamycine, amoxicilline ou le plus souvent par fluoroquinolones en association avec la rifampicine. Récemment, une étude a mis en évidence la sélection possible de résistance à la rifampicine *in vitro* chez la souche de référence ATCC 11827 de *C. acnes* (10). Les mutants résistants présentaient des mutations dans le gène *rpoB*, codant pour la sous-unité β de l'ARN-polymérase, altérant ainsi la reconnaissance de la cible par l'antibiotique (10). Son efficacité sur le biofilm formé par *C. acnes* a été démontrée *in vivo*, sur modèle animal (11). L'émergence de la résistance à la rifampicine, antibiotique pivot du traitement des infections profondes, notamment en présence de matériel ou de biofilm (souvent difficile à éradiquer), pourrait voir menacer l'efficacité des fluoroquinolones et conduire à la sélection de mutants résistants.

Depuis quelques années, des isolats cliniques résistants aux fluoroquinolones ont été isolés dans plusieurs pays du monde (8, 12–15), soulignant le potentiel risque d'échec thérapeutique. Au CHU de Nantes, depuis quelques années, des souches cliniques de *C. acnes*

isolées de prélèvements osseux, présentent des CMI de lévofloxacine augmentées, sans description précise du mécanisme moléculaire mis en jeu.

La résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries est majoritairement due à des substitutions nucléotidiques dans les gènes *gyrA* et *parC* codant respectivement pour les topoisomérases II et IV au niveau de zones spécifiques dites QRDR (Quinolone-Resistance-Determining Region). Chez *C. acnes*, les mécanismes de résistance moléculaire aux fluoroquinolones n'ont été étudiés que très récemment sur cinq isolats cliniques provenant de lésions acnéiques (12).

L'objectif de ce travail de thèse était d'une part, de sélectionner des mutants résistants à la lévofloxacine à partir de la souche de référence de *C. acnes* ATCC 11827 et, d'autre part, de caractériser les mécanismes de résistance de ces mutants, en définissant les mutations responsables de la résistance, au niveau des gènes cibles principaux *gyrA* et *parC*.

Ce travail a permis également de cartographier les mutations impliquées (dans la résistance de bas ou de haut niveau aux fluoroquinolones) et de vérifier si ces mutations étaient identiques à celles rapportées chez d'autres espèces. Ce travail a contribué à évaluer la fréquence de mutation à l'égard des fluoroquinolones, ainsi que la protection potentielle d'association d'antibiotiques dans l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones. Ainsi, nous devrions mieux comprendre l'émergence de cette résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes*, notamment en raison des concentrations minimales inhibitrices déjà élevées chez les isolats sensibles mais également en raison des forts inocula chez certains patients.

1^{ère} Partie :
Revue bibliographique sur la bactérie
Cutibacterium acnes

I- Généralités

C. acnes est une bactérie appartenant à la flore commensale de l'Homme, notamment des flores cutané et buccale ou encore du tractus digestif (6). Son pouvoir pathogène chez l'Homme a longtemps été discuté, et il est souvent considéré comme un contaminant des cultures. Aujourd'hui, c'est une bactérie reconnue comme responsable de nombreuses entités cliniques (5). Après description des caractères bactériologiques de *C. acnes*, nous décrirons son rôle pathogène chez l'Homme et sa sensibilité vis-à-vis des antibiotiques.

A) Historique et taxonomie

C. acnes appartient à la classe des Actinobacteria, ordre des Actinomycétales, famille des *Propionibacteriaceae* (16). Il a été isolé pour la première fois par Sabouraud en 1897, à partir de lésions d'acné. Il a ensuite été classé au sein du genre *Bacillus* puis des Corynebactéries en 1923 (5). Il a été découvert que les souches de *Corynebacterium acnes* 11827, 6921 et 6922 fermentaient le lactate avec production d'acide succinique, d'acide acétique mais surtout d'acide propionique (17). C'est pourquoi, en 1946, Douglas et Gunter suggèrent de classer cette espèce au sein du genre *Propionibacterium* (17, 18).

Plus récemment, le genre *Propionibacterium* a été réévalué par comparaison de séquences génomiques de 162 souches. Par la présence de grandes disparités au sein du genre *Propionibacterium*, il a été proposé de le séparer en quatre genres différents : *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov., *Propionibacterium* gen. nov. et *Pseudopropionibacterium* gen. nov. (19). L'espèce *acnes* étant donc intégrée aujourd'hui au genre *Cutibacterium*.

La figure 1, page 19, représente l'arbre phylogénique de la nouvelle nomenclature de l'ancien genre *Propionibacterium* sp., proposé en 2016, par Scholz *et al.*, dans International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (19).

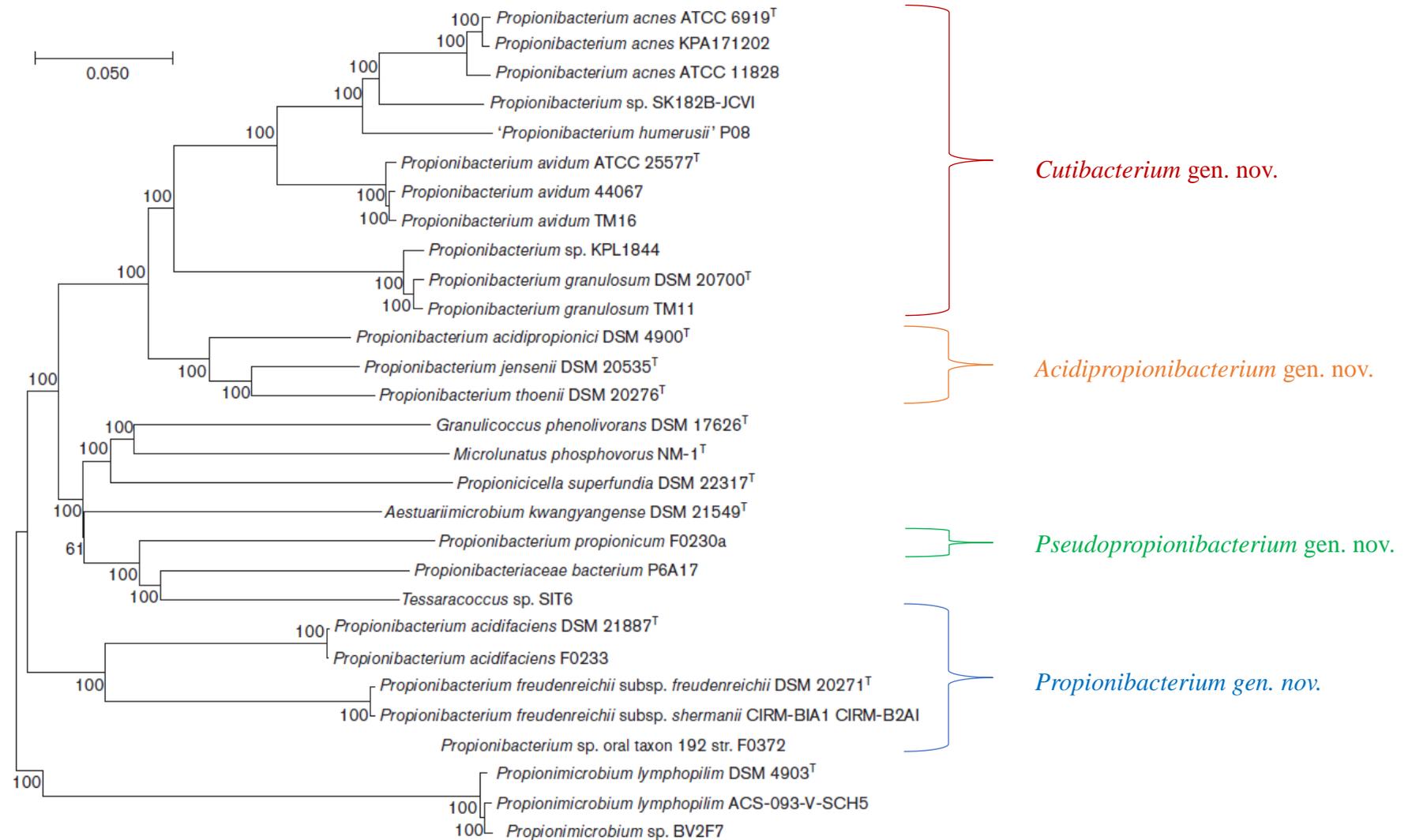


Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant la nouvelle nomenclature de l'ancien genre *Propionibacterium* sp., adapté de Scholz *et al.*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016.

C) Caractères bactériologiques

a. Caractères morphologiques

C. acnes se présente sous la forme d'un bacille à Gram positif diphtérimorphe, ou en forme de massue corynéforme, de longueur comprise entre 0,8 et 1,5 μm et de largeur comprise entre 0,3 et 0,5 μm . (23). Les bacilles peuvent également se disposer de façon branchée, tels des « caractères chinois » (figure 3). C'est une bactérie immobile, non sporulée, non capsulée.

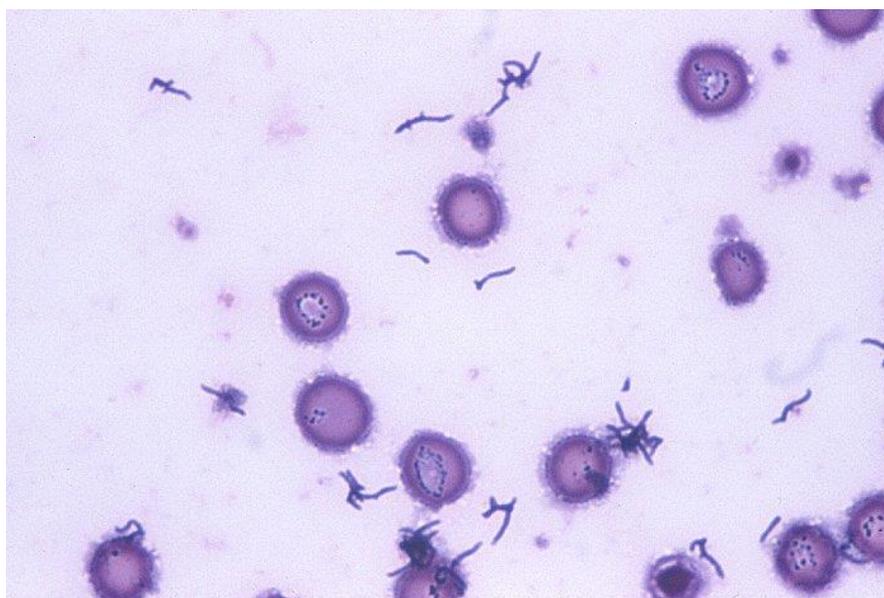


Figure 3 : Coloration de Gram de *Cutibacterium acnes* (24)

b. Caractères cultureux

Sa croissance est meilleure en atmosphère anaérobie mais elle peut également tolérer de l'oxygène pendant plusieurs heures (25). C'est donc une bactérie anaérobie préférentielle, aérotoleante. La température optimale de croissance de *C. acnes* est comprise entre 30 et 37°C. Son délai de croissance est variable allant de 1 à 5 jours en moyenne (26). Les géloses enrichies sont les plus adaptées pour isoler ces bactéries. Ainsi, la gélose Schaedler est un milieu enrichi en facteurs de croissance tels que l'hémine, l'extrait de levure et la vitamine K1, parfaitement adapté à la croissance de ce type de bactéries anaérobies. A partir de prélèvements cliniques osseux, il est possible d'observer une croissance sur gélose enrichie au sang cuit et non sur gélose au sang en atmosphère aérobie. De même, il est recommandé de toujours associer un bouillon anaérobie au milieu gélosé pour permettre la croissance de ce

type de bactérie pouvant présenter, soit des difficultés à se développer sur gélose, soit un faible inoculum. Les colonies peuvent se présenter sous différents aspects : elles peuvent être blanches, grises, ou encore orangées. Elles sont opaques ou translucides, plates ou légèrement bombées, et productrices ou non d'une β -hémolyse (figures 4 et 5) (27).

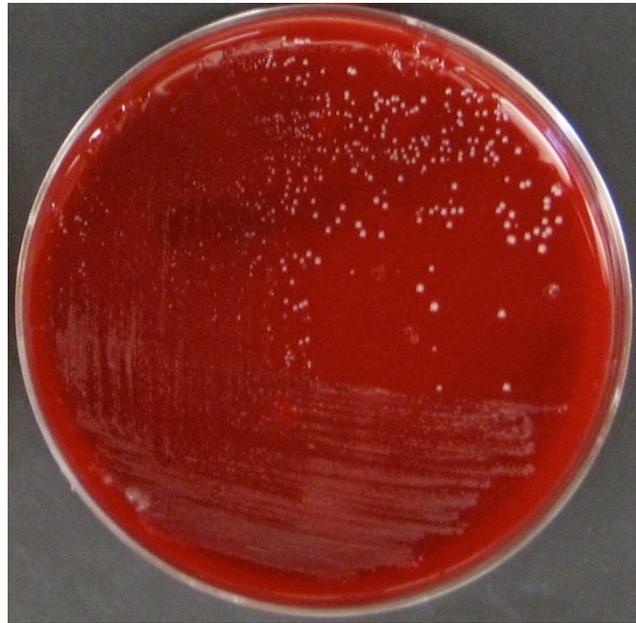


Figure 4 : Culture de *C. acnes* sur gélose Schaedler

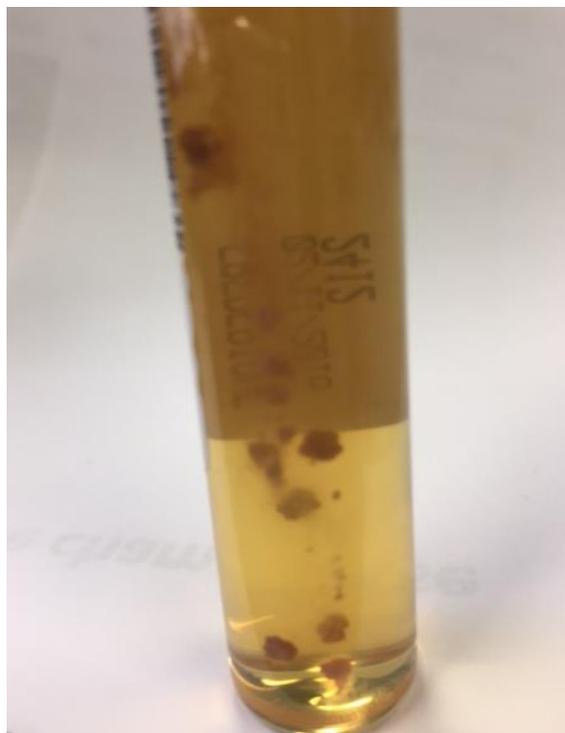


Figure 5 : Culture de *C. acnes* en bouillon Schaedler formant des « boulettes de mie de pain »

c. Caractères biochimiques

C. acnes possède une catalase, ce qui peut permettre de le différencier de certaines bactéries à Gram positif. En se basant sur la composition de la paroi bactérienne et des antigènes polysaccharidiques pariétaux, cette espèce a été divisée en trois biovars : *C. acnes* biovar I, II et II. Ces biovars se différencient par la séquence des gènes *recA* et *tly*, gènes qui codent respectivement pour une protéine essentielle à la réparation de l'ADN et une cytotoxine, constituant les prémices des méthodes de typage pour cette espèce (28). Ces biovars ont en commun la fermentation de l'acide lactique en acide propionique d'où leur appartenance à ce genre. Ils sont également capables de transformer le tryptophane en indole, ce qui les différencie des autres espèces de l'ancien genre *Propionibacterium* ; ils fermentent le glucose et n'hydrolysent pas l'esculine.

Les différents caractères biochimiques permettant de différencier *C. acnes* des différentes espèces de l'ancien genre *Propionibacterium* sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques biochimiques permettant de différencier les différentes espèces de l'ancien genre *Propionibacterium* sp. (tableau adapté de Aubin *et al.* 2016, Kusano *et al.* 1997 et du livre Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2)

	<i>C. acnes</i>	<i>C. avidum</i>	<i>C. granulosum</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>A. jensenii</i>	<i>A. thoenii</i>	<i>A. acidipropionici</i>
β Hémolyse	v	+	-	-	-	+	-
Hydrolyse de l'esculine	-	+	-	+	+	+	+
Production d'indole	+	-	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	+	-	-	v	-	-	+
Hydrolyse de la gélatine	+	+	-	-	-	-	-
Acidification du sucrose et du maltose	-	+	+	-	+	+	+
Catalase	v	+	+	+	v	+	v

Légende : v = variable, + = positif et - = négatif

d. Facteurs de virulence bactériens

Bien que longtemps considéré comme peu virulent et contaminant des cultures, ces dernières années, différents types de facteurs de virulence contribuant à son pouvoir pathogène, ont pu être mis en évidence, notamment grâce aux études génomiques, classant *C. acnes* parmi les pathogènes opportunistes.

Tout d'abord, *C. acnes* est capable de synthétiser de nombreuses enzymes visant à dégrader les tissus de l'hôte : ribonucléases, neuraminidases, phosphatases alcalines, lecithinases, hyaluronidases, et des GehA lipases (figure 6) (29). La synthèse d'hémolysines ou de cytotoxines telles que les CAMP factor ou hémolysines III, lui permet également de dégrader les tissus et elles sont impliquées dans son pouvoir pathogène (5). *C. acnes* peut également modifier son métabolisme et s'adapter à l'environnement, notamment en présence ou en absence d'oxygène, au cours d'une inflammation ou suite à une réponse immunitaire (5). Il possède aussi des protéines impliquées dans le métabolisme du fer, par exemple la protéine HtaA (29).

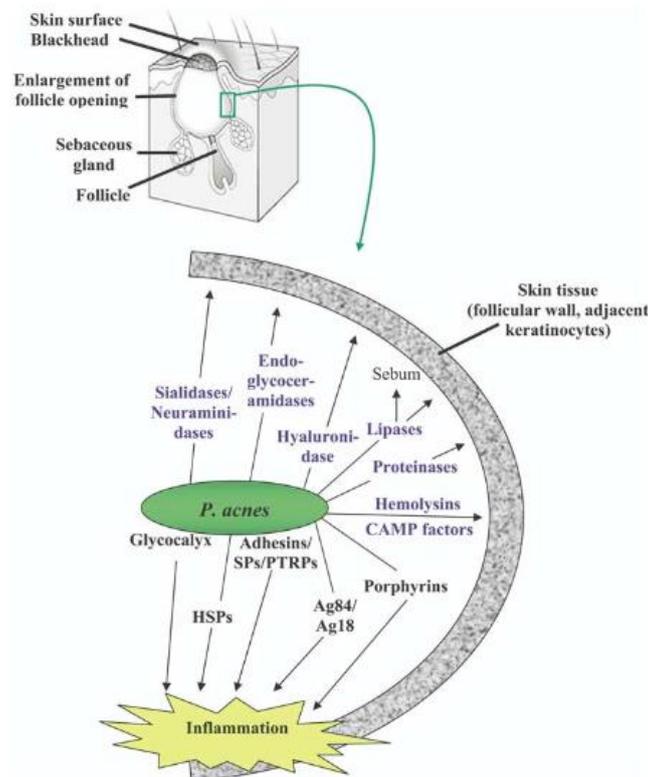


Figure 6 : Représentation schématique de l'implication de *C. acnes* dans le développement de l'acné, d'après Brüggemann *et al.*, 2005 (29)

C. acnes possède également des antigènes de surface capable de conduire à un processus inflammatoire, interagissant donc avec l'hôte. C'est une bactérie capable de sécréter des substances pro-inflammatoires, ayant un pouvoir de chimiotactisme pour les cellules immunitaires, pouvant ainsi permettre l'activation des cellules mononucléées et la division cellulaire des lymphocytes T. *C. acnes* joue également un rôle dans l'immunité acquise par l'activation des Toll-like récepteurs entraînant la sécrétion de protéines pro-inflammatoires (30).

Enfin, *C. acnes* est connu pour être capable de former un biofilm, contribuant à sa persistance et à sa virulence dans les infections sur matériel. En effet, les bactéries poussant en biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques, C'est pourquoi, lors d'une infection profonde à *C. acnes*, il est préconisé de recourir à une antibiothérapie adaptée au biofilm et, notamment, à la rifampicine (5, 22, 29, 31–34).

II- Pouvoir pathogène

A) Acné

L'acné est une pathologie inflammatoire chronique cutanée touchant le follicule pilo-sébacé. Elle touche le plus souvent des adolescents et des jeunes adultes. C'est une pathologie due à différents facteurs notamment, hormonaux, physiologiques, ou encore génétiques (5, 18, 22).

Quatre éléments physiologiques ont un rôle essentiel dans la formation des lésions acnéiques : l'hyperséborrhée, une anomalie de la kératinisation du follicule pilo-sébacé, l'inflammation et la colonisation du follicule par certaines espèces bactériennes interagissant entre elles, appartenant à la flore cutanée, notamment *Staphylococcus epidermidis* et *C. acnes* (35).

La capacité à former un biofilm par cette bactérie joue également un rôle important dans l'acné (22, 33). *C. acnes* est capable d'induire une réaction inflammatoire au niveau du follicule. En effet, il est capable de produire des acides gras *via* une lipase entretenant la réaction inflammatoire (36, 37). Ainsi, *C. acnes* joue un rôle primordial dans cette pathologie, notamment en se liant au TLR2 par l'intermédiaire du facteur CAMP 1 (38).

B) Infections profondes

a. Infections ostéo-articulaires

Aujourd'hui, les nouvelles techniques diagnostiques (PCR spécifiques, ARNr 16S, sonication, etc.) et la prolongation systématique de l'incubation des cultures (39), ont mis en évidence un nombre important d'isolement de *C. acnes* au sein de prélèvements cliniques. Ces infections sont donc sous-estimées (34). Il est maintenant reconnu que cette bactérie est un pathogène opportuniste et joue un rôle important dans les infections profondes, notamment sur matériel (5).

Les staphylocoques, avec *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative, sont les bactéries les plus fréquemment isolées dans les infections ostéo-articulaires. (34, 40). Les bactéries retrouvées secondairement sont représentées par les streptocoques, les entérocoques, les entérobactéries, et les anaérobies. La distribution des micro-organismes est variable selon le type d'infection (figure 7).

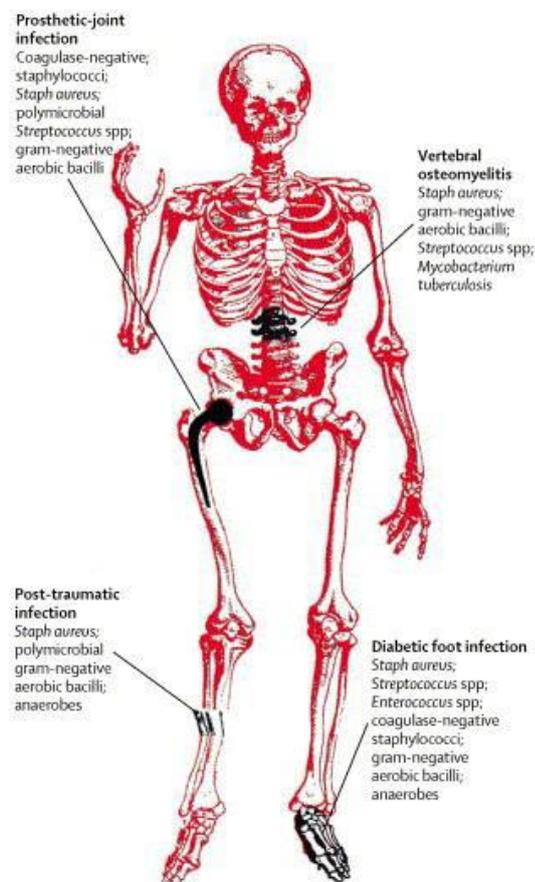


Figure 7 : Microbiologie des différents types d'infections ostéo-articulaires, d'après Lew *et al.*, Lancet, 2004.

C. acnes est la bactérie anaérobie la plus souvent impliquée dans les infections ostéo-articulaires (3). Dans une étude réalisée au CHU de Lille de 2002 à 2011, le nombre d'infections ostéo-articulaires à *C. acnes* a augmenté, de 8 à 32 (2). Toutefois, les infections ostéo-articulaires à *C. acnes* sont le plus souvent localisées au niveau du rachis lombaire ou de l'épaule, notamment chez des patients porteurs de prothèses (41), représentant environ 40 % des infections (34, 41). Ces sites sont fréquemment infectés par *C. acnes* en raison de la présence en grande quantité de follicules pilo-sébacés. Les infections à *C. acnes* sur prothèses sont le plus souvent des infections tardives, de plus de 3 mois, après la pose de prothèse.

Le diagnostic de ce type d'infection s'avère encore parfois difficile et *C. acnes* peut être considéré comme un contaminant. Il est recommandé de poser le diagnostic d'infection ostéo-articulaire à *C. acnes* que, si au moins deux prélèvements sont positifs en culture à ce même micro-organisme. De plus, il faut tenir compte du fait que la culture bactérienne a une sensibilité limitée, avec 10 à 20 % de « faux négatifs » en culture. Dans certaines situations cliniques, il peut donc être utile d'avoir recours à des techniques plus performantes telles que la PCR, l'ARNr 16S ou l'utilisation désormais de PCR multiplexes spécifiques combinées (42–44).

b. Autres types d'infections

C. acnes est un pathogène opportuniste pouvant être retrouvé dans de nombreux types d'infections. Généralement, les infections à *C. acnes* surviennent sur matériel, de part leur capacité à produire des biofilms conduisant à des infections persistantes et torpides (34).

Il peut être à l'origine d'infections cardiovasculaires, notamment des endocardites infectieuses. Le plus souvent, ces endocardites surviennent sur matériel (45). En effet, *C. acnes* peut infecter des valves natives mais le plus souvent, les endocardites sont sur valves prothétiques. Les endocardites peuvent également survenir sur défibrillateurs cardiaques implantables ou sur pacemaker. Les portes d'entrées sont essentiellement cutanée et sanguine. La mortalité est assez élevée allant de 15 à 27 % (46). Ces endocardites s'avèrent difficiles à diagnostiquer en raison de la nécessité d'une incubation prolongée des hémocultures et de la mise en œuvre de méthodes diagnostiques supplémentaires. Leur prévalence est donc probablement sous-estimée (47, 48).

La pose d'implants mammaires est une chirurgie pouvant se compliquer localement par des contractures capsulaires, à savoir la formation d'une coque autour du sein opéré avec

déformation du sein et parfois des douleurs associées. Sa prévalence est variable selon les séries de la littérature, allant de 5 à 74 % après des reconstructions mammaires. L'étiologie de cette complication n'est pas connue. Néanmoins, il semblerait qu'une infection microbienne puisse en être à l'origine. Il existe une corrélation entre la formation du biofilm bactérien et la survenue de contractures capsulaires. Ces biofilms sont essentiellement polymicrobiens mais deux espèces sont très souvent rencontrées, à savoir *S. epidermidis* et *C. acnes*, qui auraient donc un rôle primordial dans la survenue de contractures capsulaires (22, 49).

C. acnes peut également être impliqué lors d'infections du système nerveux central telles que les méningites, notamment après dérivation du liquide céphalo-rachidien, les abcès cérébraux, les empyèmes sous-duraux ou extra-duraux, ou encore les abcès épiduraux. Ce sont généralement des infections post-opératoires survenant précocement dans les quinze jours suivant l'intervention, résultant d'une contamination per-opératoire d'origine cutanée (50–52).

Enfin, les endophtalmies post-opératoires chroniques sont définies par leur survenue à plus de six mois après l'intervention chirurgicale. *C. acnes* est le micro-organisme le plus fréquemment isolé dans ce type d'infections représentant 41 à 63 % des isolements (53, 54).

Les différents types d'infections où *C. acnes* est potentiellement impliqué, sont présentés dans le tableau 2, page 29, adapté de Achermann *et al*, Clinical Microbiology Reviews, 2014 :

Tableau 2 : Types d'infections causées par *C. acnes* (tableau adapté de Achermann *et al.*, Clinical Microbiology Reviews, 2014.

Types d'infections		Références bibliographiques
Infections sur matériel	Prothèses articulaires	(26, 41, 55, 56)
	Orthopédiques (clou, vis...)	(5, 57, 58)
	Cérébral (dérivation externe, abcès...)	(50–52)
	Implants mammaires	(49, 59–61)
	Cardiovasculaires (pacemaker, valves prothétiques...)	(62–66)
	Endophtalmies post-opératoires	(67)
	Cathéters péritonéaux	(68)
	Spondylodiscites	(69)
Infections bucco-dentaires		(70)
Infections prostatiques		(71, 72)
Endophtalmies, kératites		(73, 74)

III- *Cutibacterium acnes* et antibiotiques

A) Options thérapeutiques des infections à *C. acnes*

La Société Française de Dermatologie recommande l'utilisation d'antiseptiques, crèmes hydratantes, et de traitement médicamenteux dans la prise en charge de l'acné (75). Ces traitements médicamenteux peuvent être administrés par voie locale ou générale, selon la forme clinique et la sévérité de l'acné. Aujourd'hui, le recours aux antibiotiques dans le traitement de l'acné est limité à trois mois de tétracyclines *per os*. Dans cette pathologie inflammatoire cutanée, des alternatives thérapeutiques sont alors proposées, notamment le peroxyde de benzoyle associé à des rétinoïdes ou l'isotrétinoïne *per os* (75). En effet,

l'émergence de résistance bactérienne aux antibiotiques dans différents pays a entraîné une alerte soulignant le risque individuel (échec de traitement) et collectif (impact sur les flores microbiennes). Les antibiotiques largement utilisés dans l'acné sont : les cyclines, notamment la doxycycline, les macrolides avec l'érythromycine et enfin le cotrimoxazole. Les fluoroquinolones en topique sont également parfois utilisées, comme au Japon (75, 76).

Le traitement médicamenteux des infections profondes à *C. acnes* fait souvent appel à des associations d'antibiotiques, au départ en intra-veineux. Le traitement de premier choix est la pénicilline G ou l'amoxicilline ou des céphalosporines de troisième génération telle que la ceftriaxone. En cas d'allergie aux β -lactamines, il est recommandé d'avoir recours à la vancomycine ou à la daptomycine (77).

Dans le cas des infections ostéo-articulaires, le traitement est à la fois chirurgical (lavages, changements de prothèses, etc...) et médicamenteux. Il n'existe aucune recommandation sur les infections ostéo-articulaires à *C. acnes*. L'antibiothérapie peut avoir recours à la lévofloxacine, la clindamycine, la tétracycline, ou encore la rifampicine. Dans tous les cas, il est préférable d'utiliser ces antibiotiques en association.

La rifampicine est intéressante puisqu'elle est active sur le biofilm formé par la bactérie. En effet, il a été prouvé que la rifampicine était active *in vitro* sur les biofilms formés par *C. acnes* (78). Plus récemment, en 2012, une équipe suisse a démontré son efficacité *in vivo* dans un modèle animal d'infections sur matériel. En effet, les associations d'antibiotiques combinant la rifampicine, la daptomycine, la vancomycine ou la lévofloxacine montraient une meilleure activité sur le biofilm formé par *C. acnes* que ces mêmes antibiotiques en monothérapie (11).

B) Résistances aux antibiotiques

a. Résistances naturelles

C. acnes est naturellement résistant au métronidazole. Il est également résistant à la fosfomycine, à la colistine, au triméthoprime et à l'aztréonam. Sa sensibilité aux aminosides s'avère modérée, c'est pourquoi, leur utilisation est à proscrire en clinique.

b. Résistances acquises

C. acnes est généralement sensible à la plupart des antibiotiques, notamment aux β -lactamines, quinolones, lincosamides ou encore rifampicine.

Néanmoins, l'émergence de la résistance a été observée dès le début des années 1980 vis-à-vis des macrolides, clindamycine, cyclines et sulfaméthoxazole-triméthoprime (79). A ce jour, les souches de *C. acnes* deviennent résistantes aux antibiotiques uniquement par mutations chromosomiques ; si l'existence de plasmides chez *C. acnes* est avérée, la résistance par acquisition de plasmides n'a pas été démontrée. Aucune résistance aux pénicillines, glycopeptides, linézolide ou daptomycine n'a encore été rapportée, contrairement aux autres bactéries à Gram positif (80).

i. Les macrolides

Les macrolides sont et ont été largement utilisés par voie orale ou locale. De ce fait, rapidement une émergence de la résistance à cette famille d'antibiotiques a été rapportée (81). La résistance aux macrolides chez *C. acnes* est classée en quatre groupes selon le mécanisme de résistance et la sensibilité aux différents antibiotiques (tableau 3).

Tableau 3 : Principales mutations impliquées dans la résistance aux macrolides, chez *C. acnes*, d'après Aubin *et al.*, Médecine et maladies infectieuses, 2014.

	Pourcentage estimé de souches concernées	Mécanisme de résistance	Niveau de sensibilité aux antibiotiques
Groupe I	80 %	Mutation en position 2058 de l'ARN 23S	Haut niveau de résistance à l'érythromycine et résistance modérée à la clindamycine
Groupe II	< 10 %	Modification de cible par méthylase (gène <i>ermX</i>)	Haut niveau de résistance aux macrolides et à la clindamycine
Groupe III	9,80 %	Mutation en position 2057 de l'ARN 23S	Bas niveau de résistance à l'érythromycine et sensibilité conservée aux autres macrolides
Groupe IV	10 %	Mutation en position 2059 de l'ARN 23S	Résistance à tous les macrolides excepté la télithromycine

Deux types de mécanismes de résistance par modification de cible de l'antibiotique peuvent être rencontrés. Le premier est lié à des mutations en positions 2057, 2058 ou 2059 dans les gènes chromosomiques au sein du domaine V codant pour l'ARN ribosomal 23S. Le second est lié à la production d'une méthylase ribosomale codée par le gène *erm* (erythromycin ribosome methylase) (5, 22, 81). Récemment, en mars 2016, une équipe japonaise a mis en évidence une nouvelle mutation au sein du gène codant pour l'ARN 23S, avec présence d'une substitution d'une cytosine par une guanine en position 2611. Cette mutation confère une résistance aux macrolides à quatorze atomes de carbones (81)

ii. Les cyclines

La résistance aux cyclines est due à une mutation en position 1058 (numérotation de *Escherichia coli*) au sein du gène codant pour l'ARN 16S. Elle touche toutes les cyclines : minocycline, doxycycline et tétracycline, molécules largement utilisées en thérapeutique, notamment dans l'acné (75, 82).

iii. La rifampicine

La rifampicine possède la capacité à pénétrer dans un biofilm formé par des bactéries. Elle est donc très utile dans le cadre des infections sur matériel telles que les infections sur prothèses, pacemaker...

Généralement, la résistance à la rifampicine est due à des mutations ponctuelles dans le gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN-polymerase, cible de la molécule. Ces mutations peuvent survenir dans trois régions du gène : la région I correspondant aux acides aminés 507 à 533 (numérotation de *E. coli*), la région II correspondant aux acides aminés 563 à 572 et enfin, la région III correspondant aux acides aminés 684 à 690.

Une étude menée en 2012 au CHU de Nantes en collaboration avec le CHUV de Lausanne en Suisse par Tabin *et al.* a décrit pour la première fois la caractérisation moléculaire de la résistance à la rifampicine chez *C. acnes*. Trois mutations ont été détectées dans la région I du gène *rpoB* associées à des haut et bas niveaux de résistance et deux mutations dans la région II. Ils ont démontré également que cette résistance peut être prévenue par l'association de la rifampicine avec la lévofloxacine, la clindamycine ou la pénicilline G. En 2015, Tabin *et al.* ont également montré la présence de mutations dans les régions I et II du gène *rpoB* chez des souches cliniques de *C. acnes*, conférant un haut niveau de résistance à la rifampicine (CMI >

32 mg /L). La principale mutation en position 442 avec la substitution d'une Serine par une Leucine est considérée comme un « hot spot » au sein de ce gène.

Pour diminuer ou limiter la survenue de résistance à la rifampicine, il est donc recommandé de toujours l'utiliser en association, notamment avec des fluoroquinolones (5, 10, 11, 22, 83).

iv. Le cotrimoxazole

Le sulfaméthoxazole-triméthoprimine ou cotrimoxazole est régulièrement utilisé dans le traitement contre l'acné, particulièrement lors de l'inefficacité d'autres molécules telles que la tétracycline ou la clindamycine ou par habitude comme au Mexique (8).

La résistance de *C. acnes* au cotrimoxazole est rapportée régulièrement. En 2015, Shafer *et al.* ont montré que sur 80 souches de *C. acnes* isolées de lésions acnéiques, 26,3 % étaient résistantes au cotrimoxazole (84), contre 68 % dans une étude mexicaine en 2010, incluant 50 patients (8). Le mécanisme moléculaire conférant cette résistance n'a pas encore été élucidé. Il pourrait soit mettre en jeu un défaut de perméabilité par la présence de pompes d'efflux, soit l'acquisition d'une dihydrofolate réductase plasmidique.

Le tableau 4, adapté de Aubin *et al.*, reprend les antibiotiques à tester et les différents mécanismes de résistance rencontrés.

Tableau 4 : Mécanismes de résistances aux antibiotiques chez *C. acnes*

Familles d'antibiotiques	Mécanismes de résistance	Références
β-lactamines	Inconnu	(5, 79)
Glycopeptides	Inconnu	(5, 79)
Macrolides	Mutations au sein du gène codant pour l'ARN 23S ou production d'une méthylase (gène <i>erm</i>)	(5, 22, 81)
Tétracyclines	Mutations au sein du gène codant pour l'ARN 16S	(5)
Cotrimoxazole	Inconnu	(5, 8, 84)
Rifampicine	Mutations au sein du gène <i>rpoB</i>	(5, 10, 11, 22, 83)
Linézolide	Inconnu	(5)

2^{ème} partie :
Revue bibliographique sur la résistance
aux fluoroquinolones chez les bactéries à
Gram positif

Les fluoroquinolones sont des antibactériens de synthèse dérivés de l'acide nalidixique, intermédiaire de synthèse de la chloroquine découvert en 1962 (85). De nos jours, leur large utilisation entraîne une augmentation des bactéries résistantes à ces molécules. Après description du mécanisme d'action et du spectre d'activité des fluoroquinolones, nous nous proposons dans un premier temps, de décrire les mécanismes de résistance des bactéries aux fluoroquinolones et, dans un second temps, de faire une revue bibliographique sur la sensibilité des souches de *C. acnes* aux fluoroquinolones.

I- Généralités sur les fluoroquinolones

En 1962, Georges Lesher découvre la première quinolone utilisée en thérapeutique, l'acide nalidixique. C'est un intermédiaire de synthèse de la chloroquine ayant des propriétés antibactériennes (figure 8). Elle est le chef de file des quinolones de 1^{ère} génération (acide nalidixique NEGRAM[®], Fluméquine APURONE[®], Acide pipémidique PIPRAM[®]) (85).

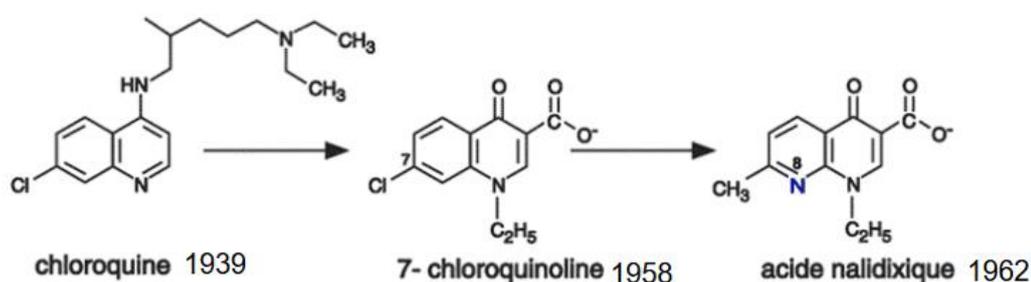


Figure 8 : Synthèse chimique de l'acide nalidixique (86)

En 1980, les premières fluoroquinolones de synthèse dites de seconde génération de synthèse sont disponibles sur le marché. Ces fluoroquinolones sont divisées en deux sous-types :

- les fluoroquinolones urinaires avec la Norfloxaciné NOROXINE[®], l'Enoxaciné ENOXOR[®] ou encore la Loméfloxacine LOGIFLOX[®]
- et les fluoroquinolones systémiques avec la Péfloxaciné PEFLACINE[®], l'Ofloxaciné OFLOCET[®], et la Ciprofloxacine CIFLOX[®]. Enfin, à la fin des années 1990, sont nées les fluoroquinolones à spectre plus large dites anti-pneumococciques, avec

comme représentants principaux : la Lévofoxacine TAVANIC® et la Moxifloxacin IZILOX®.

Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bi-cyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones, ainsi appelées car elles contiennent un atome de fluor en position 6, dérivent de la quinoléine.

La figure 9 représente la structure chimique des quinolones avec le pharmacophore commun à toutes les quinolones.

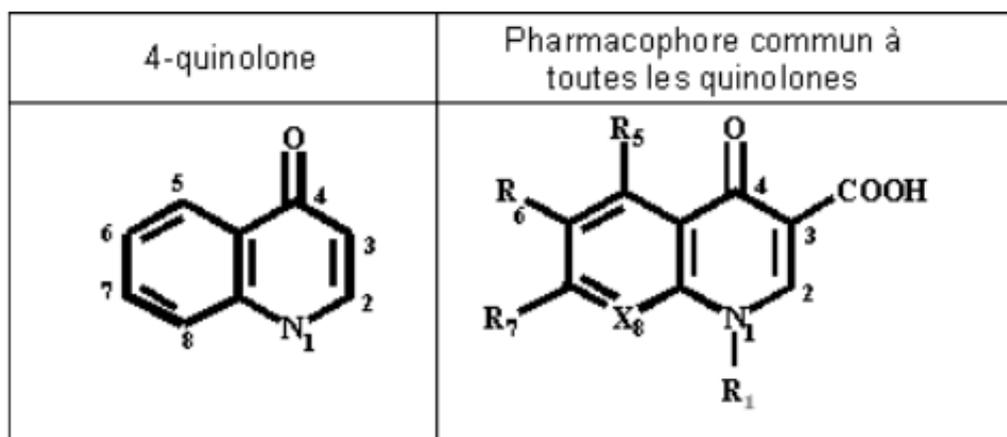
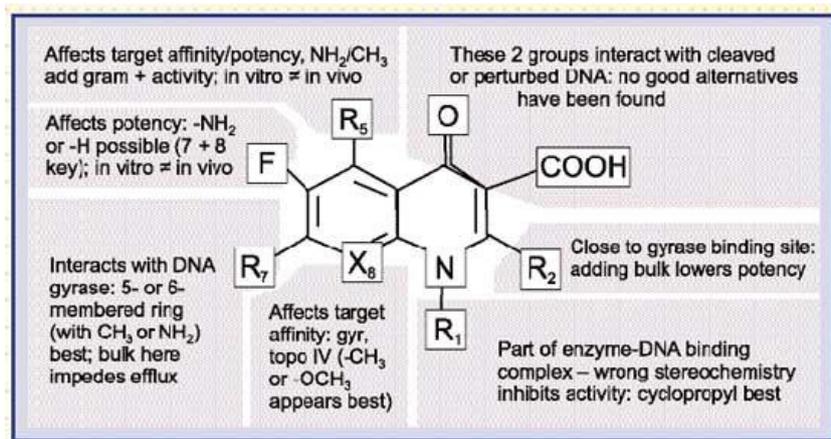


Figure 9 : Structure chimique du pharmacophore des quinolones

La présence d'une fonction acide carboxylique en position 3, et un cycle pyridone dont la fonction aminée en position 1 est substituée par une chaîne aliphatique ou par un cycle sont indispensables à l'activité antibiotique. Enfin, l'addition d'un fluor en position 6 et d'un cycle diamine en position 7 accroît très significativement l'activité par rapport aux dérivés originaux (acide nalidixique). La nature des substituants en position 1, 5, 6, 7 et 8 module le spectre d'activité, les effets secondaires et la pharmacocinétique des différentes molécules (87).

La figure 10, page 38, représente les rôles des fonctions chimiques et substituants des différentes positions du noyau des fluoroquinolones.



Légende : PK = pharmacocinétique, X= C ou N

Figure 10 : Relation structure-activité des fluoroquinolones, d'après Andriole *et al.*, 2002 (88)

II- Mécanisme d'action des fluoroquinolones

Une fois dans le cytoplasme, les quinolones vont inhiber de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien en agissant au niveau des phénomènes de surenroulements de l'ADN. Elles ont pour cible deux enzymes de la classe des topoisomérases : l'ADN gyrase ou topoisomérase II, généralement cible préférentielle chez les bactéries à Gram négatif et la topoisomérase IV, cible principale chez les bactéries à Gram positif. L'inhibition de ces enzymes entraînent une inhibition de l'élongation de l'ADN bactérien et donc un blocage de la réplication bactérienne (89) (figure 11).

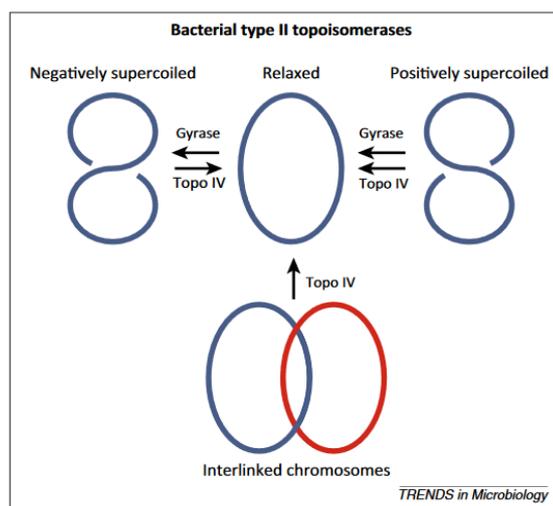


Figure 11 : Mécanismes d'action des topoisomérases II et IV (90)

L'ADN bactérien est super-enroulé comme un fil de téléphone, pour permettre de minimiser l'encombrement de l'ADN. Les deux enzymes citées précédemment permettent de moduler l'enroulement et donc la réplication et la transcription (89, 91).

L'ADN Gyrase ou Topoisomérase II est composée de deux sous-unités A codées par le gène *gyrA* et de deux sous-unités B codées par le gène *gyrB* (91). L'activité enzymatique de la gyrase est ATP-dépendante et peut être décomposée en trois étapes : coupure de l'ADN double-brin, torsion de l'ADN et soudure des deux brins. Les quinolones sont capables de se fixer sur le complexe covalent formé par l'ADN et l'enzyme au niveau d'une tyrosine en position 122 du gène *gyrA*, rendant ce complexe irréversible. Ainsi, les activités des ADN et ARN-polymérase sont bloquées et les quinolones stoppent les étapes de réplication et de transcription, inhibant la croissance bactérienne. Pour exemple, les figures 12 A et B représentent la structure de l'ADN gyrase (en bleue) chez *M. tuberculosis*, avec le complexe formé par l'ADN (en orange) et l'enzyme, inhibé par les quinolones (ici la moxifloxacine en vert). La figure 12 C est une vue rapprochée de la structure de la moxifloxacine (en violet) intercalée dans la double hélice d'ADN (en vert).

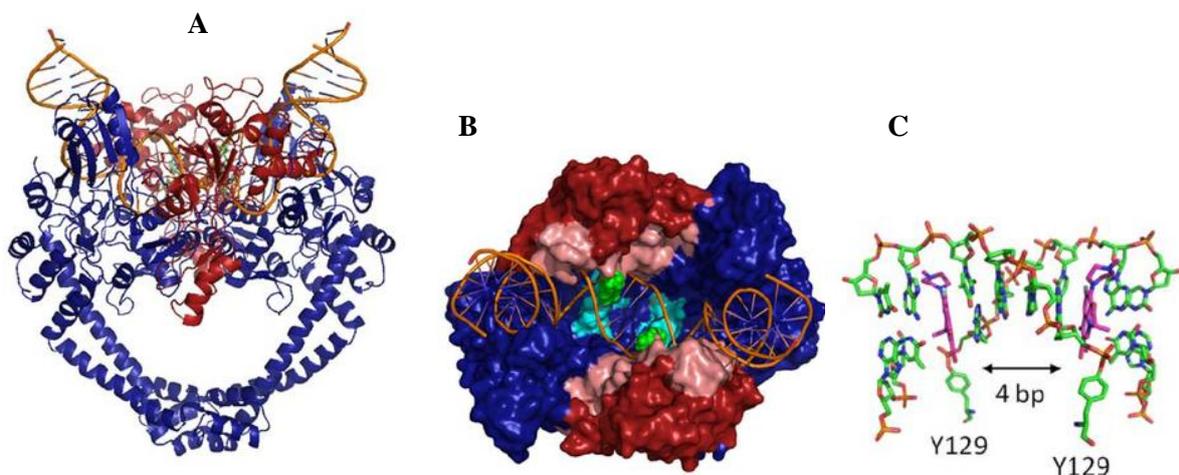


Figure 12 : Structure de l'ADN gyrase et mécanisme d'action des quinolones (92)

La Topoisomérase IV est composée de deux sous-unités C codées par le gène *parC* et de deux sous-unités E codées par le gène *parE*. (91) Cette enzyme permet le désenchevêtrement des ADN fils en fin de réplication. Les quinolones sont capables d'inhiber *in vitro* et *in vivo* l'activité de cette enzyme, perturbant ainsi les phénomènes de décaténation et de ségrégation de l'ADN chromosomique lors de la division bactérienne. Les figures 13 A

et B représentent la structure de la topoisomérase IV (ParC en bleu pâle et ParE en bleu cyan) chez *S. pneumoniae*, avec le complexe formé par l'ADN (en orange) et l'enzyme, inhibé par les quinolones (ici la lévofloxacine en jaune).

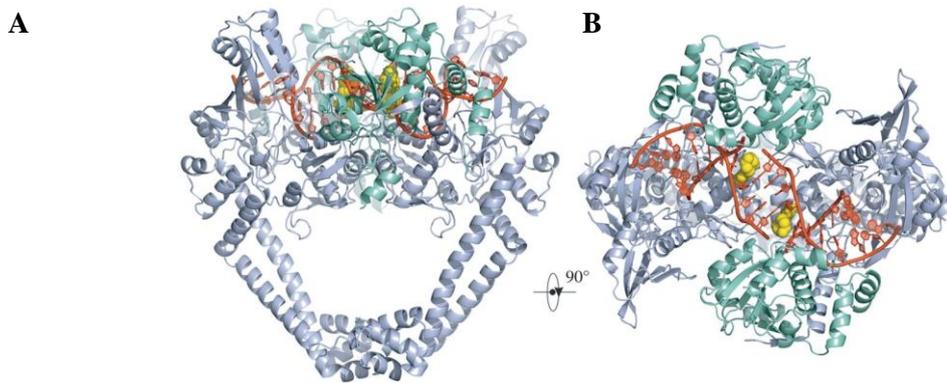


Figure 13 : Structure de la Topoisomérase IV et mécanisme d'action des quinolones (93)

III- Spectre antimicrobien des fluoroquinolones

Les quinolones de 1^{ère} génération ont un spectre étroit limité aux bactéries à Gram négatif, et notamment les entérobactéries.

Les fluoroquinolones ont un spectre qui s'élargit en incluant les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la Mécilline (SASM), les *Pseudomonas aeruginosa* et les bactéries intra-cellulaires comme *Chlamydia* ou *Legionella*. Elles sont également actives sur les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la Mécilline (SARM) malgré la possibilité de résistances acquises nombreuses aujourd'hui, et les cocci à Gram négatif tels que les *Neisseria*.

Les fluoroquinolones urinaires ont le même spectre que les fluoroquinolones systémiques mais sont réservées aux infections urinaires, en raison de leur faible diffusion dans le sang.

Les fluoroquinolones de 3^{ème} génération ou fluoroquinolones anti-pneumococciques, comme leur nom l'indique, ont un spectre élargi incluant les streptocoques, notamment le pneumocoque, mais également les micro-organismes anaérobies et les mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*). En effet, la lévofloxacine possède une

activité anti-anaérobies stricts telles que les souches de *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* ou *Cutibacterium*.

IV- Mécanismes des résistances acquises

Le nombre de souches résistantes aux quinolones augmente considérablement (94). Aujourd'hui, la résistance aux fluoroquinolones constitue donc un problème majeur de Santé Publique. La résistance est croisée entre les différentes fluoroquinolones, avec différents niveaux d'expression phénotypique. Chez les fluoroquinolones, la résistance bactérienne est le plus souvent chromosomique, en lien avec la présence de mutations spontanées dans certains gènes chromosomiques. Ces mutations réduisent la sensibilité de la bactérie, par deux grands mécanismes : modification de cible et défaut d'accumulation intra-cellulaire de l'antibiotique. Des mécanismes de résistances plasmidiques aux fluoroquinolones existent mais restent moins fréquents et cantonnés aux bactéries à Gram négatif (95).

A) Mécanismes des résistances chromosomiques

a. Résistance par modification de cible

La résistance par modification de cible est le mécanisme de résistance aux fluoroquinolones le plus fréquent. Il résulte de la survenue de mutations au niveau des deux enzymes cibles des fluoroquinolones : ADN Gyrase et Topoisomérase IV.

L'ADN Gyrase est une enzyme tétramérique composée de quatre sous-unités : deux sous-unités A et deux sous-unités B, codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB*. De même la topoisomérase IV est constituée de quatre sous-unités : deux sous-unités C codées par le gène *parC* et deux sous-unités E codés par le gène *parE*.

Chez les bactéries à Gram négatif, la résistance par modification de cible a pour cible préférentielle l'ADN gyrase. La modification de la topoisomérase IV joue un rôle secondaire, pour qu'une mutation survienne dans le gène *par*, une mutation préalable doit exister au sein des gènes *gyr* (90). Ainsi, une bactérie à Gram négatif dont le chromosome est muté au sein des gènes *gyr* puis *par*, présente un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones. Au contraire, chez les bactéries à Gram positif, la cible primaire est généralement la topoisomérase IV, notamment chez *S. aureus* (96).

La région nucléotidique où surviennent les mutations s'avère être une courte séquence de nucléotides nommée « Quinolone-Resistance Determining Region » ou QRDR. Les mutations détectées dans cette région QRDR sont des substitutions nucléotidiques, empêchant la liaison de la fluoroquinolone aux enzymes, conférant ainsi une résistance à toutes les fluoroquinolones.

i. Résistance par modification de l'ADN Gyrase

Chez les bactéries à Gram positif, la sous-unité A est celle qui est principalement altérée. La sous-unité B est moins touchée par les modifications (97). Les mutations surviennent le plus fréquemment entre les positions 67 et 107 de la sous-unité GyrA (numérotation de *E. coli*), à savoir dans la région QRDR (98). Les mutations les plus fréquentes sont des substitutions d'acides aminés en positions Ser83 et Asp87 de la sous-unité GyrA pour les bactéries à Gram négatif et positif (90). La présence d'une seule mutation dans cette région QRDR confère une résistance de haut niveau à l'Acide Nalidixique. Néanmoins, des mutations supplémentaires sont requises dans les sous-unités GyrA ou ParC, afin d'obtenir une résistance aux autres molécules.

La figure 14 représente la comparaison des séquences d'acides aminés de la zone QRDR de GyrA d'autres espèces (acides aminés 67 à 107 avec la numérotation de *E. coli*, correspondant aux acides aminés 85 à 125 avec la numérotation de *C. acnes*).

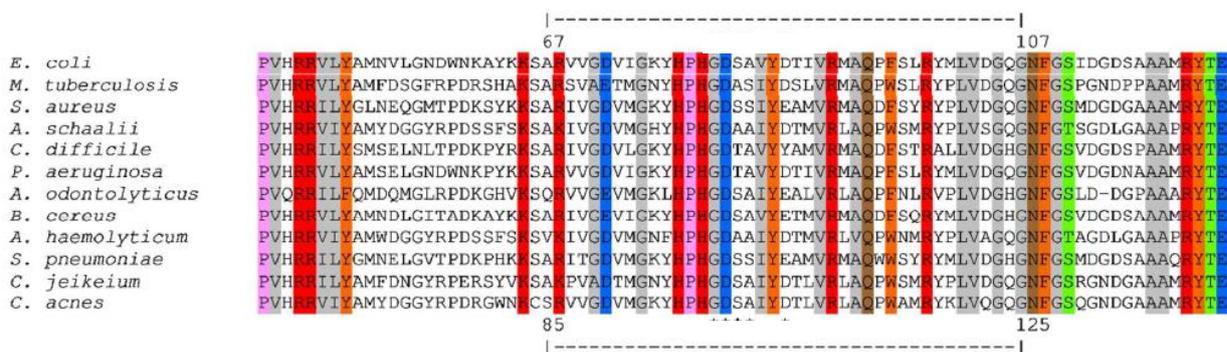


Figure 14 : Comparaison de la séquence protéique de la région QRDR de GyrA de différentes espèces bactériennes d'intérêt médical

Dans la littérature, de nombreuses mutations au sein du gène *gyrA* ont donc été décrites chez les bactéries à Gram positif (tableau 5, page 43).

Tableau 5 : Mutations GyrA chez des bactéries à Gram positif

Bactérie	Mutations GyrA (positions)	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ser84Leu, Glu88Lys	(96, 99)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Ser87Phe, Ser87Val, Ser87Arg, Ala88Pro, Ile89Val, Asp91Gly, Asp91Tyr, Asp91Ala	(100)
<i>Clostridium difficile</i>	Thr82Ile, Thr82Val	(101,102)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ser81Phe, Ser81Tyr, Ser81Cys, Glu85Lys	(103, 104)
<i>Actinotignum shaalii</i>	Ala83Val	(105)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Gly88Ala, Asp89Asn, Ala90Val, Ser91Pro, Asp94His, Asp94Tyr, Asp94Asn, Asp94Ala, Asp94Gly, Asp94Cys	(106, 107)

Des mutations dans le gène *gyrB* ont également été décrites chez les bactéries à Gram positif, mais elles restent plus rares (tableau 6).

Tableau 6 : Mutations GyrB chez des bactéries à Gram positif

Bactérie	Mutations GyrB (positions)	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pro456Ser, Glu477Asp	(108, 109)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Non décrit	
<i>Clostridium difficile</i>	Asp426Val, Asp426Asn	(101, 102)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Asp435Asn	(110)
<i>Actinotignum shaalii</i>	Non décrit	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Arg485His, Asp500Asn, Asp500Ala, Ser486Tyr, Asp538Thr, Asp538Thr	(106)

ii. Résistance par modification de la Topoisomérase IV

Comme pour les gènes *gyrA*, une zone QRDR est décrite pour les gènes *parC*. Le plus souvent, les mutations surviennent aux positions 80 et 84 de la sous-unité C, au sein de la zone QRDR de ParC (acides aminés 64 à 103 selon la numérotation de *E. coli*) (figure 15). La sous unité E est également moins touchée.

La figure 15 représente la comparaison des séquences d'acides aminés de la zone QRDR de ParC d'autres espèces (acides aminés 64 à 103 avec la numérotation de *E. coli*, correspondant aux acides aminés 73 à 112 avec la numérotation de *C. acnes*).

	64		80		84		103																																	
<i>E. coli</i>	A	R	T	V	G	D	V	L	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	C	Y	E	A	M	V	L	M	A	Q	P	F	S	Y	R	Y	P	L	V	D	G	Q
<i>A. schaalii</i>	S	R	V	V	G	D	V	M	G	R	L	H	P	H	G	D	T	A	I	Y	D	A	M	V	R	L	A	Q	P	F	T	M	R	L	P	L	V	D	G	H
<i>A. haemolyticum</i>	S	R	V	V	G	D	V	M	G	R	L	H	P	H	G	D	A	A	I	Y	D	A	M	V	R	L	A	Q	D	F	S	L	R	L	P	F	V	D	G	H
<i>A. odontolyticus</i>	Q	R	V	V	G	E	V	M	G	K	L	H	P	H	G	D	S	A	I	Y	E	A	L	V	R	L	A	Q	P	F	N	L	R	V	P	L	V	D	G	H
<i>S. pneumoniae</i>	A	K	S	V	G	N	I	M	G	N	F	H	P	H	G	D	F	S	I	Y	D	A	M	V	R	M	S	Q	D	W	K	N	R	E	I	L	V	E	M	H
<i>S. aureus</i>	A	K	T	V	G	D	V	I	G	Q	Y	H	P	H	G	D	S	S	V	Y	E	A	M	V	R	L	S	Q	D	W	K	L	R	H	V	L	I	E	M	H
<i>P. aeruginosa</i>	A	R	T	V	G	D	V	L	G	K	F	H	P	H	G	D	S	A	C	Y	E	A	M	V	L	M	A	Q	P	F	S	Y	R	Y	P	L	V	D	G	Q
<i>P. acnes</i>	A	R	V	V	G	Q	V	M	G	Q	L	H	P	H	G	D	A	A	I	Y	D	A	L	V	R	T	A	Q	P	W	A	M	R	L	P	L	V	D	G	H

Figure 15 : Comparaison de la séquence protéique de la région QRDR de ParC de différentes espèces bactériennes d'intérêt médical (105)

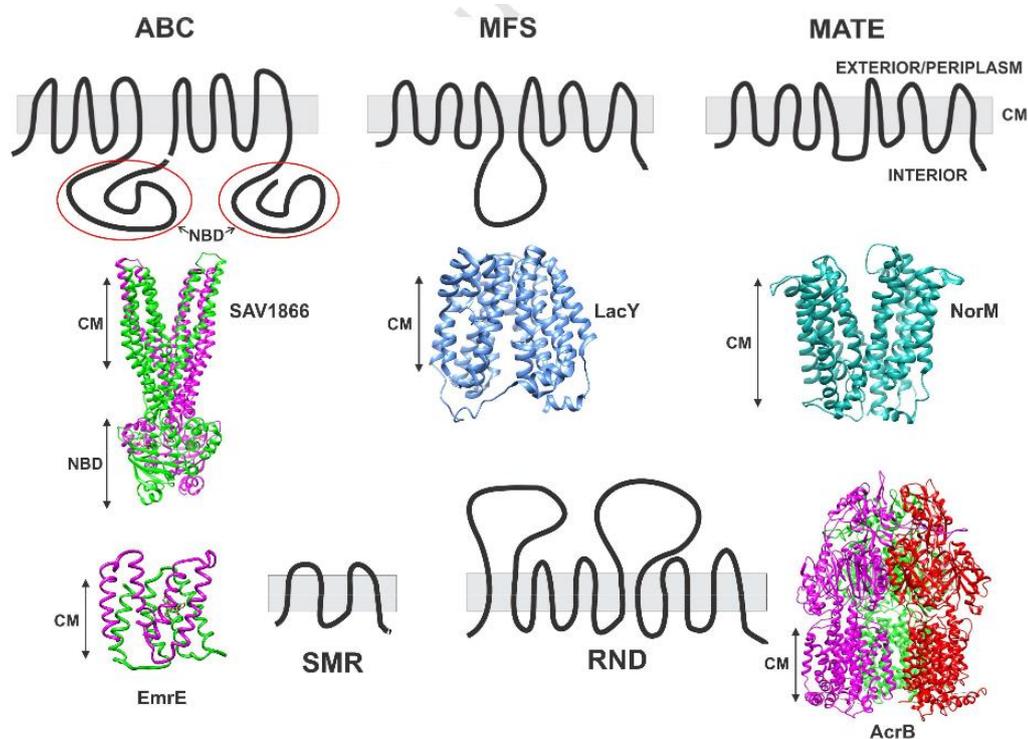
Chez *S. aureus*, les mutations dans le gène *parC* (encore appelé *grlA*) constitue une cible primaire pour la résistance aux fluoroquinolones. En cas de mutations additionnelles dans le gène *gyr*, le niveau de résistance augmente (111).

Chez d'autres bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae*, la cible de la résistance primaire aux fluoroquinolones dépend de l'antibiotique utilisé (112). En effet, en cas d'utilisation de ciprofloxacine en tant qu'inhibiteur, la cible principale se situe dans le gène *parC* tandis que si l'on considère la sparfloxacine, les mutations se situent principalement dans le gène *gyrA* (113).

Au sein de la sous unité ParE, des modifications d'acides aminés ont été décrites *in vitro* : en positions Asp435Asn et His102Tyr chez *S. pneumoniae*, ainsi qu'en positions Pro25His, Glu422Asp, Asp432Asn, Asp432Gly, Pro451Ser, Pro451His, ou Asn470Asp chez *S. aureus*. Néanmoins, il n'a pas encore été prouvé que ces différentes mutations jouaient un rôle clé dans la résistance clinique aux fluoroquinolones (109, 114–116).

b. Résistance par défaut d'accumulation

Des mécanismes d'efflux actif ont été décrits chez les bactéries à Gram positif. La surexpression de transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux entraîne la réduction de la concentration intra-bactérienne de l'antibiotique avec la survenue d'une résistance de bas niveau par exportation active de l'antibiotique. La particularité de ces mécanismes d'efflux est qu'ils sont non spécifiques, amenant à une « multi-drug resistance » (ou MDR), avec une résistance croisée avec d'autres familles d'antibiotiques (phenicolés, aminosides, etc). Les pompes MFS (*Major Facilitator Superfamily*) sont les plus fréquentes, suivies des pompes ABC (*ATP-Binding-Cassette*) et SMR (*Small Multidrug Resistance*) (117) (figure 16).



Chez les souches de *S. aureus*, la pompe transmembranaire d'efflux ATP-dépendante de la superfamille MFS NorA, est à l'origine d'une résistance par efflux actif, entraînant l'élimination des fluoroquinolones et du chloramphenicol hors de la cellule bactérienne (118). Toutes les fluoroquinolones ne peuvent pas être expulsées de la bactérie par NorA. En effet,

cette pompe est capable d'éliminer les fluoroquinolones hydrophiles telles que la norfloxacine ou l'énoxacine, contrairement aux fluoroquinolones hydrophobes telles que l'acide nalidixique ou la sparfloxacine, par exemple (119). D'autres pompes d'efflux de la famille des MFS existent chez les souches de *S. aureus* : NorB, NorC, MdeA, LmrS, SdrM, ou encore QacB(III) (120). Des pompes NorA-like ont également été décrites : PmrA chez *S. pneumoniae*, (121), EmeA chez *E. faecalis* (122), Bmr et Blt chez *Bacillus subtilis* (123) et enfin LmrA chez *Lactobacillus lactis* (118). Chez *Listeria monocytogenes*, une pompe Lde a été décrite en 2003 avec 44 % de similitude avec la pompe PmrA de *S. pneumoniae*. Cette pompe une fois surexprimée, est associée à une résistance aux fluoroquinolones, inhibée par la réserpine (124). Enfin, le genre *Mycobacterium* avec *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* ou encore *M. avium*, possède également une pompe d'efflux impliquée dans la résistance aux fluoroquinolones, nommée MfpA (125, 126).

Le tableau 7 liste les différentes pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques, chez les bactéries à Gram positif d'intérêt médical.

Tableau 7 : Pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez différentes bactéries à Gram positif, adapté de Cattoir *et al.*, Pathologie Biologie, 2004 (90, 91, 116, 118)

Espèces	Pompe	Antibiotiques substrats
<i>B. subtilis</i>	Blt	Fluoroquinolones
	Bmr	Fluoroquinolones, chloramphénicol
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	EmeA	Fluoroquinolones, erythromycine, lincosamides, novobiocine
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA	Fluoroquinolones
<i>S. aureus</i>	NorA	Fluoroquinolones, chloramphénicol
<i>L. lactis</i>	LmrA	Fluoroquinolones, chloramphénicol, aminosides, lincosamides, macrolides à 14 et 15C, novobiocine

Les systèmes d'efflux peuvent être associés aux autres mécanismes de résistance notamment les résistances par modification des topoisomérases II ou IV. Par exemple, chez certaines souches de *S. pneumoniae*, des pompes d'efflux PatAB de la famille des ABC transporteurs, sont fréquemment surexprimées et associées à des mutations dans le gène *parC*, conférant à la bactérie un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones (CMI allant de 8 mg/L à 64 mg/L). En présence d'inhibiteurs d'efflux, les valeurs des CMI diminuent, confirmant l'importante contribution du système d'efflux dans la résistance aux fluoroquinolones (127).

Des inhibiteurs de pompes efflux existent, tels que la réserpine, le CCCP (Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone) et la PaβN (phenyl-arginine-beta-naphthylamide), largement utilisés aujourd'hui pour mettre en évidence des mécanismes de résistance par efflux au sein des bactéries. La PaβN est le premier inhibiteur de pompe à efflux découvert. Cet inhibiteur a une action vis-à-vis des pompes de type MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OpM de *Pseudomonas aeruginosa*, et des pompes AcrAB-TolC des bactéries à Gram négatif. Elle permet également de diminuer le niveau de résistance de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones (128). La réserpine permet d'inhiber les transporteurs MFS de type NorA et NorA-like (129). Le CCCP permet également d'inhiber les transporteurs de type MFS. D'autres inhibiteurs plus récents existent tels que la chloroquinolone, l'alkoxyquinolone ou encore la pyrriidoquinolone (130). Ce sont des molécules de structures chimiques similaires aux fluoroquinolones, conduisant à une diminution des CMI aux fluoroquinolones et cyclines. De part leur mécanisme d'action, ces molécules semblent être intéressantes pour une utilisation thérapeutique, néanmoins ces inhibiteurs ne sont pas utilisables en clinique en raison de leur haute toxicité pour les cellules eucaryotes (128).

B) Mécanismes des résistances plasmidiques

Le dernier mécanisme de résistance aux fluoroquinolones mis en évidence chez les bactéries à Gram positif est la résistance conférée par les plasmides, classiquement appelée PMQR pour Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. Ce mécanisme a été découvert initialement chez les bactéries à Gram négatif.

Avant 1998, les déterminants de la résistance aux quinolones étaient stables, chromosomiques et non transférables. En 1998, le premier cas avéré de résistance plasmidique aux quinolones

a été décrit par l'équipe de Martinez Martinez *et al.* (131). Ce plasmide était présent chez une souche de *K. pneumoniae* d'origine urinaire isolée en Alabama, et résistante à la ciprofloxacine. Le gène responsable de ce phénotype a été cloné puis séquencé, et la protéine nommée Qnr (quinolone resistance), puis QnrA en raison de la découverte de nouveaux variants (QnrB, QnrC, QnrD, QnrVC, QnrS).

Les protéines Qnr appartiennent à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés (ou PRP). Ces protéines agissent par protection de la cible à savoir qu'elles protègent les topoisomérases de l'action inhibitrice des quinolones. Ces plasmides n'induisent pas de résistance de haut niveau à eux seuls mais facilitent la survenue de mutations chromosomiques, pouvant conduire à une résistance de haut niveau (131). Deux autres PMQR ont également été décrits : OqxAB et QepA. Ici, le mécanisme plasmidique est différent puisqu'il s'agit de plasmides codant pour des pompes d'efflux aux quinolones, plasmides retrouvés chez les entérobactéries essentiellement (132, 133).

Les bactéries à Gram positif sont également concernées par les mécanismes de résistances plasmidiques. En effet, de nombreuses protéines PRP codées par des gènes *qnr-like* chromosomiques sont présentes, notamment chez *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *B. subtilis*, *Clostridium perfringens* et *C. difficile*, *Enterococcus faecalis* et *E. faecium*. Ces protéines possèdent de 17 à 22 % d'identité avec la protéine QnrA. Elles contribuent à la résistance intrinsèque de bas niveau aux fluoroquinolones de ces espèces (134).

V- *Cutibacterium acnes* et fluoroquinolones

Aujourd'hui, quelques études rapportent l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez des souches cliniques de *C. acnes*. La principale cause de cette émergence est probablement l'utilisation de plus en plus fréquente, de cette famille en antibiothérapie curative ciblant *C. acnes*. En effet, les fluoroquinolones sont utilisées dans le traitement des infections ostéo-articulaires à *C. acnes*, souvent en association avec la rifampicine (10, 11, 78). Par ailleurs, elles sont également utilisées dans le traitement topique de l'acné, notamment au Japon (75, 76).

Ainsi, différentes études ont rapporté des souches cliniques de *C. acnes* résistantes aux fluoroquinolones. En 2010, Gonzàles *et al.*, ont testé différentes molécules utilisées dans le traitement de l'acné dont la lévofloxacine, vis-à-vis de 50 isolats de *C. acnes* retrouvés à partir de prélèvements cutanés de lésions d'acné. Ils ont mis en évidence un niveau de résistance de 4 % à la lévofloxacine (8). En Inde, deux études ont rapporté une résistance clinique des souches de *C. acnes* à la lévofloxacine : 9,6 % pour la première (13) et 3 % pour la deuxième (15). De même, une étude égyptienne a mis en avant la résistance de souches de *C. acnes* aux fluoroquinolones avec 14,3 % de résistance (14). Enfin, en 2014 au Japon, Nakase *et al* ont évalué la sensibilité et les mécanismes de résistance de souches de *C. acnes* et *S. epidermidis* isolées de lésions acnéiques. 4,3 % de résistance à la lévofloxacine étaient décrits, avec des CMI allant de 0,25 à plus de 32 mg/L pour *C. acnes* (135).

Le tableau 8 récapitule les différentes publications avec des souches de *C. acnes* résistantes au fluoroquinolones.

Tableau 8 : Principales publications rapportant une résistance aux fluoroquinolones chez des souches cliniques de *C. acnes*.

Auteurs	Années	Journal	Niveau de résistance		CMI (en mg/L)
			n	%	
Gonzàles <i>et al.</i>	2010	Int J Dermatol	2/49	4,3	8
Nakase <i>et al.</i>	2014	J Med Microb	3/69	4,3	1
Abdel Sabour <i>et al.</i>	2015	Egypt J Med Microb	5/35	14,3	Inconnue
Sardana <i>et al.</i>	2016	Indian J Dermatol	5/47	9,6	4
Biswal <i>et al.</i>	2016	J Infect Dev Ctries	2/66	3	2

Récemment, en octobre 2016, Nakase *et al.*, ont étudié la résistance aux fluoroquinolones chez 211 isolats de patients présentant de l'acné. C'est la première étude qui a exploré le mécanisme de résistance moléculaire aux fluoroquinolones de *C. acnes*. Cinq isolats, soit 2,4 % présentaient une sensibilité diminuée à la nadifloxacine (avec une CMI \geq 4 mg/L). L'étude moléculaire des séquences nucléotidiques de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV a montré la présence de substitutions au sein de la protéine GyrA uniquement : Ser101Leu pour

quatre isolats et Asp105Gly pour l'un des isolats. Ces mutations surviennent dans les régions QRDR du gène. Aucune mutation n'a été détectée au sein des gènes *gyrB*, *parE* et *parC* (12).

Au CHU de Nantes, des souches cliniques isolées de prélèvements ostéo-articulaires sur prothèses présentaient également une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, lors de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. C'est pourquoi, de part toutes ces données, nous avons décidé d'étudier plus précisément la potentielle émergence de la résistance à la lévofloxacine d'une souche de *C. acnes in vitro* et de caractériser les mécanismes moléculaires des mutants résistants obtenus.

3^{ème} partie :
Travail personnel

I- Objectifs de l'étude

Suite à l'étude de Tafin *et al.* (10) menée au CHU de Nantes en collaboration avec le CHUV de Lausanne en Suisse, mettant en évidence la sélection possible de résistance à la rifampicine *in vitro* avec la souche de référence de *C. acnes* ATCC 11827, nous souhaitons, dans un premier temps, sélectionner des mutants résistants à la lévofloxacin, fluoroquinolone de référence dans le traitement des sepsis osseux à *C. acnes*. Nous avons ainsi évalué les différents niveaux de résistance, la fréquence de mutation et la possible protection dans l'émergence de la résistance par certains partenaires antibiotiques.

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à la caractérisation moléculaire des mutants obtenus à partir de la souche de *C. acnes* ATCC 11827 afin de mettre en évidence des mutations dans les gènes cibles principaux, à savoir des mutations au niveau des régions QRDR des sous-unités GyrA et ParC des topoisomérases de type II et IV. La comparaison aux événements génétiques retrouvés chez d'autres bactéries nous a permis d'évaluer l'impact de ces mutations sur le plan clinique et thérapeutique.

Dans un troisième et dernier temps, nous avons également souhaité mener les premières investigations à la recherche d'éventuels systèmes d'efflux chez les mutants ne présentant aucune mutation dans les gènes cibles précités.

II- Matériels et méthodes

A) Caractérisation par séquençage des gènes cibles principaux *gyrA* et *parC*

a. Origine des bactéries utilisées

La souche de référence utilisée pour toutes les expérimentations de ce travail est la souche de *C. acnes* de référence ATCC 11827, souche présente dans la collection du service de Bactériologie-Hygiène du CHU de Nantes. Cette même souche avait été utilisée pour l'étude menée par Furustrand Tafin *et al.*, étude mettant en évidence l'émergence de mutants résistants à la rifampicine *in vitro* (10).

Les CMI de la souche ATCC 11827 à l'ofloxacin, à la ciprofloxacine, à la lévofloxacine et à la moxifloxacine, étaient respectivement de 0,19, 0,25, 0,25 et 0,064 mg/L.

Sur une période de huit années, la collection de souches du service de Bactériologie-Hygiène hospitalière du CHU de Nantes a permis de conserver plus de 600 souches de *C. acnes*. Nous avons étudié six d'entre elles qui présentaient une sensibilité diminuée lors de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. En revanche, les CMI à la lévofloxacine étaient comprises entre 0,125 et 0,380 mg/L.

Les mutants obtenus étaient conservés sous la forme de cryobilles (Microbank; Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Ontario, Canada) au congélateur à -70°C. Afin d'obtenir une culture de chaque mutant, une bille était déposée sur une gélose au sang, ensemencée et la gélose était alors incubée pendant 72h en atmosphère anaérobie. L'atmosphère d'anaérobiose était obtenue grâce au système de poches anaérobies AnaeroGen™ (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), incubées dans une étuve à 37°C.

b. Obtention des mutants *in vitro*

Pour l'analyse de l'émergence de la résistance à la lévofloxacine, nous avons coulé des géloses au sang maison, composées d'un mélange de 18 mL de bouillon Mueller Hinton, additionnés de 2 mL de sang de cheval à 5 % (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) et de concentrations croissantes de lévofloxacine (solution pour perfusion en poche 5 mg/mL, Actavis®, Sanofi-Aventis Pharma AG, Compiègne, France).

Nous avons utilisé différentes concentrations d'antibiotiques de lévofloxacine : 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 et 128 fois la CMI à la lévofloxacine de la souche ATCC, soit respectivement un volume d'antibiotique ajouté au mélange de : 1 µL, 2 µL, 4 µL, 8 µL, 16 µL, 32 µL, 64 µL et 128 µL. La plus petite concentration d'antibiotique correspondait à la CMI sensible de l'ATCC, soit 0,25 mg/L. La plus haute concentration correspondait à une résistance de haut niveau, soit 32 mg/L. Nous avons testé un inoculum pour chaque valeur d'antibiotique de 10⁸ bactéries par millilitre. Ces géloses ont ensuite été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 7 jours.

Après cette phase d'incubation, chaque mutant était préalablement identifié par spectrométrie de masse MALDI-Tof (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) à l'aide d'un spectromètre de masse Vitek-MS® (bioMérieux).

Ensuite, nous avons pu confirmer la résistance à la lévofloxacine pour chacun des mutants, à l'aide de la méthode des bandelettes Etest (bioMérieux). Nous avons alors réalisé des inocula de 1 McFarland, et les géloses étaient incubées en anaérobiose pendant 48 heures, d'après le CA-SFM 2013.

La fréquence de mutation de résistance a ainsi pu être calculée, en dénombrant le nombre de colonies sur la gélose contenant de la lévofloxacine comparée au nombre de colonies sur la gélose sans lévofloxacine. Les sensibilités aux antibiotiques, notamment à l'ofloxacine, à la ciprofloxacine, à la lévofloxacine et à la moxifloxacine ont été confirmées par la méthode des bandelettes Etest (bioMérieux).

Nous avons défini arbitrairement deux niveaux de résistance : un bas niveau de résistance (BNR) pour les CMI à la lévofloxacine comprises entre 0,50 et 6 mg/L inclus et un haut niveau de résistance (HNR) pour les CMI à la lévofloxacine supérieures à 6 mg/L.

Lors des épreuves de prévention de la sélection de mutants résistants, la fréquence de mutation a été déterminée selon les mêmes modalités, en ajoutant soit de l'amoxicilline soit de la rifampicine à la moitié de la CMI, comme précédemment rapporté (136). A noter que cette expérience de prévention de l'émergence de la résistance avait été rapportée pour la résistance à la rifampicine (10).

Dans un second temps, après avoir vérifié la pureté des mutants obtenus à une faible concentration de lévofloxacine (0,75 à 4 mg/L), nous avons réalisé une seconde étape de sélection. Après avoir incubé sur gélose Schaedler (bioMérieux) en anaérobiose pendant 48h à 37°C, ces mutants de bas niveau de résistance ont été ensemencés sur des géloses contenant des concentrations croissantes de lévofloxacine. Chaque mutant a été exposé au maximum à deux passages consécutifs sur des géloses aux concentrations de lévofloxacine croissantes. A l'issue de ces deux passages, la CMI à la lévofloxacine de chaque mutant a été mesurée selon la même technique Etest. Cette manipulation avait pour but d'étudier l'émergence de mutants de haut niveau de résistance à partir de mutants de bas niveau de résistance, après une seconde exposition aux antibiotiques.

Afin de vérifier la stabilité des mutants résistants à la lévofloxacine, chaque mutant a été mis en culture trois fois de suite sur des géloses au sang sans antibiotique et la CMI à la lévofloxacine a été vérifiée.

c. Technique d'extraction de l'ADN génomique

Pour chaque mutant, l'ADN a été extrait selon la technique Insta-Gene[®] Matrix (Laboratoire BioRad[®], Hercules, CA, USA), selon les recommandations du fournisseur.

Le principe de cette technique repose sur une lyse cellulaire par ébullition, en présence d'une matrice, qui adsorbe les débris cellulaires produits, pouvant inhiber la réaction d'amplification. Une anse de 1 µL de mutant bactérien était mise en suspension dans 1000 µL d'eau distillée stérile, dans un tube eppendorf. Après 1 minute de centrifugation à 12000 rpm, le surnageant était enlevé. 200 µL de solution Insta-Gene[®] Matrix étaient ajoutés au culot. Ce mélange était incubé à 56°C, pendant 30 minutes, puis placé dans un bain-marie à sec, à 100°C, pendant 8 minutes. Enfin, la solution était centrifugée à 12000 rpm pendant 2 minutes ; les extraits d'ADN étaient présents dans le surnageant. L'ADN était alors stocké au congélateur à - 20°C.

d. Amplification partielle des gènes *gyrA* et *parC*

Pour valider notre méthode de Polymerase Chain Reaction (PCR), nous avons réalisé une PCR initiale sur deux souches ATCC de référence : *C. acnes* ATCC 11827 et *C. acnes* ATCC 6919. Ces souches sont des isolats initialement retrouvés au niveau de la peau (137).

Nous avons réalisé deux PCR, l'une ciblant le gène *gyrA* et l'autre le gène *parC*, ces deux gènes étant principalement impliqués ou suspectés dans la résistance aux fluoroquinolones, chez les bactéries à Gram positif (105). Les gènes cibles incluaient les régions QRDR. La séquence *gyrA* amplifiée était constituée de 454 paires de bases (pb), allant de la position nucléotidique +11861 à +12297. Pour *parC*, la séquence était constituée de 477 pb, allant de la position nucléotidique +1140659 à +1140201. Ces deux positions au niveau des séquences nucléotidiques correspondent au génome entier de la souche de référence de *C. acnes* KPA171202 dont le génome a été déposé dans la banque GenBank répertorié avec le numéro NC006085 (Bruggemann Science 2004).

La figure 17, page 56, représente les deux zones QRDR des protéines GyrA et ParC pour la souche de référence ATCC 18827 de *C. acnes*, d'après la numérotation de *C. acnes*. Au sein de GyrA, les positions 101 et 105 chez *C. acnes* correspondent respectivement aux positions 83 et 87 d'après la numérotation de *E. coli*. Au sein de ParC, les positions 89 et 93 chez *C. acnes* correspondent respectivement aux positions 80 et 84 d'après la numérotation de *E. coli*.

GyrA <i>C. acnes</i> ATCC 11827	SRVVGDVMGKYHPHCD	101	105	S AIY D TLVRLAQPWAMRYKLVQGG
ParC <i>C. acnes</i> ATCC 11827	ARVVGQVMGQLHPHGD	89	93	A AIY D ALVRTAQPWAMRLPLVDGH

Figure 17 : Séquences protéiques des deux zones QRDR des protéines GyrA et ParC de la souche de référence ATCC 11827

Les amplifications par PCR ont été réalisées avec le thermocycleur 2720 (Applied Biosystem®, Villebon-sur-Yvette, France). Les échantillons contenaient chacun 13 µL de pré-mix, commercialisé par la société Proméga (Charbonnières-les-bains, France). Ce pré-mix contient les quatre désoxyribonucléotides nécessaires à l'amplification et à l'élongation, ainsi que les ions Mg²⁺, cofacteurs indispensables à la réaction de polymérisation. Il contient également l'enzyme nécessaire à la PCR : la Taq polymérase. Enfin, 0,125 µL d'amorce sens (*gyrA*-F ou *parC*-F) à 100 µM et 0,125 µL d'amorce anti-sens (*gyrA*-R ou *parC*-R) à 100 µM plus 6,75 µL d'eau étaient ajoutés. Cinq microlitres d'extrait d'ADN étaient ensuite ajoutés pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µL.

Le tableau 9 ci-dessous présente les amorces utilisées pour amplifier les gènes *gyrA* et *parC*, incluant les régions QRDR de ces gènes, chez *C. acnes*.

Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes *gyrA* et *parC*

Gènes	Noms	Amorces séquences (5'→3')	Taille (en paire de bases)	Localisation
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -F	5'-GAAGCCCGACGAGCAGAA-3'	454 pb	+11861 to +11878
	<i>gyrA</i> -R	5'-GATGTCGCGCACCATCTC-3'		+12314 to +12297
<i>parC</i>	<i>parC</i> -F	5'-AAGACGGTGGATGACGACTT-3'	477 pb	+1140659 to +1140640
	<i>parC</i> -R	5'-TGAGGGCTCGGTCTCTTTG-3'		+1140183 to +1140201

Les échantillons ont été initialement chauffés à 95°C pendant 5 minutes, suivies par 30 cycles consistant en 60 secondes à 95°C, étape de dénaturation, 60 secondes à 55°C, étape d'hybridation et 60 secondes à 72°C pour la dernière étape d'élongation. La PCR était complétée par une extension de 5 minutes à 72°C. Un témoin négatif (eau stérile) était inclus dans chaque série de PCR. Tous les produits de PCR étaient analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % et révélés sous lumière ultra-violette après passage dans le bromure d'éthidium à 0,5 % (figure 18).

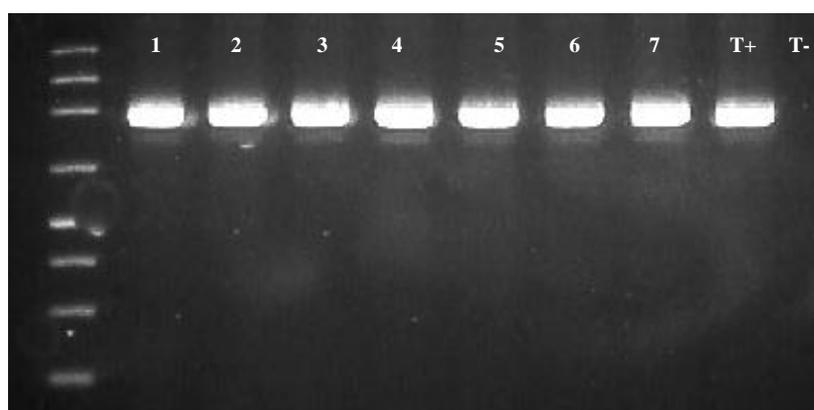


Figure 18 : Gel d'électrophorèse d'agarose à 1,5 % confirmant l'amplification du gène *gyrA* pour sept mutants

e. Purification des produits de PCR

La première étape du séquençage nucléotidique consistait à purifier les produits de PCR précédemment obtenus. La purification était réalisée avec le kit enzymatique Biolabs Exosap[®]. Le kit contient une exonucléase 1 qui dégrade les résidus d'amorces simple brin ainsi qu'une phosphatase alcaline qui permet de détruire les désoxyribonucléotides non incorporés.

Dans une plaque sécable ABGEN Thermo-fast 96[®], un microlitre d'Exosap et cinq microlitres de produits de PCR étaient mélangés. Ce mélange était placé dans le thermocycleur ABI 2720 avec le programme de purification suivant : 15 minutes à 37°C permettant l'action des deux enzymes, puis 15 minutes à 80°C pour inactiver les deux enzymes. Le mélange obtenu peut alors être conservé à -20°C.

f. Séquençage nucléotidique

La deuxième étape consistait en une réaction de séquençage réalisée à l'aide du kit de réaction de séquençage ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

Le mix contient 5 μL de produit de PCR purifié, 2 μL d'amorces M13 à 2 μM , 1 μL de mix Big Dye Terminator et 2 μL de tampon 5X.

Les amorces que nous avons utilisées sont des amorces dites universelles M13 afin d'optimiser le résultat du séquençage.

Ce mix était placé dans le thermocycleur avec le programme suivant : 25 cycles de 15 secondes à 96°C (dénaturation), puis 5 secondes à 50°C (hybridation) et enfin 3 minutes à 60°C (élongation). A la suite de ces 25 cycles, les produits de séquences étaient conservés à +4°C.

g. Purification des produits de séquençage

La troisième étape correspond à la purification des produits de séquençage. Trois cents microlitres de biogel G-50 (Pharmacia[®]) étaient introduits dans les puits d'une plaque à fond filtrant (Millipore Multiscreen[®], MAHVN4550) puis la plaque était centrifugée à 2000 rpm afin de tasser le gel. Dix microlitres de formamide étaient distribués dans la plaque de séquence. Les produits d'extension étaient déposés lentement, au milieu du gel, sans le toucher. L'ensemble était alors équilibré puis centrifugé à 2000 rpm.

La plaque pouvait alors être placée sur le séquenceur capillaire 3130XL (Applied Biosystem[®], Courtaboeuf, France).

h. Analyse des séquences

Dans un premier temps, afin d'analyser les différentes séquences des gènes cibles obtenus pour nos mutants, nous avons utilisé le logiciel Seqscape v2.5. Puis, dans un second temps, afin d'obtenir les séquences protéiques, nous avons utilisé le logiciel Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>), qui nous a donc permis de traduire nos séquences nucléotidiques en séquences d'acides aminés. Enfin, dans un troisième temps, nous avons comparé les différentes séquences des gènes *gyrA* et *parC* avec les séquences *gyrA* et *parC* de la souche de référence (GenBank accession number NC006085) grâce à des outils de bio-

informatique disponibles sur internet, (<http://www.ebi.ac.uk/>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/Blast.cgi> et <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

Par ailleurs, une comparaison avec les 104 génomes entiers de *C. acnes* disponibles sur Genbank génome a également été effectuée afin d'analyser les différentes mutations présentes au niveau des zones QRDR précédemment décrites.

Les différentes séquences nucléotidiques présentant une mutation, obtenues lors de ce travail au sein des gènes *gyrA* et *parC*, ont été déposées dans la base de données Genbank sous les numéros KX650486 à KX650495.

i. Modélisation de la protéine GyrA de *C. acnes* et évaluation de l'impact des mutations

Nous avons utilisé le logiciel Swiss-Model (<https://oligo.swissmodel.expasy.org/>) et les séquences protéiques de GyrA de *C. acnes* pour établir un modèle moléculaire tridimensionnel mettant en avant l'impact des mutations retrouvées. Nous avons choisi comme modèle de référence, la structure de la gyrase de *S. pneumoniae* mettant en avant l'interaction entre la lévofloxacine et l'ADN (PDB code: 4Z2D) qui avait été préalablement cristallisée et décrite (138).

B) Caractérisation de mécanismes de résistance secondaire avec la recherche de résistance par production de pompes d'efflux actif

Pour les mutants pour lesquels aucune mutation au sein des régions QRDR des gènes *gyrA* et *parC* n'a été trouvée, nous avons souhaité investiguer un possible mécanisme de résistance par efflux. Pour cela, nous avons utilisé en parallèle trois inhibiteurs d'efflux : le carbonyl cyanide *m*-chlorophénylhydrazone (ou CCCP, Sigma Chemical Co.[®], Saint-Quentin Fallavier, France), la réserpine (Sigma Chemical Co.[®], Saint-Quentin Fallavier, France) et la Phenyl-Arginine Beta Naphthylamide (ou PaβN, Sigma Chemical Co.[®], Saint-Quentin Fallavier, France).

Nous avons donc coulé des géloses au sang maison avec 18 mL de bouillon Mueller Hinton, additionnés de 2 mL de sang de cheval à 5% (bioMérieux[®]), de CCCP à 25 µg/mL ou de PaβN à 25 µg/mL, ou de réserpine à 20 µg/mL. Nous avons alors déterminé à nouveau la

CMI à la lévofloxacine de chaque mutant pour lesquels aucune mutation n'avait été décrite, après une sélection de nos mutants (n= 6). La détermination des CMI a été faite avec un inoculum de 1 MacFarland par gélose, par la même méthode Etest. Ces géloses ont ensuite été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 5 jours. A l'issue de l'incubation, nous avons pu comparer les CMI à la lévofloxacine obtenues avec et sans inhibiteur d'efflux. Nous avons considéré qu'une diminution de plus de deux fois la CMI à la lévofloxacine en présence d'inhibiteur était en faveur d'un mécanisme de résistance par efflux

III- Résultats

A la suite des expérimentations, nous avons obtenu de nombreux mutants : 89 au total. Ces résultats ont été obtenus grâce à un inoculum de départ contenant environ 10^8 bactéries par millilitre. Ces mutants présentaient des CMI à la lévofloxacine variables, allant de 0,094 mg/L à plus de 32 mg/L. 10 « mutants » possédaient des CMI inférieures ou égales à 0,25 mg/L, pour lesquels aucune investigation supplémentaire n'a été effectuée du fait de leur sensibilité à la lévofloxacine. Par ailleurs, nous avons pu observer deux catégories de résistance : une diminution de sensibilité à la lévofloxacine avec des CMI comprises entre 0,50 et 6 mg/L inclus et une résistance confirmée à la lévofloxacine avec des CMI de plus de 6 mg/L.

A) Fréquence de mutation

La croissance des mutants a été observée avec une fréquence de mutation de $1,6 \times 10^{-7}$ sur les géloses contenant une concentration de lévofloxacine de 4 fois la CMI et une fréquence de mutation de $3,8 \times 10^{-8}$ sur les géloses contenant une concentration de lévofloxacine de 8 fois la CMI. L'association avec les antibiotiques amoxicilline (0,064 mg/L) et rifampicine (CMI = 0,007 mg/L) entraîne une fréquence de mutation $< 10^{-10}$. Une diminution marquée de la fréquence de mutation est observée avec les associations d'antibiotiques, démontrant ainsi la possibilité d'apparition de mutations par l'utilisation de lévofloxacine seule (tableau 10, page 61).

Tableau 10 : Fréquences de mutations à la lévofloxacine seule ou en association avec de l'amoxicilline (0,064 mg/L) ou de la rifampicine (0,007 mg/L)

	Fréquence de mutation		
	Lévofloxacine	Lévofloxacine + Rifampicine (0,007 mg/L)	Lévofloxacine + Amoxicilline (0,064 mg/L)
Lévofloxacine (4xCMI)	$1,6 \times 10^{-7}$	$< 10^{-10}$	$< 10^{-10}$
Lévofloxacine (8xCMI)	$3,8 \times 10^{-8}$	$< 10^{-10}$	$< 10^{-10}$

B) Détection des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC*

Parmi nos 89 mutants, nous avons isolé : deux mutants de CMI à la lévofloxacine égale à 0,094 mg/L, deux mutants à 0,125 mg/L, deux mutants à 0,19 mg/L, quatre mutants à 0,25 mg/L, huit mutants à 0,38 mg/L, huit mutants à 0,5 mg/L, dix mutants à 0,75 mg/L, cinq mutants à 1 mg/L, trois mutants à 1,5 mg/L, quatre mutants à 2 mg/L, trois mutants à 3 mg/L, quatre mutants à 4 mg/L, deux mutants à 6 mg/L, un mutant à 8 mg/L et enfin vingt-six mutants à 32 mg/L (tableau 11, page 62). Les cinq mutants restants avaient des CMI inconnues du fait d'erreurs de manipulation (non congelés, perdus...). Le nombre de mutants obtenus à chaque CMI à la lévofloxacine est représenté sur la figure 19. La CMI à la lévofloxacine la plus fréquemment mesurée chez ces mutants résistants était donc > 32 mg/L.

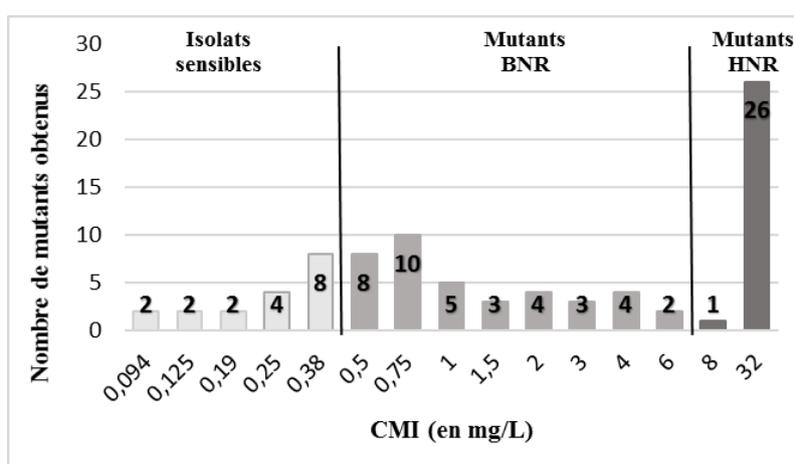


Figure 19 : Histogramme de la répartition des différents mutants dans le gène *gyrA* en fonction des CMI (en mg/L)

Tableau 11 : CMI à la lévofloxacine des mutants résistants obtenus

Légende : * = mutants perdus ou non congelés par erreur.

N°	Dénomination du mutant	CMI (mg/L)	N°	Dénomination du mutant	CMI (mg/L)	N°	Dénomination du mutant	CMI (mg/L)	N°	Dénomination du mutant	CMI (mg/L)
1	A	0,5	24	B4	*	47	19	>32	70	C15	0,38
2	B	*	25	B5	3	48	20	0,5	71	C16	0,75
3	A1	6	26	B6	1,5	49	21	1	72	C17	4
4	A2	4	27	B7	2	50	22	0,5	73	C18	>32
5	A3	0,38	28	B8	0,5	51	17	4	74	C19	6
6	A4	8	29	B9	0,5	52	15	>32	75	C20	>32
7	A5	0,25	30	B10	0,38	53	16	*	76	D1	0,19
8	A6	>32	31	B11	0,75	54	B36	>32	77	D2	0,5
9	A7	0,125	32	B12	0,75	55	C	>32	78	D3	0,38
10	A8	3	33	B13	>32	56	C1	>32	79	D4	0,75
11	A9	0,38	34	B14	0,5	57	C2	>32	80	D5	0,125
12	A10	0,38	35	B15	2	58	C3	>32	81	D6	0,25
13	A11	0,38	36	B16	1	59	C4	>32	82	D7	0,094
14	A12	0,5	37	B17	2	60	C5	>32	83	D8	>32
15	G	>32	38	B18	1	61	C6	>32	84	D9	0,25
16	A15	>32	39	B19	1	62	C7	>32	85	D10	0,75
17	A16	>32	40	B20	0,75	63	C8	1	86	D11	0,094
18	A17	3	41	B21	2	64	C9	0,75	87	D12	0,25
19	1	1,5	42	B22	0,75	65	C10	0,19	88	B34	*
20	2	>32	43	B25	>32	66	C11	>32	89	B35	*
21	B1	1,5	44	B26	>32	67	C12	0,738			
22	B2	4	45	14	>32	68	C13	0,75			
23	B3	>32	46	18	0,75	69	C14	>32			

Dans la suite de ce travail, nous focaliserons nos investigations sur les mutants présentant une CMI à la lévofloxacine supérieure ou égale à 0,50 mg/L.

C) Caractérisation moléculaire des mutants résistants

Le séquençage nucléotidique des gènes cibles *gyrA* et *parC* a permis de mettre en évidence de nouvelles données concernant *C. acnes*.

Ainsi, nous avons observé des mutations au sein du gène *gyrA* pour 40 mutants. Parmi les modifications du gène *gyrA*, nous observons des substitutions protéiques au niveau de la région dite QRDR. Dix substitutions ont pu être décrites, en cinq positions différentes, constituant donc dix génotypes de résistance différents (tableau 12, page 64).

- **En position 99**, la glycine est remplacée par une cystéine chez quatre mutants (Gly99Cys), et par l'acide aspartique chez trois mutants (Gly99Asp).
- **En position 100**, l'acide aspartique est remplacé par l'asparagine chez un seul mutant (Asp100Asn), par l'histidine (Asp100His) chez un seul mutant et par une glycine (Asp100Gly) chez un seul mutant également.
- **En position 101**, la sérine est remplacée par une leucine chez 14 mutants (Ser101Leu), c'est la mutation la plus fréquemment rencontrée.
- **En position 101** également, la serine est remplacée par un tryptophane chez cinq mutants (Ser101Trp).
- **En position 102**, l'alanine est remplacée par une proline chez cinq mutants (Ala102Pro).
- Enfin, **en position 105**, l'acide aspartique est remplacé par une histidine chez quatre mutants (Asp105His) et par une glycine chez deux mutants (Asp105Gly).

Les positions 101 et 105 dans la protéine GyrA chez *C. acnes* correspondent respectivement aux positions 83 et 87 selon la numérotation de *E. coli*.

La position la plus fréquemment mutée était la position 101 avec 14 mutants détectés.

Tableau 12 : Comparaison de la séquence protéique de la région QRDR de la protéine GyrA des 40 mutants avec leur CMI à la lévofloxacine par rapport à celle de la souche de référence ATCC 11827

Légende : * = mutants perdus ou non congelés par erreur.

			81	83
Séquence de <i>E.coli</i>			A R V V G D V I G K Y H P H G D S A V Y D T I V R M A Q P F S L R Y M L V D G Q	
Séquence de référence <i>C. acnes</i> ATCC 11827			S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q	
N° mutant	CMI LVF (mg/L)		99	101
1	B	*	S R V V G D V M G K Y H P H C	D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
2	B35	*	S R V V G D V M G K Y H P H C	D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
3	16	*	S R V V G D V M G K Y H P H C	D L A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
4	B3	>32	S R V V G D V M G K Y H P H C	D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
5	A15	>32	S R V V G D V M G K Y H P H D	D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
6	G	>32	S R V V G D V M G K Y H P H D	D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
7	A16	>32	S R V V G D V M G K Y H P H D	D S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
8	14	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G N	S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
9	17	4	S R V V G D V M G K Y H P H G H	S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
10	D10	0,75	S R V V G D V M G K Y H P H G G	S A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
11	B25	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
12	15	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
13	19	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
14	C	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
15	C1	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
16	C2	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
17	C3	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
18	C4	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
19	C5	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
20	C6	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
21	C7	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
22	C11	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
23	C14	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
24	C18	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D L	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
25	B26	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D W	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
26	A6	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D W	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
27	B34	*	S R V V G D V M G K Y H P H G D W	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
28	B13	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D W	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
29	B36	>32	S R V V G D V M G K Y H P H G D W	A I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
30	20	0,5	S R V V G D V M G K Y H P H G D S P	I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
31	22	0,5	S R V V G D V M G K Y H P H G D S P	I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
32	B18	1	S R V V G D V M G K Y H P H G D S P	I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
33	B19	1	S R V V G D V M G K Y H P H G D S P	I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
34	C9	6	S R V V G D V M G K Y H P H G D S P	I Y D T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
35	A	0,5	S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y H	T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
36	21	1	S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y H	T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
37	A1	6	S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y H	T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
38	B2	4	S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y H	T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
39	A2	4	S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y G	T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q
40	C17	4	S R V V G D V M G K Y H P H G D S A I Y G	T L V R L A Q P W A M R Y K L V Q G Q

Ces différentes mutations peuvent être classées en deux niveaux de résistance : un bas niveau de résistance et un haut niveau de résistance, en raison de leur CMI à la lévofloxacine observée (tableau 13).

Les HNR sont définis par des CMI comprises entre 6 et plus de 32 mg/L. Ce groupe est caractérisé par cinq mutations : Gly99Cys, Gly99Asp, Asp100Asn, Ser101Leu, et Ser101Trp. Il faut noter que la mutation Ser101Leu, la plus fréquente, entraîne toujours une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones.

Les BNR sont définis par des CMI à la lévofloxacine comprises entre 0,50 et 6 mg/L avec la présence de cinq mutations différentes : Asp100His, Asp100Gly, Ala102Pro, Asp105His, et Asp105Gly.

Tableau 13 : Niveau de résistance des différents mutants présentant une mutation dans le gène *gyrA* (position mutée de la protéine GyrA)

Génotype	Position	Mutation	Niveau de résistance	Nombre de mutants obtenus
1	99	G99C	HNR	4
2	99	G99D	HNR	3
3	100	D100H	BNR	1
4	100	D100N	HNR	1
5	100	D100G	BNR	1
6	101	S101L	HNR	14
7	101	S101W	HNR	5
8	102	A102P	BNR	5
9	105	D105H	BNR	4
10	105	D105G	BNR	2

Pour une investigation complète des dix génotypes *gyrA* retrouvés, nous avons alors déterminé les CMI à l'ofloxacine, à la ciprofloxacine et à la moxifloxacine sur une sélection de mutants de chaque génotype : les mutants B3, A15, 14, 17, D10, C18, B36, B19, B2, et A2 (tableau 14, page 66). Nous pouvons remarquer que les CMI à la ciprofloxacine et à l'ofloxacine sont le plus souvent semblables ou égales aux CMI à la lévofloxacine de chaque mutant. Quant aux CMI à la moxifloxacine, elles sont systématiquement plus faibles que les CMI des autres quinolones.

Tableau 14 : CMI aux différentes fluoroquinolones en fonction du génotype observé

	Nombre de mutants	Etape de sélection (µg/ml) Levofloxacin	Etest CMI (µg/ml)				Substitutions détectées dans les QRDR	
			OFL	CIP	LVF	MOX	GyrA	ParC
<i>C. acnes</i> ATCC 11827	-	-	0.19	0.25	0.25	0.064	Absence	Absence
Mutant B3	4	1	>32	>32	>32	0.75	Gly99Cys	Absence
Mutant A15	3	2	>32	1	>32	6	Gly99Asp	Absence
Mutant 14	1	2	>32	>32	>32	4	Asp100Asn	Absence
Mutant 17	1	2	3	4	4	0.5	Asp100His	Absence
Mutant D10	1	1	2	2	0.75	0.38	Asp100Gly	Absence
Mutant C18	14	2	>32	>32	>32	3	Ser101Leu	Absence
Mutant B36	5	8	>32	>32	>32	12	Ser101Trp	Absence
Mutant B19	5	1	1.5	1.5	1	0.25	Ala102Pro	Absence
Mutant B2	4	1	6	>32	4	0.5	Asp105His	Absence
Mutant A2	2	1	4	>32	4	0.5	Asp105Gly	Absence

A l'inverse, aucune mutation dans le gène *parC* n'a été retrouvée au sein des 89 mutants (figure 20).

89 93

ATCC 11827 ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 Mutant A ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 Mutant B ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 Mutant A1 ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 Mutant A2 ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 Mutant A3 ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 Mutant A4 ARVVGQVMetGQLHPHGDAAIYDALVRTAQPWAMetRLPLVDGH
 [...]

Figure 20 : Comparaison des séquences protéiques de la région QRDR de la protéine ParC de la souche de référence ATCC 11827 et de 6 mutants, d'après la numérotation de *C. acnes*

La comparaison des CMI des mutants « mutés » au niveau du gène *gyrA* et des mutants « non mutés », montre que la répartition des CMI à la lévofloxacine est assez hétérogène pour les mutants « non mutés » contrairement aux mutants « mutés » dans le gène *gyrA* où la répartition des CMI est homogène.

En effet, les mutants « mutés » ont majoritairement des CMI de HNR avec 23 mutants avec une CMI > 32 mg/L, deux mutants avec une CMI = 6 mg/L et quatre mutants avec une CMI = 4 mg/L. Les huit mutants restants étant de CMI plus faibles, à 1, 0,75, et 0,5 mg/L.

Quant aux mutants pour lesquels nous n'avons retrouvé aucune substitution nucléotidique dans le gène *gyrA*, les CMI sont réparties de façon hétérogène, avec des CMI allant de 0,094 à > 32 mg/L, correspondant à des bas et hauts niveaux de résistance.

Les répartitions du nombre de mutants en fonction des CMI mesurées à la lévofloxacine en mg/L pour les mutants « mutés ou non », sont représentées sur les histogrammes suivants (figures 21 et 22, pages 67 et 68).

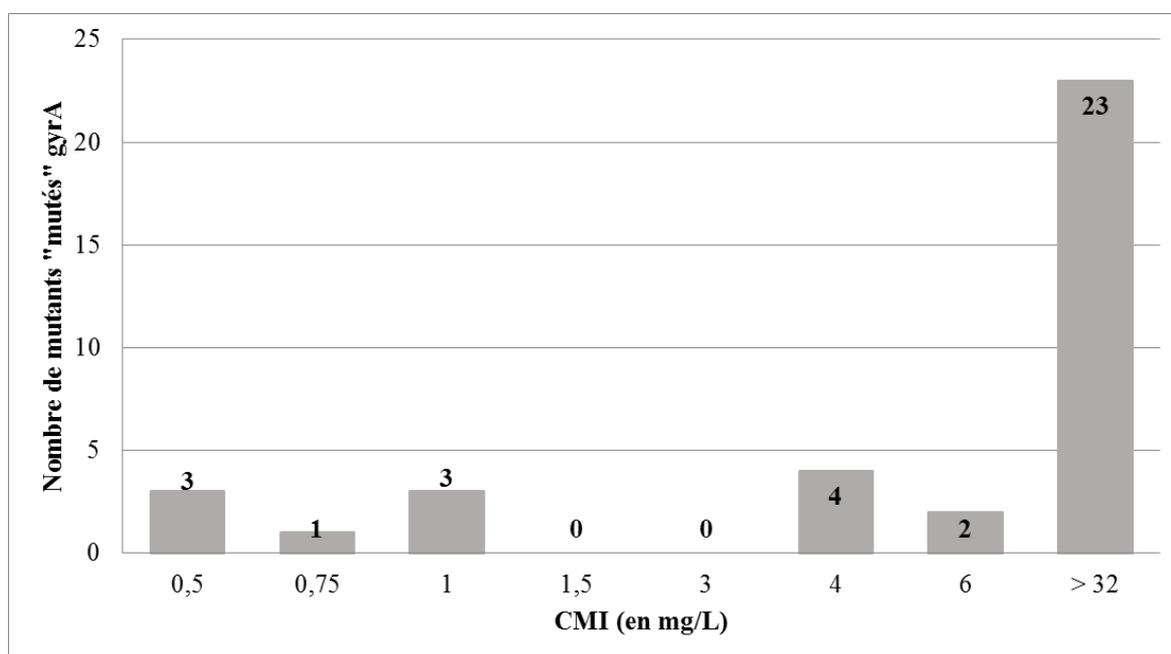


Figure 21 : Histogramme de la répartition des CMI à la lévofloxacine des mutants « mutés » dans le gène *gyrA*

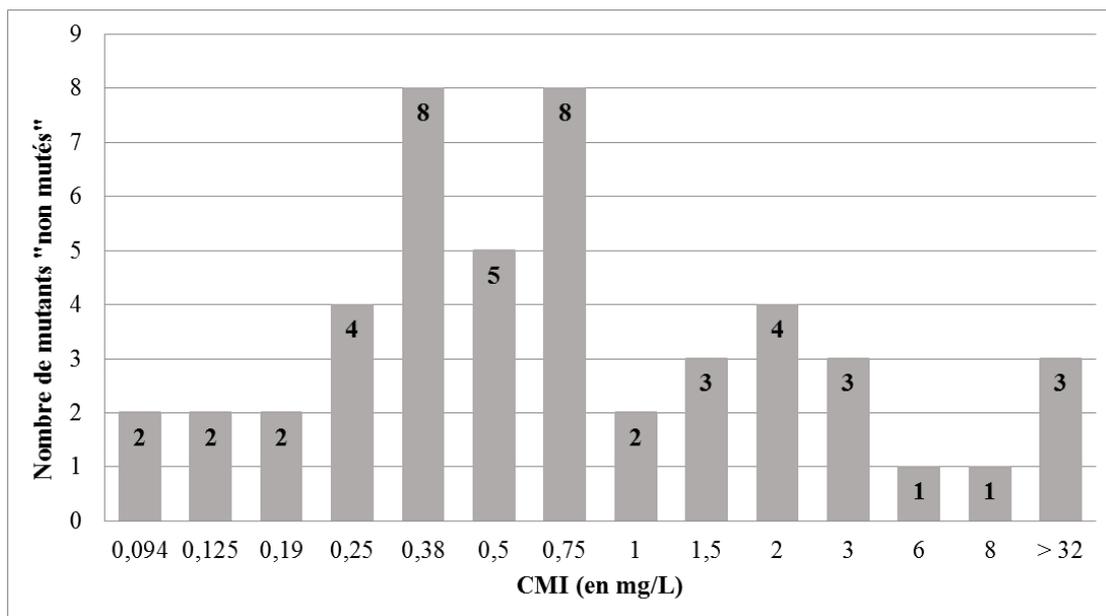


Figure 22 : Histogramme de la répartition des CMI à la lévofloxacine des mutants « non mutés » dans le gène *gyrA*

D) Sélection d'un haut niveau de résistance aux quinolones

Après mise en œuvre d'un deuxième cycle de sélection, nous avons étudié l'émergence de haut niveau de résistance à partir de mutants de bas niveau de résistance à la lévofloxacine. Nous avons ainsi sélectionné 8 mutants résistants de CMI à la lévofloxacine allant de 0,75 à 4 mg/L : B18, B1, A17, B19, A2, 17, D10 et B2. Parmi ces 8 mutants, nous avons pu obtenir des mutants de haut niveau de résistance chez 4 mutants (tableau 15, page 69).

A partir du mutant B18 (CMI à la lévofloxacine à 1 mg/L, mutation Ala102Pro), nous avons pu sélectionner un nouveau mutant B18-3, de haut niveau de résistance avec une CMI à la lévofloxacine > 32 mg/L. Chez ce mutant B18-3, il a été retrouvé une seconde substitution en position Ser101Leu. A partir du mutant B19 (CMI à la lévofloxacine à 1 mg/L, mutation A102P), nous avons pu sélectionner un nouveau mutant B19-2, de haut niveau de résistance avec une CMI à la lévofloxacine > 32 mg/L et pour lequel a été retrouvée une deuxième substitution en position Ser101Leu. A partir du mutant B2 (CMI à la lévofloxacine à 4 mg/L, mutation Asp105His), nous avons pu sélectionner un nouveau mutant B2-1, de haut niveau de résistance avec une CMI à la lévofloxacine de 8 mg/L et pour lequel a été retrouvée une seconde substitution en Gly123Cys. Enfin, pour le mutant 17 (CMI à la lévofloxacine à 4 mg/L, mutation Asp100His), nous avons pu sélectionner un nouveau mutant 17-1, de haut

niveau de résistance avec une CMI à la lévofloxacine > 32 mg/L. Chez ce mutant 17-1, nous avons retrouvé une seconde substitution en position Ser101Leu.

De manière intéressante, il faut noter que la mutation en position 101 (Ser101Leu) est la mutation la plus fréquemment retrouvée, et elle est toujours associée à un haut niveau de résistance à la lévofloxacine avec des CMI > 32 mg/L.

Tableau 15 : Passage d'un bas niveau de résistance à un haut niveau de résistance chez quatre mutants

Mutant	Mutations BNR GyrA	Mutations HNR GyrA	Séquence GyrA
Séquence de référence ATCC 11827			101 105 SRVVGDMetGKYHPHGDSAIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B18-1	A102P	A102P	SRVVGDMetGKYHPHGDSPIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B18-2	A102P	A102P	SRVVGDMetGKYHPHGDSPIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B18-3	A102P	S101L + A102P	SRVVGDMetGKYHPHGDLPIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B19-1	A102P	A102P	SRVVGDMetGKYHPHGDSPIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B19-2	A102P	S101L + A102P	SRVVGDMetGKYHPHGDLPIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B19-3	A102P	A102P	SRVVGDMetGKYHPHGDSPIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B2-1	D105H	D105H + G123C	SRVVGDMetGKYHPHGDSAIYHTLVRLAQPWAMetRYKLVQCQ
B2-2	D105H	D105H	SRVVGDMetGKYHPHGDSAIYHTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
B2-3	D105H	D105H	SRVVGDMetGKYHPHGDSAIYHTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ
17-1	D100H	D100H + S101L	SRVVGDMetGKYHPHGHLAIYDTLVRLAQPWAMetRYKLVQGQ

E) Modélisation de la zone QRDR de la protéine GyrA

Le modèle moléculaire de la protéine gyrase est représenté sur la figure 23. Nous avons choisi de superposer le modèle de la protéine gyrase A de *S. pneumoniae* (en gris) avec notre modèle moléculaire généré par le modèle SWISS (en bleu). En effet, la gyrase de *S. pneumoniae* a été sélectionnée car ce modèle incluait le complexe *gyrA*-lévofloxacine (en rouge). Enfin, l'ADN bactérien est modélisé par la double hélice d'ADN en jaune.

Notre modèle moléculaire tridimensionnel de la protéine GyrA permet ici de mettre en évidence une interaction évidente étroite entre l'hélice α de la protéine GyrA de *C. acnes*, incluant les différentes mutations (en vert) et le complexe ADN-quinolone, confirmant l'implication des mutations rapportées, dans la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* (figures 23 A et B). A noter que la mutation la plus fréquente en position 101 est très proche de la molécule antibiotique avec une distance estimée de 3,9 angströms (figure 23C).

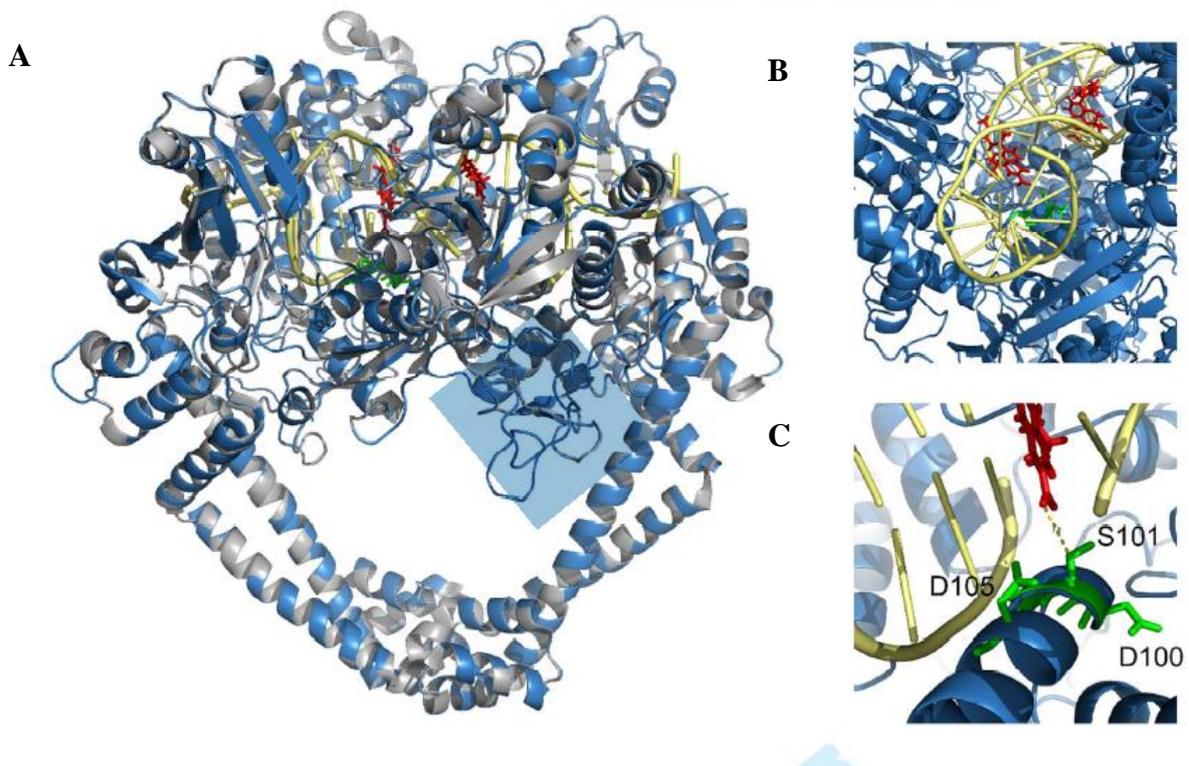


Figure 23 : Modèle tridimensionnelle de la sous unité A de la gyrase chez *C. acnes*

F) Détection d'un mécanisme d'efflux à l'aide d'inhibiteurs d'efflux

Comme décrit précédemment, nous avons obtenu 49 mutants ayant poussé sur gélose au sang contenant de la lévofloxacine, présentant des CMI à la lévofloxacine variables, mais sans aucune mutation détectée au sein des gènes *gyrA* et *parC*. Nous avons suspecté et recherché un éventuel mécanisme de résistance par efflux actif, en utilisant trois inhibiteurs de pompes d'efflux actifs : réserpine, CCCP et PaβN.

Ce mécanisme a été recherché sur six mutants sélectionnés au préalable, à savoir des mutants sans mutation détectée au sein des gènes *gyrA* et *parC* : les mutants 2, B5, B21, B6, B22 et B10.

Dans le tableau 16, les différentes CMI à la lévofloxacine obtenues pour chacun des mutants avec et sans inhibiteur d'efflux sont représentées.

Tableau 16 : Détermination de la CMI à la lévofloxacine avec et sans inhibiteurs d'efflux pour la souche ATCC 11827 et les 6 mutants résistants sans mutation dans les gènes *gyrA* et *parC*.

Mutant	CMI LVF (mg/L)	CMI LVF (mg/L)	CMI LVF (mg/L)	CMI LVF (mg/l)
	Sans inhibiteur efflux	PAβN	CCCP	Réserpine
<i>C. acnes</i> ATCC 11827	0,25	-	-	-
B10	0,5	0,5	<i>absence de croissance</i>	0,5
B22	0,75	0,25	<i>absence de croissance</i>	0,75
B6	1,5	0,75	<i>absence de croissance</i>	1,5
B21	2	1,5	<i>absence de croissance</i>	1,5
B5	3	1,5	<i>absence de croissance</i>	2
2	> 32	> 32	<i>absence de croissance</i>	>32

La présence d'un mécanisme d'efflux actif était suspectée lors de l'observation d'une réduction de la CMI d'au moins deux dilutions. L'utilisation de la PaβN a permis de mettre en évidence une réduction de la CMI à la lévofloxacine pour les mutants B22, B6 et B5. En

revanche, aucune diminution de CMI n'a pu être mise en évidence pour les mutants B10, B21 et 2. L'utilisation de la réserpine n'a mis en évidence aucune réduction de CMI significative. Quant au CCCP, aucun de nos résultats n'était exploitable en raison de l'absence de croissance à des concentrations de CCCP à 25 ou 50 mg/L.

Il faut noter qu'aucune diminution de CMI n'a été observée avec le mutant 2 hautement résistant de CMI > 32 mg/L, que ce soit avec la réserpine ou avec la PaβN.

G) Caractérisation moléculaire des souches cliniques du CHU de Nantes

Ce travail sur l'investigation des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes*, a été initié suite à l'observation au CHU de Nantes, de souches impliquées dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse, présentant une sensibilité aux fluoroquinolones, mais avec des CMI à la lévofloxacine élevées, de l'ordre de 0,25 mg/L. Six souches ont donc été sélectionnées au sein de notre collection du Service de Bactériologie-Hygiène hospitalière du CHU de Nantes : S1, S2, S3, S4, S5 et S6. Après contrôle par bandelettes Etest, ces souches présentaient des CMI allant de 0,125 à 0,38 mg/L. La caractérisation moléculaire des gènes *gyrA* et *parC* n'a détecté aucune mutation chez ces six souches cliniques (tableau 17).

Tableau 17 : Caractéristiques des six souches cliniques de *C. acnes* considérées comme de sensibilité diminuée à la lévofloxacine lors de l'antibiogramme (diffusion en milieu gélosé)

N° souche	N° de collection au CHU	CMI LVX (mg/L)	Mutation <i>gyrA</i>
S1	20044297	0,125	Non muté
S2	20073225	0,125	Non muté
S3	20081490	0,19	Non muté
S4	20089446	0,125	Non muté
S5	20104476	0,38	Non muté
S6	201310764	0,125	Non muté

Les résultats de ce travail ont été présentés, en partie, sous forme de communication affichée, lors de la RICAI 2016 (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), à Paris (page 74). Ils ont été également soumis à la revue International Journal of Antimicrobial Agents (Facteur d'impact : 4.097) sous le titre « *In vitro* emergence of fluoroquinolone resistance in *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* and molecular characterization of mutations in *gyrA* gene ».



Poster n°
053

Emergence in vitro de la résistance aux fluoroquinolones chez *Propionibacterium acnes* : caractérisation moléculaire des mutations du gène *gyrA*



E. Takoudju¹, A. Guillouzouic¹, S. Kambarev², F. Pécorari², S. Corvec^{1,3,4}

¹Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière, Pôle de Biologie-Pathologie, CHU de Nantes, France, ²Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes INSERM U892 - CNRS 6299, CCINA Nantes, Equipe n°13 : Nuclear Oncology, ³Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes INSERM U892 - CNRS 6299, CCINA Nantes, Equipe n°2 : Clinical and translational research in skin cancer, ⁴Membres du CRIOGO

Introduction

Aujourd'hui, les infections sur matériel documentées à *Propionibacterium acnes* (PA) sont de plus en plus fréquentes. Elles sont le plus souvent traitées par une association de fluoroquinolones et de rifampine, dont nous avons déjà rapporté la résistance (Furustrand et al, 2013). Des concentrations minimales inhibitrices de 0,25mg/L à la lévofloxacine (LVX) sont observées mais la résistance est peu investiguée.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'émergence in vitro de la résistance à la LVX et de caractériser les mutations impliquées dans le gène *gyrA*.

Matériels et Méthodes

La souche de PA ATCC11827 (CMI LVF=0,25 mg/L) a été utilisée. La fréquence de mutation a été déterminée après inoculation de 10⁸ PA sur des géloses au sang contenant des concentrations de 2 à 128 fois la CMI, incubées 7 jours en anaérobiose à 35°C. L'émergence d'un haut niveau de résistance a aussi été étudiée à partir des mutants de bas niveau après une seconde exposition à la LVX. Pour les mutants résistants, les gènes *gyrA* et *parC* ont été séquencés et comparés à la séquence de référence de PA.

Résultats

- La fréquence de mutation était respectivement de 2.1 cfu×10⁻⁸ (8×MIC) and 13.5 cfu×10⁻⁸ (4×MIC). L'association de la LVX avec d'autres antibiotiques permet de réduire la survenue de mutation (Tableau 1).
- Une résistance de bas ou de haut niveau à la LVX était observée chez les différents mutants. Les CMI variaient entre 0,75 et >32 mg/L et étaient stables après trois subcultures.
- 87 mutants ont été étudiés dont 40 avec une mutation dans le gène *gyrA*. 10 génotypes différents ont pu être mis en évidence présentant (Tableau 2) :
 - soit un haut niveau de résistance : Gly-99→Cys (n=4), Gly-99→Asp (n=3), Asp-100→Asn (n=1), Ser-101→Leu (n=14), Ser-101→Trp (n=5)
 - soit un bas niveau de résistance : Asp-100→His (n=1), Asp-100→Gly (n=1), Ala-102→Pro (n=5), Asp-105→His (n=4), Asp-105→Gly (n=2).
- La substitution 101 entraîne toujours une résistance de haut niveau.
- Aucune mutation n'a été trouvée dans le gène *parC*.
- Une sélection de bas niveau de résistance a été observé pour les mutants de faible CMI avec l'obtention de double mutants de haut niveau de résistance de CMI > 32 mg/L (Tableau 3).

Tableau 1 : Fréquences de mutation de PA ATCC 11827 après 5 jours d'incubation avec de la LVX seule ou en association

Antibiotic	Mutation frequency		
	Levofloxacin alone	Levofloxacin + rifampin (0.5XMIC)	Levofloxacin + amoxicillin (0.5XMIC)
Levofloxacin (4XMIC)	8 10 ⁻⁹	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
Levofloxacin (8XMIC)	2.1 10 ⁻⁹	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰

Tableau 2 : Sensibilité des mutants de PA ATCC 11827 après un ou deux passages sur des géloses contenant différentes concentrations de LVX

Strain name	Number of mutant	Step of selection µg/ml Levofloxacin	Etest for MIC (µg/ml)				Substitution detected in QRDR regions	
			Ofloxacin	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Moxifloxacin	<i>gyrA</i> gene	<i>parC</i> gene
ATCC 11827			0.19	0.25	0.12	0.064	None	None
Mutant B3	4	>32	>32	>32	6	0.75	Gly99Cys	None
Mutant A15	3	2	>32	1	>32	6	Gly99Asp	None
Mutant 14	1	2	>32	>32	>32	4	Asp100Asn	None
Mutant 17	1	2	3	4	4	0.5	Asp100His	None
Mutant D10	1	1	2	2	0.75	0.38	Asp100Gly	None
Mutant C18	14	2	>32	>32	>32	3	Ser101Leu	None
Mutant B36	5	8	>32	>32	>32	12	Ser101Trp	None
Mutant B19	5	1	1.5	1.5	1	0.25	Ala102Pro	None
Mutant B2	4	1	6	>32	4	0.5	Asp105His	None
Mutant A2	2	1	4	>32	4	0.5	Asp105Gly	None

Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques de la souche ATCC 11827 et des mutants résistants obtenus

Strain	Mutant selection after				
	First passage		Second passage		
	Levofloxacin MIC (µg/ml)	Genotype observed	Strain	Levofloxacin MIC (µg/ml)	Genotype observed
Mutant B	0.25	Gly99Cys			
Mutant 17	4	Asp100His	Mutant 17.1	>32	Asp100His+Ser101Leu
Mutant D10	0.75	Asp100Gly			
Mutant B18	1	Ala102Pro	Mutant B18.3	>32	Ala102Pro + Ser101Leu
Mutant B19	1	Ala102Pro	Mutant B19.2	>32	Ala102Pro + Ser101Leu
Mutant B2	4	Asp105His	Mutant B2.1	8	Asp105His+Gly105Cys
Mutant A2	4	Asp105Gly			

Conclusion

Notre étude confirme et précise les mutations dans le gène *gyrA*, impliquées dans la résistance à la LVX chez PA. La CMI augmente passant de la sensibilité à la résistance de bas ou de haut niveau. Cette dernière s'avère stable et associée exclusivement à des mutations dans le gène *gyrA*. 6 positions différentes donnent lieu à dix génotypes différents.

Le passage d'un bas à haut niveau de résistance se fait majoritairement par la sélection de la mutation en position 101.

Enfin, certains mutants ne présentent pas de mutation dans les QRDR, suggérant l'existence d'autres mécanismes de résistance.

Contact : stephane.corvec@chu-nantes.fr

IV- Discussion

Les infections à *C. acnes* sont de plus en plus fréquemment décrites aujourd'hui (34). La pathologie la plus connue dans laquelle *C. acnes* est impliquée est l'acné (5). Néanmoins, les infections à *C. acnes* sur matériel, notamment les infections ostéo-articulaires sur prothèse sont de plus en plus rapportées dans la littérature (3). Cette bactérie demeure généralement sensible aux antibiotiques mais depuis les années 80, des souches résistantes aux antibiotiques, notamment aux macrolides et cyclines ont été décrites (5, 22, 81).

L'objectif de nos travaux était de caractériser pour la première fois au niveau moléculaire les mutations pouvant être impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* après sélection *in vitro* à partir d'une souche de référence. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes de résistance impliqués chez cette bactérie pourrait potentiellement permettre de retenir des facteurs pronostiques d'évolution ou d'aide à la prise en charge thérapeutique.

Notre travail fait suite à plusieurs observations faites en parallèle. En effet, la rifampicine est une molécule largement utilisée pour traiter les infections ostéo-articulaires essentiellement en raison de son efficacité démontrée sur le biofilm formé par *C. acnes in vitro* et de son efficacité démontrée *in vivo* sur modèle animal (11). Au CHU de Nantes, le traitement clé relai oral d'une infection ostéo-articulaire demeure l'association rifampicine/lévofloxacine. Cette association à base de lévofloxacine permet de prévenir la sélection de mutants résistants. Cependant, il a été décrit récemment des isolats cliniques de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (8, 13–15, 135), avec une description du mécanismes de résistance chez de rares souches cliniques (12). C'est pourquoi, dans ce contexte, nous avons initié ces travaux sur l'investigation de l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones *in vitro*, ainsi que sa caractérisation moléculaire.

Chez les bactéries à Gram positif, la résistance aux quinolones est généralement due à des mutations survenant dans les régions QRDR des gènes *gyrA* (et *gyrB*) codant pour les topoisomérases II mais surtout des gènes *parC* (et *parE*) codant pour les topoisomérases IV (111). Jusqu'en 2016, la caractérisation moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones n'avait jamais été étudiée chez *C. acnes*. En mai 2016, une équipe japonaise a montré que la résistance aux quinolones de cinq souches cliniques isolées de lésions acnéiques était due à des substitutions au sein de la protéine GyrA : une substitution Ser101Leu pour quatre

souches et une substitution Asp105Gly pour une souche (12). Aucune mutation n'avait été détectée au sein des gènes *gyrB*, *parC*, et *parE*.

Au cours de notre travail, nous avons pu compléter ces observations en démontrant que la résistance aux fluoroquinolones survient rapidement avec une fréquence de mutation égale à $1,6 \times 10^{-7}$ cfu à 4 fois la CMI et à $3,8 \times 10^{-8}$ cfu à 8 fois la CMI. Cette fréquence de mutation chez *C. acnes* est comparable à ce qui a été décrit chez d'autres bactéries à Gram positif. En effet, chez *S. aureus*, des fréquences de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-11} chez des souches de SARM ont été observées et des fréquences de mutation de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-10} chez des souches de SASM (139, 140). Chez les streptocoques, la fréquence de mutation aux quinolones est de l'ordre de 10^{-8} chez le pneumocoque et de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} pour les streptocoques du groupe *viridans* (112, 141). Enfin, chez *Enterococcus faecium*, Lopez *et al.* ont décrit une fréquence de mutation égale à 3×10^{-9} (142). Une étude réalisée au CHUV de Lausanne avait montré la possible émergence de la résistance à la rifampicine chez *C. acnes*. Elle rapportait que la fréquence de mutation à la rifampicine était diminuée comparée aux autres espèces bactériennes, potentiellement en raison de sa croissance lente (10). Dans notre travail, l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* ne semble pas être affectée par sa croissance.

A partir des mutants obtenus, nous avons décrit dix substitutions protéiques dans la région QRDR de la protéine GyrA, en cinq positions différentes : Gly99Cys, Gly99Asp, Asp100Asn, Asp100Gly, Asp100His, Ser101Leu, Ser101Trp, Ala102Pro, Asp105His, et Asp105Gly, selon la numérotation de *C. acnes* (Gly81Cys, Gly81Asp, Asp82Asn, Asp82Gly, Asp82His, Ser83Leu, Ser83Trp, Ala84Pro, Asp87HIS, and Asp87Gly selon la numérotation de *E. coli*). Ces substitutions sont connues pour être impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones chez d'autres espèces bactériennes. En effet, par exemple chez *E. coli*, la résistance aux fluoroquinolones est liée à des substitutions protéiques en positions Ser83Leu, Asp87Asn, Asp87Tyr dans la protéine GyrA, et Ser80Ile, Glu84Glu mais également Glu84Val dans la protéine ParC (143). Les substitutions en positions 81, 82, 83, 84 et 87 dans GyrA, selon la numérotation de *E. coli*, ont également été décrites chez d'autres espèces bactériennes à Gram positif ou négatif, telles que *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *A. schaalii*, *C. difficile* ou *C. striatum* (96, 100, 103, 105, 106, 144, 145). A l'image de ce qui a été rapporté pour la résistance à la rifampicine chez *C. acnes*

ou *S. aureus* (96, 99, 109), nous avons observé des mutations qui conduisent à un bas niveau de résistance avec les substitutions Asp100His, Asp100Gly, Ala102Pro, Asp105His et Asp105Gly. A l'inverse, des mutations confèrent un haut niveau de résistance aux quinolones : Gly99Cys, Gly99Asp, Asp100Asn, Ser101Leu, et Ser101Trp (10). Par ailleurs, il faut noter que la substitution Ser101Leu de la protéine GyrA (Ser83Leu d'après la numérotation de *E. coli*) est la mutation la plus fréquemment rencontrée (n= 14 mutants) et elle confère systématiquement un haut niveau de résistance (CMI à la lévofloxacine > 32 mg/L). Chez *P. aeruginosa*, la mutation la plus fréquente est également en position 83 avec une substitution d'une thréonine avec une isoleucine (144). C'est une position qui a également été décrite chez *Actinotignum schaalii*, *C. difficile* ou encore *M. tuberculosis* (105, 125, 145). L'ensemble des données expérimentales ainsi que les données de la littérature conduisent à considérer que cette position constitue un « hot spot ». De plus, lors de la sélection à partir de mutants résistants de bas niveau, nous avons pu mettre en évidence que cette mutation était celle qui était la plus souvent observée à l'issue de cette étape.

Le modèle tridimensionnel de la sous-unité A de la gyrase de *C. acnes* en comparaison avec celle du pneumocoque a mis en évidence l'interaction de ces substitutions protéiques, en particulier Ser101Leu et Asp105Gly, avec le complexe ADN-quinolone.

L'exposition répétée des mutants à la lévofloxacine a permis ici de créer des mutants de haut niveau de résistance de CMI > 32 mg/L. Le séquençage des gènes *gyrA* et *parC* montre la présence de doubles mutants avec l'acquisition d'une substitution en position Ser101Leu, confirmant de nouveau le « hot spot » de résistance. Cette donnée démontre l'évolution possible et le passage d'un bas de niveau de résistance aux quinolones à un haut niveau de résistance, en présence répétée de quinolones, avec un possible retentissement clinique. En effet, cela souligne le risque potentiel d'échec thérapeutique d'un traitement par quinolones dans des infections à *C. acnes*, si un bas niveau de résistance à la lévofloxacine n'était pas détecté.

Bien que chez plusieurs espèces bactériennes à Gram positif, la résistance aux fluoroquinolones a pour cible préférentielle la région QRDR du gène *parC*, nous n'avons pas détecté de mutation au sein de ce gène cible. Par exemple, Cattoir *et al.* ont récemment décrit une substitution en position Ser80Phe de la protéine ParC chez *Alloscardovia omnicolens*, un pathogène émergent urinaire (146). De même, chez *S. pneumoniae* des mutations au sein du gène *parC* ont été décrites (103). A l'opposé de ces espèces bactériennes, la résistance aux fluoroquinolones par mutation dans la région QRDR du gène *parC* ne semble pas être la

première cible de résistance aux quinolones chez *C. acnes*, en utilisant comme marqueur la lévofloxacine. *C. acnes*, comme un autre bacille à Gram positif anaérobie préférentielle évolue vers la résistance aux fluoroquinolones par mutations dans les ADN-gyrases : *A. schaalii* (105).

Nous avons également testé différentes générations de quinolones sur chacun de nos dix génotypes retrouvés, avec dans l'ordre : l'ofloxacine, la ciprofloxacine, la lévofloxacine et la moxifloxacine. Il est intéressant de noter que les CMI les plus faibles sont toujours observées avec la quinolone de dernière génération à savoir la moxifloxacine. Les CMI mesurées sont le plus souvent similaires pour chaque quinolone ou diminuent entre l'ofloxacine et la moxifloxacine. Nous pouvons observer deux exceptions avec deux mutants de résistance de haut niveau isolée à la ciprofloxacine de CMI > 32 mg/L. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les substitutions nucléotidiques au sein du gène *gyrA* jouent différents rôles dans la résistance aux fluoroquinolones, comme il a été démontré chez les entérobactéries vis-à-vis de la ciprofloxacine et de la lévofloxacine (147). De plus, le risque de sélectionner des résistances aux fluoroquinolones dépend aussi de la densité bactérienne, et de la concentration en fluoroquinolones au niveau du site de l'infection mais aussi du potentiel mutagène de la fluoroquinolone et de la combinaison d'antibiotiques utilisée (148).

Au CHU de Nantes, les infections ostéo-articulaires à *C. acnes* font souvent appel à une association d'antibiotiques lévofloxacine et rifampicine. Cette association constitue une excellente alternative *per os* pour les infections sur prothèse (149). Néanmoins, le recours aux quinolones dans les infections à *C. acnes* pourrait amener à des échecs thérapeutiques. En effet, de nombreux auteurs décrivent aujourd'hui des souches cliniques de *C. acnes* de bas ou de haut niveau de résistance aux fluoroquinolones (8, 13–15, 135). Au Japon, où les fluoroquinolones sont utilisées dans le traitement de l'acné, Nakase *et al.* ont rapporté 4,3 % de résistance (135). En Inde, un taux de résistance à la ciprofloxacine de 3% a été décrit, avec des CMI > 8 mg/L (13). Au Mexique, le taux de résistance est similaire avec 4 % de souches résistantes (8). Et enfin, en Egypte, l'équipe de Hassan *et al.* a décrit 14,3 % de résistance (14). Ces différentes études confirment donc l'émergence de résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* et la survenue possible d'échecs thérapeutiques dans les infections sur matériel telles que les infections ostéo-articulaires, cardiovasculaires ou encore neurologiques. Malgré différentes tentatives, nous n'avons pas pu récupérer les isolats de ces études pour différentes raisons (conservation, transfert, désir du protocole, etc). Il aurait été pertinent de vérifier les

modifications présentes chez ces isolats : Quelles cibles étaient impliquées ? L'existence de doubles mutants ? L'implication de systèmes d'efflux actifs ?

De même, la recherche de mutations au sein des régions QRDR des gènes *gyrA* et *parC* pour nos six souches cliniques de « sensibilité diminuée aux quinolones », de la souchothèque du CHU de Nantes, n'a pas permis de mettre en évidence de mutation ponctuelle. Enfin, la comparaison des génomes disponibles sur internet a confirmé l'absence de mutations dans les régions QRDR soulignant ainsi l'émergence de ce phénomène.

Pour quelques mutants résistants à la lévofloxacine (n= 49 mutants), aucune mutation dans les régions QRDR des gènes *gyrA* et *parC* n'a été détectée. La question de la présence d'un mécanisme de résistance par production de pompes d'efflux actif s'est alors posé. En effet, de nombreuses pompes d'efflux actif sont décrites chez les bactéries à Gram positif permettant la réduction de la concentration intra-bactérienne de l'antibiotique : notamment les pompes MFS, les pompes ABC ou encore les pompes SMR (118, 128). L'utilisation de CCCP, PaβN et de réserpine, semble mettre en évidence une réduction de CMI de plus de deux dilutions, notamment avec la PaβN. Ce résultat correspond donc aux données rapportées avec la PaβN, puisque cette molécule est connue pour avoir un effet sur les pompes d'efflux, avec une action sur les fluoroquinolones, notamment chez les bactéries à Gram négatif (150). Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse par l'analyse par séquençage du génome entier de ces mutants de *C. acnes*.

V- Conclusions et Perspectives

Pour la première fois, notre étude s'est intéressée à la caractérisation moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* après sélection *in vitro* avec la lévofloxacine. Nous avons montré que la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* peut facilement être sélectionnée *in vitro*. Nous avons décrit dix génotypes différents avec des substitutions nucléotidiques uniquement au sein du gène *gyrA* en cinq positions différentes. Nous avons montré la possibilité de sélection de doubles mutants, avec apparition systématique de la substitution en position 101 dont le modèle de représentation a démontré la proximité entre cet acide aminé et l'antibiotique. Pour la première fois, nous avons mis en avant l'existence d'un éventuel mécanisme de résistance par production de pompes d'efflux pouvant être impliqué dans la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes*.

L'impact de la résistance aux fluoroquinolones chez *C. acnes* en clinique est encore inconnu. L'émergence de la résistance aux fluoroquinolones dans les biofilms formés par *C. acnes* nécessiterait encore de nouvelles études, notamment en raison des conséquences thérapeutiques possibles dans le traitement des infections ostéo-articulaires sur prothèses, les endocardites sur valves prothétiques ou encore les infections neurochirurgicales. Il serait donc intéressant de tester nos différents mutants dans un modèle d'infection animal adapté à *C. acnes*, pour investiguer l'impact des mutations responsables de la résistance à bas niveau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer AI, Gaborit C, Rosset P, et al. Surveillance hospitalière des infections ostéo-articulaires en France: analyse des données médico-administratives, PMSI 2008. Bull Epidémiologique Hebd. 2013;4–5.
2. Titécat M, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Migaud H, Courcol R-J, et al. Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. Orthop Traumatol Surg Res OTSR. oct 2013;99(6):653-8.
3. Illiaquer M, Corvec S, Touchais S, Boutoille D, Asseray N, Juvin M-E, et al. Anaerobes isolated from bone and joint infections and their susceptibility to antibiotics. J Infect. 1 nov 2012;65(5):473-5.
4. Walter G, Vernier M, Pinelli PO, Million M, Coulange M, Seng P, et al. Bone and joint infections due to anaerobic bacteria: an analysis of 61 cases and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. août 2014;33(8):1355-64.
5. Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. Médecine Mal Infect. juin 2014;44(6):241-50.
6. *Propionibacterium acnes* - Infectious Disease and Antimicrobial Agents [Internet]. [cité 19 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.antimicrobe.org/b225.asp>
7. Van Valen R, de Lind van Wijngaarden RAF, Verkaik NJ, Mokhles MM, Bogers AJJC. Prosthetic valve endocarditis due to *Propionibacterium acnes*. Interact Cardiovasc Thorac Surg. juill 2016;23(1):150-5.
8. González R, Welsh O, Ocampo J, Hinojosa-Robles RM, Vera-Cabrera L, Delaney ML, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in northern Mexico. Int J Dermatol. sept 2010;49(9):1003-7.
9. Luk N-MT, Hui M, Lee H-CS, Fu LH, Liu ZH, Lam LY, et al. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV. janv 2013;27(1):31-6.

10. Furustrand Tabin U, Trampuz A, Corvec S. In vitro emergence of rifampicin resistance in *Propionibacterium acnes* and molecular characterization of mutations in the *rpoB* gene. *J Antimicrob Chemother.* mars 2013;68(3):523-8.
11. Furustrand Tabin U, Corvec S, Betrisey B, Zimmerli W, Trampuz A. Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm *in vitro* and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2012;56(4):1885-91.
12. Nakase K, Sakuma Y, Nakaminami H, Noguchi N. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Propionibacterium acnes* caused by amino acid substitutions of DNA gyrase but not DNA topoisomerase IV. *Anaerobe.* 26 oct 2016;42:166-71.
13. Sardana K, Gupta T, Kumar B, Gautam HK, Garg VK. Cross-sectional Pilot Study of Antibiotic Resistance in *Propionibacterium acnes* Strains in Indian Acne Patients Using 16S-RNA Polymerase Chain Reaction: A Comparison Among Treatment Modalities Including Antibiotics, Benzoyl Peroxide, and Isotretinoin. *Indian J Dermatol.* févr 2016;61(1):45-52.
14. Attallah DAEA. Antibiotic Susceptibility Patterns of *Propionibacterium acnes* Isolated from Acne Vulgaris in Assiut University Hospitals, Egypt. *ResearchGate.* 1 oct 2015;Volume 24(No. 4):67-72.
15. Biswal I, Gaiind R, Kumar N, Mohanty S, Manchanda V, Khunger N, et al. In vitro antimicrobial susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. *J Infect Dev Ctries.* 31 oct 2016;10(10):1140-5.
16. Taxonomy browser (*Propionibacteriaceae*) [Internet]. [cité 19 janv 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=31957>
17. Moore WEC, Cato EP. Validity of *Propionibacterium acnes* (gilchrist) Douglas and Gunter Comb. Nov. *J Bacteriol.* 4 janv 1963;85(4):870-4.
18. Bojar RA, Holland KT. Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clin Dermatol.* oct 2004;22(5):375-9.
19. Scholz CFP, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed

- novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol. nov 2016;66(11):4422-32.
20. Yee AL, Maillard M-B, Roland N, Chuat V, Leclerc A, Pogačić T, et al. Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. Int J Food Microbiol. 17 nov 2014;191:60-8.
21. Aubin GG, Bémer P, Kambarev S, Patel NB, Lemenand O, Caillon J, et al. *Propionibacterium namnetense* sp. nov., isolated from a human bone infection. Int J Syst Evol Microbiol. sept 2016;66(9):3393-9.
22. Achermann Y, Goldstein EJC, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. Clin Microbiol Rev. juill 2014;27(3):419-40.
23. J SE and K. [Morphology of bacteria belonging to *Propionibacterium* genus in scanning and transmission electron microscopy]. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 19 juill 2016]. Disponible sur: <https://nomade.etu.univ-nantes.fr/+CSCO+00756767633A2F2F6A6A6A2E61706F762E61797A2E6176752E746269+//pubmed/6649954>
24. Document sans titre [Internet]. [cité 19 juill 2016]. Disponible sur: <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=130>
25. Csukás Z, Banizs B, Rozgonyi F. Studies on the cytotoxic effects of *Propionibacterium acnes* strains isolated from cornea. Microb Pathog. mars 2004;36(3):171-4.
26. Wang B, Toyé B, Desjardins M, Lapner P, Lee C. A 7-year retrospective review from 2005 to 2011 of *Propionibacterium acnes* shoulder infections in Ottawa, Ontario, Canada. Diagn Microbiol Infect Dis. févr 2013;75(2):195-9.
27. Corvec S, Luchetta J, Aubin GG. Is hemolysis a clinical marker of *Propionibacterium acnes* orthopedic infection or a phylogenetic marker? Am J Orthop Belle Mead NJ. mars 2015;44(3):E61-62.
28. McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. J Med Microbiol. févr 2008;57(Pt 2):218-24.

29. Brüggemann H. Insights in the Pathogenic Potential of *Propionibacterium acnes* From Its Complete Genome. *Semin Cutan Med Surg.* juin 2005;24(2):67-72.
30. Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol.* déc 2005;153(6):1105-13.
31. Lodes MJ, Secrist H, Benson DR, Jen S, Shanebeck KD, Guderian J, et al. Variable expression of immunoreactive surface proteins of *Propionibacterium acnes*. *Microbiol Read Engl.* déc 2006;152(Pt 12):3667-81.
32. Brzuszkiewicz E, Weiner J, Wollherr A, Thürmer A, Hüpeden J, Lomholt HB, et al. Comparative Genomics and Transcriptomics of *Propionibacterium acnes*. *PLoS ONE* [Internet]. 27 juin 2011 [cité 22 juill 2016];6(6). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3124536/>
33. Holmberg A, Lood R, Mörgelin M, Söderquist B, Holst E, Collin M, et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* août 2009;15(8):787-95.
34. Portillo ME, Corvec S, Borens O, Trampuz A. *Propionibacterium acnes*: an underestimated pathogen in implant-associated infections. *BioMed Res Int.* 2013;2013:804391.
35. Hassanzadeh P, Bahmani M, Mehrabani D. BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN ACNE VULGARIS: AN IN VITRO STUDY. *Indian J Dermatol.* 2008;53(3):122-4.
36. Auffret N. [Pathophysiological advances in acne]. *Ann Dermatol Venereol.* nov 2010;137 Suppl 2:S52-56.
37. Higaki S, Nakamura M, Kitagawa T, Morohashi M, Yamagishi T. Effect of lipase activities of *Propionibacterium granulosum* and *Propionibacterium acnes*. *Drugs Exp Clin Res.* 2001;27(5-6):161-4.
38. Lheure C, Grange PA, Ollagnier G, Morand P, Désiré N, Sayon S, et al. TLR-2 Recognizes *Propionibacterium acnes* CAMP Factor 1 from Highly Inflammatory Strains. *PloS One.* 2016;11(11):e0167237.

39. Bossard DA, Ledergerber B, Zingg PO, Gerber C, Zinkernagel AS, Zbinden R, et al. Optimal Length of Cultivation Time for Isolation of *Propionibacterium acnes* in Suspected Bone and Joint Infections Is More than 7 Days. *J Clin Microbiol.* déc 2016;54(12):3043-9.
40. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet Lond Engl.* 24 juill 2004;364(9431):369-79.
41. Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR, et al. Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Shoulder Infection by Use of Implant Sonication. *J Clin Microbiol.* juin 2009;47(6):1878-84.
42. Hischebeth GTR, Randau TM, Buhr JK, Wimmer MD, Hoerauf A, Molitor E, et al. Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) multiplex PCR system in diagnosing periprosthetic joint infection. *J Microbiol Methods.* févr 2016;121:27-32.
43. Prieto-Borja L, Rodriguez-Sevilla G, Auñon A, Pérez-Jorge C, Sandoval E, Garcia-Cañete J, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR (Unyvero i60(®)) designed for the diagnosis of bone and joint infections using prosthetic-joint sonication. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 18 oct 2016;
44. Marín M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, et al. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* mars 2012;50(3):583-9.
45. Banzon JM, Rehm SJ, Gordon SM, Hussain ST, Pettersson GB, Shrestha NK. *Propionibacterium acnes* endocarditis: a case series. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2 janv 2017;
46. Delahaye F, Fol S, Célarde M, Vandenesch F, Beaune J, Bozio A, et al. [*Propionibacterium acnes* infective endocarditis. Study of 11 cases and review of literature]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* déc 2005;98(12):1212-8.
47. Herren T, Middendorp MA, Zbinden R. Quantification of the antibody response to *Propionibacterium acnes* in a patient with prosthetic valve endocarditis: – a case report. *BMC Infect Dis [Internet].* 29 avr 2016 [cité 26 juill 2016];16. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4850718/>

48. Tattevin P, Watt G, Revest M, Arvieux C, Fournier P-E. Update on blood culture-negative endocarditis. *Médecine Mal Infect.* janv 2015;45(1-2):1-8.
49. Ajdic D, Zoghbi Y, Gerth D, Panthaki ZJ, Thaller S. The Relationship of Bacterial Biofilms and Capsular Contracture in Breast Implants. *Aesthet Surg J.* mars 2016;36(3):297-309.
50. Odunukan OW, Masannat F, Baka JJ. *Propionibacterium Acnes* Brain Abscess in an Immunocompetent Man in the Absence of Prior Neurosurgery. *S D Med J S D State Med Assoc.* févr 2016;69(2):71-3.
51. Yakhkind A, Yacoub HA, Grove J, Varrato JD, Castaldo JE. Pathogenesis, clinical course and neuro-radiological signs of *Propionibacterium acnes* cerebritis: Case report and literature review. *Hosp Pract* 1995. 2015;43(2):128-36.
52. Chung S, Kim JS, Seo SW, Ra EK, Joo S-I, Kim SY, et al. A case of brain abscess caused by *Propionibacterium acnes* 13 months after neurosurgery and confirmed by 16S rRNA gene sequencing. *Korean J Lab Med.* avr 2011;31(2):122-6.
53. Al-Mezaine HS, Al-Assiri A, Al-Rajhi AA. Incidence, clinical features, causative organisms, and visual outcomes of delayed-onset pseudophakic endophthalmitis. *Eur J Ophthalmol.* oct 2009;19(5):804-11.
54. Fox GM, Joondeph BC, Flynn HW, Pflugfelder SC, Roussel TJ. Delayed-onset pseudophakic endophthalmitis. *Am J Ophthalmol.* 15 févr 1991;111(2):163-73.
55. Rienmüller A, Borens O. *Propionibacterium* prosthetic joint infection: experience from a retrospective database analysis. *Eur J Orthop Surg Traumatol Orthop Traumatol.* mai 2016;26(4):429-34.
56. Kadler BK, Mehta SS, Funk L. *Propionibacterium acnes* infection after shoulder surgery. *Int J Shoulder Surg.* déc 2015;9(4):139-44.
57. Sampedro MF, Piper KE, McDowell A, Patrick S, Mandrekar JN, Rouse MS, et al. Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phylotypes associated with orthopedic implants. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juin 2009;64(2):138-45.

58. Hahn F, Zbinden R, Min K. Late implant infections caused by *Propionibacterium acnes* in scoliosis surgery. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc.* oct 2005;14(8):783-8.
59. Mojzis P, Studený P, Piñero DP. Management of late postoperative capsular block syndrome with accumulation of *Propionibacterium acnes*. *Can J Ophthalmol J Can Ophtalmol.* juin 2014;49(3):e76-77.
60. Rieger UM, Mesina J, Kalbermatten DF, Haug M, Frey HP, Pico R, et al. Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants. *Br J Surg.* mai 2013;100(6):768-74.
61. Dhaliwal DK, Farhi P, Eller AW, Kowalski RP. Late capsular block syndrome associated with *Propionibacterium acnes*. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960.* févr 2011;129(2):246-7.
62. Ramos A, García-Montero C, López-Menéndez J, Muñoz P, Ruiz-Morales J, Sánchez-Espín G, et al. Endocarditis in patients with ascending aortic prosthetic graft: a case series from a national multicentre registry. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 9 juin 2016;
63. Drosch T, Egle M, Zabel L. Endocarditis caused by *Propionibacterium acnes* -- a diagnostic and therapeutic challenge. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. mars 2013;138(9):418-20.
64. Kurz M, Kaufmann BA, Baddour LM, Widmer AF. *Propionibacterium acnes* prosthetic valve endocarditis with abscess formation: a case report. *BMC Infect Dis.* 25 févr 2014;14:105.
65. Medaghri-Alaoui T, Angoulvant D, Celard M, André-Fouët X. *Propionibacterium acnes* endocarditis on an aortic prosthesis in a patient carrying a pacemaker. *Med Mal Infect.* déc 2008;38(12):676-7.
66. Noel W, Hammoudi N, Wegorowska E, D'Alessandro C, Steichen O. Pacemaker endocarditis caused by *Propionibacterium acnes*: a case report. *Heart Lung J Crit Care.* déc 2012;41(6):e21-23.
67. Firl KC, Montezuma SR. Chronic post-operative iris prosthesis endophthalmitis in a patient with traumatic aniridia: a case report. *BMC Ophthalmol.* 9 nov 2016;16(1):197.

68. Pihl M, Davies JR, Johansson A-C, Svensäter G. Bacteria on catheters in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial.* févr 2013;33(1):51-9.
69. Haidar R, Najjar M, Der Boghossian A, Tabbarah Z. *Propionibacterium acnes* causing delayed postoperative spine infection: review. *Scand J Infect Dis.* juill 2010;42(6-7):405-11.
70. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa K-I, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* déc 2009;24(6):502-5.
71. Olender A, Radej S, Płaza P, Bar K, Maciejewski R. *Propionibacterium acnes* infection associated with cancerous prostate hypertrophy. *Pol Arch Med Wewn.* 14 sept 2016;126(9):697-9.
72. Shannon BA, Garrett KL, Cohen RJ. Links between *Propionibacterium acnes* and prostate cancer. *Future Oncol Lond Engl.* avr 2006;2(2):225-32.
73. Ovodenko B, Seedor JA, Ritterband DC, Shah M, Yang R, Koplin RS. The prevalence and pathogenicity of *Propionibacterium acnes* keratitis. *Cornea.* janv 2009;28(1):36-9.
74. Zaidman GW. *Propionibacterium acnes* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 15 mai 1992;113(5):596-8.
75. RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE TRAITEMENT DE L'ACNÉ PAR VOIE LOCALE ET GÉNÉRALE RECOMMANDATIONS - label-recommandations-acne-post-college-54ac60356d1b9584a71ccaac92cf3724.pdf [Internet]. [cité 26 nov 2016]. Disponible sur: <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/label-recommandations-acne-post-college-54ac60356d1b9584a71ccaac92cf3724.pdf>
76. Nakajima A, Ikeda F, Kanayama S, Okamoto K, Matsumoto T, Ishii R, et al. Antimicrobial activities of ozenoxacin against isolates of propionibacteria and staphylococci from Japanese patients with acne vulgaris. *J Med Microbiol.* août 2016;65(8):745-50.
77. Shah NB, Tande AJ, Patel R, Berbari EF. Anaerobic prosthetic joint infection. *Anaerobe.* déc 2015;36:1-8.

78. Bayston R, Nuradeen B, Ashraf W, Freeman BJC. Antibiotics for the eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms in surgical infection. *J Antimicrob Chemother.* 12 janv 2007;60(6):1298-301.
79. Sardana K, Gupta T, Garg VK, Ghunawat S. Antibiotic resistance to *Propionibacterium acnes*: worldwide scenario, diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* juill 2015;13(7):883-96.
80. Quincampoix JC, Mainardi JL. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. /data/revues/16240693/00100003/01001141/ [Internet]. 29 mai 2008 [cité 28 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/164274>
81. Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. A novel 23S rRNA mutation in *Propionibacterium acnes* confers resistance to 14-membered macrolides. *J Glob Antimicrob Resist.* sept 2016;6:160-1.
82. Sinnott S-J, Bhate K, Margolis DJ, Langan SM. Antibiotics and acne: an emerging iceberg of antibiotic resistance? *Br J Dermatol.* déc 2016;175(6):1127-8.
83. Furustrand T, Tiffin U, Aubin GG, Eich G, Trampuz A, Corvec S. Occurrence and new mutations involved in rifampicin-resistant *Propionibacterium acnes* strains isolated from biofilm or device-related infections. *Anaerobe.* août 2015;34:116-9.
84. Schafer F, Fich F, Lam M, Gárate C, Wozniak A, Garcia P. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne. *Int J Dermatol.* avr 2013;52(4):418-25.
85. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem.* sept 1962;91:1063-5.
86. 2015-DUTAI-Gre_Fluoroquinolones_CDentan.pdf [Internet]. [cité 24 juill 2016]. Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/enseignement/du-grenoble/2015-DUTAI-Gre_Fluoroquinolones_CDentan.pdf
87. Muylaert A, Mainil J. Quinolones et fluoroquinolones: des décennies de développement et d'utilisation: Le point sur les molécules vétérinaires: partie 2, le regard du vétérinaire.

- In: Annales de Médecine Vétérinaire [Internet]. Université de Liège; 2014 [cité 23 janv 2017]. Disponible sur: http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2014_158_1_05.pdf
88. Vincent T, Andriole MD. Overview of the fluoroquinolones focus on moxifloxacin [Internet]. Supplements. 2002 [cité 28 janv 2017]. Disponible sur: <http://formularyjournal.modernmedicine.com/formulary-journal/news/clinical/clinical-pharmacology/overview-fluoroquinolones-focus-moxifloxacin>
 89. Labetoulle M, Chiquet C. Les fluoroquinolones en ophtalmologie : modes d'actions et mécanismes de résistance. /data/revues/01815512/00310008/795/ [Internet]. 20 nov 2008 [cité 23 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/189475#N10095>
 90. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol. août 2014;22(8):438-45.
 91. Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones : données récentes - 9821.pdf [Internet]. [cité 24 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/9821.pdf>
 92. FIGURE 3 (A) Structure of the M. tuberculosis DNA gyrase catalytic core... - Figure 3 of 7 [Internet]. [cité 20 janv 2017]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/280294118_fig3_FIGURE-3-A-Structure-of-the-M-tuberculosis-DNA-gyrase-catalytic-core-in-complex-with
 93. Laponogov I, Pan X-S, Veselkov DA, Cirz RT, Wagman A, Moser HE, et al. Exploring the active site of the *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV–DNA cleavage complex with novel 7,8-bridged fluoroquinolones. Open Biol. 1 sept 2016;6(9):160157.
 94. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010 [Internet]. [cité 23 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773035X10705086>
 95. Yanat B, Rodríguez-Martínez J-M, Touati A. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 26 nov 2016;

96. Horii T, Suzuki Y, Monji A, Morita M, Muramatsu H, Kondo Y, et al. Detection of mutations in quinolone resistance-determining regions in levofloxacin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: effects of the mutations on fluoroquinolone MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juin 2003;46(2):139-45.
97. Piddock LJV. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance: An Update 1994–1998. *Drugs.* 1 oct 1999;58(2):11-8.
98. Pitondo-Silva A, Martins VV, Silva CF da, Stehling EG. Conjugation between quinolone-susceptible bacteria can generate mutations in the quinolone resistance-determining region, inducing quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents.* févr 2015;45(2):119-23.
99. Cheng J, Thanassi JA, Thoma CL, Bradbury BJ, Deshpande M, Pucci MJ. Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of heteroaryl isothiazolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2007;51(7):2445-53.
100. Sierra JM, Martinez-Martinez L, Vázquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2005;49(5):1714-9.
101. Spigaglia P, Carattoli A, Barbanti F, Mastrantonio P. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in *Clostridium difficile* isolates by real-time PCR. *Mol Cell Probes.* avr 2010;24(2):61-7.
102. Drudy D, Quinn T, O'Mahony R, Kyne L, O'Gaora P, Fanning S. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother.* déc 2006;58(6):1264-7.
103. Kakinuma Y, Maeda Y, Mason C, Goldsmith CE, Coulter WA, Matsuda M, et al. Molecular characterisation of the quinolone resistance-determining regions (QRDR) including *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Br J Biomed Sci.* 2012;69(3):123-5.

104. Page S, Vernel-Pauillac F, O'Connor O, Bremont S, Charavay F, Courvalin P, et al. Real-time PCR detection of *gyrA* and *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2008;52(11):4155-8.
105. Cattoir V, Varca A, Greub G, Prod'hom G, Legrand P, Lienhard R. In vitro susceptibility of *Actinobaculum schaalii* to 12 antimicrobial agents and molecular analysis of fluoroquinolone resistance. *J Antimicrob Chemother.* déc 2010;65(12):2514-7.
106. Zhang Z, Lu J, Wang Y, Pang Y, Zhao Y. Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):364-9.
107. Lu J, Liu M, Wang Y, Pang Y, Zhao Z. Mechanisms of fluoroquinolone monoresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* avr 2014;353(1):40-8.
108. Nakaminami H, Sato-Nakaminami K, Noguchi N. A novel GyrB mutation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) confers a high level of resistance to third-generation quinolones. *Int J Antimicrob Agents.* mai 2014;43(5):478-9.
109. Takahashi H, Kikuchi T, Shoji S, Fujimura S, Lutfor AB, Tokue Y, et al. Characterization of *gyrA*, *gyrB*, *grlA* and *grlB* mutations in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1 janv 1998;41(1):49-57.
110. Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 1996;40(10):2321-6.
111. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis.* sept 2002;2(9):530-8.
112. Hovde LB, Simonson DA, Rotschafer JC. Frequency of 1st- and 2nd-step topoisomerase mutations in *Streptococcus pneumoniae* following levofloxacin and moxifloxacin exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mars 2008;60(3):295-9.

113. Pan XS, Fisher LM. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 1997;41(2):471-4.
114. Perichon B, Tankovic J, Courvalin P. Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1997;41(5):1166-7.
115. Janoir C, Varon E, Kitzis MD, Gutmann L. New mutation in *parE* in a pneumococcal *in vitro* mutant resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2001;45(3):952-5.
116. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* mai 2003;51(5):1109-17.
117. Schindler BD, Kaatz GW. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* juill 2016;27:1-13.
118. Cattoir V. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris).* déc 2004;52(10):607-16.
119. Yoshida H. [Characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to hydrophilic quinolones]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med.* mai 1992;50(5):1042-8.
120. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 sept 2016;6(9).
121. Gill MJ, Brenwald NP, Wise R. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 1999;43(1):187-9.
122. Jonas BM, Murray BE, Weinstock GM. Characterization of EmeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2001;45(12):3574-9.

123. Ahmed M, Lyass L, Markham PN, Taylor SS, Vázquez-Laslop N, Neyfakh AA. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J Bacteriol.* juill 1995;177(14):3904-10.
124. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2003;47(2):704-8.
125. Yujiao Z, Xiaojing L, Kaixia M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Yi Chuan Hered.* 20 oct 2016;38(10):918-27.
126. Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2001;45(12):3387-92.
127. Garvey MI, Baylay AJ, Wong RL, Piddock LJV. Overexpression of *patA* and *patB*, Which Encode ABC Transporters, Is Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2011;55(1):190-6.
128. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 17 oct 2014;453(2):254-67.
129. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the *in-vitro* susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin. *J Antimicrob Chemother.* sept 1997;40(3):458-60.
130. Pagès J-M, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* mai 2009;1794(5):826-33.
131. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet Lond Engl.* 14 mars 1998;351(9105):797-9.

132. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim E-C, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 8 janv 2009;53(8):3582-4.
133. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. nov 2016;29:13-29.
134. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 6 janv 2008;61(6):1240-3.
135. Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan. *J Med Microbiol*. mai 2014;63(Pt 5):721-8.
136. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. *J Antimicrob Chemother*. août 2005;56(2):353-9.
137. Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. *Appl Environ Microbiol*. oct 1979;38(4):585-9.
138. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 13 déc 2016]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782522>
139. Remy JM, Tow-Keogh CA, McConnell TS, Dalton JM, Devito JA. Activity of delafloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: resistance selection and characterization. *J Antimicrob Chemother*. déc 2012;67(12):2814-20.
140. Ince D, Hooper DC. Mechanisms and frequency of resistance to premafloxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug-target interactions. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2000;44(12):3344-50.

141. Maeda Y, Murayama M, Goldsmith CE, Coulter WA, Mason C, Millar BC, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* gene loci in viridans group streptococci isolated from adult patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* mars 2011;66(3):476-86.
142. López Y, Tato M, Espinal P, Garcia-Alonso F, Gargallo-Viola D, Cantón R, et al. In vitro selection of mutants resistant to ozenoxacin compared with levofloxacin and ciprofloxacin in Gram-positive cocci. *J Antimicrob Chemother.* janv 2015;70(1):57-61.
143. Onseedaeng S, Rattawongjirakul P. Rapid Detection of Genomic Mutations in *gyrA* and *parC* Genes of *Escherichia coli* by Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction. *J Clin Lab Anal.* 13 avr 2016;
144. Matsumoto M, Shigemura K, Shirakawa T, Nakano Y, Miyake H, Tanaka K, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography. *Int J Antimicrob Agents.* nov 2012;40(5):440-4.
145. Drudy D, Kyne L, O'Mahony R, Fanning S. *gyrA* Mutations in Fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* PCR-027. *Emerg Infect Dis.* mars 2007;13(3):504-5.
146. Isnard C, Lienhard R, Reissier S, Rodriguez S, Krähenbühl J, Liassine N, et al. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Alloscardovia omnicolens* and molecular mechanisms of acquired resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mars 2016;84(3):227-9.
147. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis.* 7 janv 2013;13:8.
148. Sierra JM, Cabeza JG, Ruiz Chaler M, Montero T, Hernandez J, Mensa J, et al. The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2005;11(9):750-8.

149. Corvec S, Aubin GG, Bayston R, Ashraf W. Which is the best treatment for prosthetic joint infections due to *Propionibacterium acnes*: need for further biofilm in vitro and experimental foreign-body in vivo studies? *Acta Orthop.* juin 2016;87(3):318-9.
150. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2001;45(1):105-16.

Vu, le Président du jury,

Pr. Nathalie CAROFF

Vu, le Directeur de thèse,

Dr. Stéphane CORVEC

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénoms : TAKOUDJU Eve-Marie Mamugap

Titre du mémoire - thèse :

Emergence de la résistance aux fluoroquinolones *in vitro* chez *Cutibacterium acnes* et caractérisation moléculaire des mutations retrouvées dans le gène *gyrA*

Résumé du mémoire – thèse :

Les infections sur matériel documentées à *Cutibacterium acnes* sont souvent traitées par une association fluoroquinolones et rifampicine. Des CMI de 0,25mg/L à la lévofloxacine (LVX) sont observées mais la résistance n'a pas encore été investiguée. L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'émergence *in vitro* de la résistance à la lévofloxacine avec la caractérisation des mutations impliquées dans les gènes *gyrA* et *parC*, ainsi que la recherche d'éventuels systèmes d'efflux actif.

La souche de *C. acnes* ATCC 11827 (CMI LVX = 0,25 mg/L) a été utilisée pour ces investigations. La fréquence de mutation a été déterminée après inoculation de 10^8 *C. acnes* sur des géloses au sang contenant des concentrations de LVX de 1 à 128 fois la CMI, incubées 7 jours en anaérobiose à 37°C. L'émergence d'un haut niveau de résistance a aussi été étudiée à partir des mutants de bas niveau après une seconde exposition. Les gènes *gyrA* et *parC* ont été séquencés et comparés à la séquence de référence de *C. acnes*. La présence d'un efflux a été étudié avec trois inhibiteurs d'efflux.

La fréquence de mutation était respectivement de $1,6 \times 10^{-7}$ (4xCMI) et $3,8 \times 10^{-8}$ (8xCMI). Une résistance de bas ou de haut niveau à la LVX était observée. 89 mutants ont été étudiés dont 40 avec une mutation dans le gène *gyrA*. 10 génotypes différents ont pu être mis en évidence G99C (n=4), G99D (n=3), D100N (n=1), S101L (n=14), S101W (n=5), D100H (n=1), D100G (n=1), A102P (n=5), D105H (n=4), D105G (n=2). Aucune mutation n'a été trouvée dans le gène *parC*. Un éventuel mécanisme d'efflux a été mis en évidence par l'utilisation de PaβN.

MOTS CLÉS : *Cutibacterium acnes*, Résistance, Fluoroquinolones

JURY

PRÉSIDENT : Pr Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Pr David BOUTOILLE, Professeur de Maladies Infectieuses
Faculté de Médecine de Nantes
Pr Eric BATARD, Professeur de Thérapeutiques
Faculté de Médecine de Nantes
Dr Aurélie GUILLOUZOUIC, Praticien hospitalier de Bactériologie
CHU de Nantes
Dr CORVEC Stéphane, Maître de conférences de Bactériologie
Faculté de Médecine de Nantes

Adresse de l'auteur : Takoudju Eve-Marie Mamugap
20 hameau des Pastels, 44300, Nantes