

**DÉTECTION RAPIDE DE LA SENSIBILITÉ DES BACTÉRIES
AUX ANTIBIOTIQUES DANS DES INFECTIONS URINAIRES
À L'AIDE DE LA CYTOFLUOROMÉTRIE EN FLUX**

CHRISTIAN GAUTHIER

Mémoire
Présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie appliquée

Directeur :
Richard Villemur, Ph.D.

Août 1999
Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Table des matières

Table des matières.....	ii
Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Sommaire.....	ix
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	3
1. Résistance aux antibiotiques.....	4
1.1 Causes.....	4
1.2 Émergence en milieu clinique et conséquences.....	5
1.3 Prévention et contrôle.....	6
2. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	6
2.1 Méthodes conventionnelles.....	7
2.2 Systèmes semi-automatisés.....	8
2.3 Méthodes rapides.....	9
2.3.1 Observation directe et indirecte.....	9
2.3.2 Sensibilité directe.....	10
2.3.3 Détection génétique.....	10
2.3.4 Bioluminescence de l'ATP.....	11
2.3.5 Analyses cellulaires.....	11
3. La cytofluorométrie en flux.....	12
3.1 Concept.....	12
3.2 Analyse des procaryotes.....	15
3.3 Sondes fluorescentes.....	16
3.3.1 Colorants d'acides nucléiques.....	17
3.3.2 Colorants potentiométriques.....	23
3.3.3 Colorants de la chaîne respiratoire.....	25
3.3.4 Colorants protéiques et substrats enzymatiques.....	26
3.3.5 Autres sondes.....	27
3.4 Applications de la cytométrie en microbiologie clinique.....	28
4. Infections urinaires.....	31
4.1 Causes et caractéristiques.....	32
4.2 Traitement.....	34
4.3 Diagnostic.....	35
4.4 Analyse d'échantillons urinaires par cytométrie en flux.....	36
Matériel et méthodes.....	38
1. Souches bactériennes.....	39

2. Antibiotiques.....	40
3. Détermination de la sensibilité.....	41
3.1 Antibiogramme par disques.....	41
3.2 Microdilution liquide.....	41
3.3 Croissance sur géloses nutritives.....	42
4. Fluorochromes.....	43
4.1 Protocoles d'incubation.....	44
4.2 Témoins.....	46
5. Paramètres d'incubation avec les antibiotiques.....	46
5.1 Culture de départ.....	46
5.2 Inoculum initial.....	47
5.3 Optimisation de la concentration des antibiotiques.....	47
5.4 Optimisation du temps d'incubation.....	48
6. Analyse par cytométrie en flux.....	48
6.1 Traitement des échantillons.....	48
6.2 Protocoles d'acquisition.....	49
7. Microscopie.....	52
7.1 Comptes totaux.....	52
7.2 Épifluorescence.....	52
Résultats.....	53
1. Essais des fluorochromes.....	54
2. Optimisation des paramètres d'incubation avec les antibiotiques.....	70
3. Corrélation des comptes de viabilité.....	76
4. Protocole final.....	78
5. Critères d'interprétation.....	81
6. Application du TSA-CMF.....	82
6.1 Application sur <i>E. coli</i>	82
6.2 Application sur les autres espèces témoins.....	89
7. Analyse des isolats cliniques d'urine.....	98
8. Analyse des échantillons d'urine.....	102
9. Comparaison avec les méthodes conventionnelles.....	108
Discussion.....	112
1. Détermination des meilleurs fluorochromes.....	113
2. Optimisation du protocole.....	114
3. Application du protocole.....	115
3.1 Souches témoins.....	117
3.2 Isolats urinaires.....	119
3.3 Échantillons urinaires.....	120
4. Validation du protocole.....	121
5. Perspectives.....	124
Conclusion.....	127
Remerciements.....	130
Bibliographie.....	132

Liste des figures

	Page	
Figure 1 :	Concept de base d'un cytomètre en flux.	13
Figure 2 :	Architecture interne d'un cytomètre en flux (Coulter Epics XL™).	14
Figure 3 :	Structures chimiques de quelques sondes fluorescentes.	19
Figure 4 :	Photographies en microscopie à épifluorescence de bactéries marquées avec quelques colorants d'acides nucléiques.	22
Figure 5 :	Cellules d'une souche d' <i>E. coli</i> uropathogène, exprimant des pili de type 1, adhérant aux cellules épithéliales du système urinaire.	33
Figure 6 :	Spectres de fluorescence pour deux fluorochromes présentant un chevauchement optique.	51
Figure 7 :	Histogrammes de fluorescence montrant l'efficacité des fluorochromes YOYO-1, SYTO 16 et SYTOX Green.	56
Figure 8 :	Histogrammes biparamétriques tridimensionnels montrant l'efficacité de coloration pour la trousse LIVE/DEAD® BacLight™ (SYTO 9 + PI).	58
Figure 9 :	Coloration avec le CFDA.	61
Figure 10 :	Coloration avec la Rh123.	62
Figure 11 :	Coloration avec le DiOC ₅ (3).	66
Figure 12 :	Coloration avec le DiBAC ₄ (3).	67
Figure 13 :	Coloration avec la combinaison DiBAC ₄ (3) + PI.	68
Figure 14 :	Effets des concentrations sous-inhibitrices de l'ampicilline sur <i>E. coli</i> LE392 observés par cytométrie en flux.	71
Figure 15 :	Optimisation de la concentration de six antibiotiques sur <i>E. coli</i> ATCC 25922 pour un test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF).	72
Figure 16 :	Optimisation du temps d'incubation pour six antibiotiques avec <i>E. coli</i> ATCC 25922.	74

Figure 17 :	Corrélation des comptes de viabilité dans un test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux avec les comptes d'UFC pour des échantillons de <i>E. coli</i> LE392 et <i>P. aeruginosa</i> 57RP incubés respectivement avec des concentrations croissantes d'ampicilline et de gentamicine.	77
Figure 18 :	Protocole final schématique du TSA-CMF.	80
Figure 19 :	Profils de dispersion (SS vs FS) et histogrammes biparamétriques (DiBAC ₄ (3) vs PI) du <i>E. coli</i> CC118 pUTminiTn5Km (AP ^r) et du <i>E. coli</i> ATCC 25922 (AP ^s) incubés pendant 2h avec 16 µg/ml d'ampicilline.	83
Figure 20 :	Profils de dispersion (SS vs FS) et histogrammes biparamétriques (DiBAC ₄ (3) vs PI) comparés à la microscopie en épifluorescence, aux comptes UFC et aux comptes de viabilité par cytométrie, pour <i>E. coli</i> ATCC 25922.	86
Figure 21 :	Analyse du <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 par le TSA-CMF comparée aux résultats des tests de sensibilité conventionnels.	93
Figure 22 :	Analyse du <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 et ATCC 51299 par le TSA-CMF comparée aux résultats des tests de sensibilité conventionnels.	94
Figure 23 :	Analyse du <i>S. aureus</i> ATCC 29213 et ATCC 43300 par le TSA-CMF comparée aux résultats des tests de sensibilité conventionnels.	96
Figure 24 :	Histogrammes biparamétriques de la fluorescence (DiBAC ₄ (3) vs PI) montrés en parallèle avec les comptes UFC et le test d'antibiogramme par disques comparant deux isolats cliniques urinaires (<i>E. coli</i> 85416 et <i>E. coli</i> 15462).	100
Figure 25 :	Histogrammes biparamétriques (DiBAC ₄ (3) vs PI) montrés en parallèle avec les comptes UFC et le test d'antibiogramme par disques pour le <i>E. coli</i> 46040 retrouvé dans un échantillon clinique d'urine.	104
Figure 26 :	Histogrammes biparamétriques (DiBAC ₄ (3) vs PI) montrés en parallèle avec les comptes UFC et le test d'antibiogramme par disques pour le <i>K. pneumoniae</i> 43450 retrouvé dans un échantillon clinique d'urine.	106

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Méthodes conventionnelles de sensibilité aux antibiotiques.	7
Tableau 2 : Propriétés spectroscopiques et fonctionnelles des sondes fluorescentes utilisées en microbiologie ayant une longueur d'onde avoisinant 488 nm.	18
Tableau 3 : Prophylaxie habituelle des infections des voies urinaires (IVU).	34
Tableau 4 : Liste des solvants, des diluants et des concentrations pour les solutions concentrées des fluorochromes utilisés.	44
Tableau 5 : Voltages et compensation de fluorescence pour les détecteurs FL1 et FL3 selon les fluorochromes utilisés.	50
Tableau 6 : Interprétations des tests de sensibilité en dilution liquide pour les souches de laboratoire utilisées au développement des protocoles de coloration avec les fluorochromes.	54
Tableau 7 : Comparaison de la fiabilité, de l'efficacité de coloration et de la capacité des fluorochromes à distinguer la sensibilité à l'ampicilline (AP) et à la gentamicine (GE) avec les souches de laboratoire.	69
Tableau 8 : Vérification des comptes bactériens par cytométrie en flux.	76
Tableau 9 : Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) des antibiotiques utilisés dans le protocole final du TSA-CMF.	78
Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les souches contrôles de l'ATCC, ainsi que pour <i>E. coli</i> LE392 et <i>E. coli</i> CC118 pUTminiTn5Km.	92
Tableau 11 : Comparaison des interprétations de sensibilité pour les isolats urinaires, les souches contrôles et les échantillons d'urine, selon les méthodes d'antibiogramme par disques, de microdilution liquide et selon le TSA-CMF.	109
Tableau 12 : Résumé des incompatibilités d'interprétations de sensibilité entre le TSA-CMF et les deux méthodes conventionnelles.	111

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AO	: Acridine orange
AP	: Ampicilline
ARN	: Acide ribonucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine triphosphate
BCECF-AM	: Ester acétoxyméthyl de 2'-7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5(6)-carboxyfluorescéine
BrEt	: Bromure d'éthidium
CB	: Carbénicilline
CFDA	: 5-Carboxyfluorescéine diacétate
CMF	: Cytomètre (ou cytométrie) en flux
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CT	: Ceftriaxone
CTC	: Chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyt tétrazolium
CZ	: Ceftazidime
DiBAC ₄ (3)	: Bis-(1,3-acide dibutylbarbiturique) triméthine oxonol
DiOC ₅ (3)	: 3,3'-dipentyloxacarboyanine iodide
DMSO	: Diméthyl-sulfoxyde
EDTA	: Acide éthylènediaminetétraacétique
Em	: Longueur d'onde de la lumière émise
EtOH	: Éthanol
Ex	: Longueur d'onde de la lumière excitatrice
FDA	: Fluorescéine diacétate
FISH	: Technique de fluorescence par hybridation in situ
FITC	: Fluorescéine isothiocyanate
FL	: Fluorescence detector (photomultiplicateur de fluorescence)
FS	: Foward scatter detector (photodiode frontale)
g	: Gramme
h	: Heure(s)
GE	: Gentamicine
HI	: Iodure d'hexidium
HMR	: Hôpital Maisonneuve-Rosemont
I	: Souche de résistance intermédiaire
INT	: Chlorure de 2-(<i>p</i> -iodophényl)-3-(<i>p</i> -nitrophényl)-5-phényltétrazolium
IVU	: Infection des voies urinaires
l	: Litre
LB	: Bouillon Luria-Bertani
M	: Molaire
MeOH	: Méthanol
MHSC	: Bouillon Mueller-Hinton supplémenté avec cations
min	: Minutes
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NI	: Nitrofurantoïne
nm	: Nanomètre
NO	: Norfloxacin
OX	: Oxacilline
PAE	: Effet post-antibiotique
PBS	: Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
PG	: Pénicilline G
PI	: Iodure de propidium
R	: Souche résistante
Rh123	: Rhodamine 123
rpm	: Rotation par minute
S	: Souche sensible
SS	: Side scatter detector (photodiode à angle droit)
T°p	: Température de la pièce
TE	: Tris-EDTA
TR	: Tétracycline
TMP/SMX ou TS	: Triméthoprim-sulfaméthoxazole (1/19)
TSA	: Trypticase soy agar
TSA-CMF	: Test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux
UFC	: Unité formatrice de colonies
UV	: Ultra-violet
VA	: Vancomycine

SOMMAIRE

Le développement de méthodes permettant une détection rapide de la sensibilité aux antibiotiques contribuerait à contrôler la dissémination de souches résistantes, et améliorerait l'antibiothérapie actuelle. Nous avons élaboré un nouveau test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF) et évalué sa performance sur des isolats et des échantillons cliniques d'urine. **Méthodologie :** La perte d'intégrité membranaire a été suivie par l'iodure de propidium (PI), un colorant d'acide nucléique. La sonde anionique bis-(1,3-acide dibutylbarbituric) triméthine oxonol (DiBAC₄[3]) a été utilisée pour visualiser les changements de potentiel membranaire. Parallèlement, la morphologie et le contenu cellulaire étaient analysés par diffraction optique. Douze antibiotiques furent testés sur 6 souches contrôles de l'ATCC, 24 isolats urinaires et 19 échantillons cliniques d'urine, représentant une variété d'espèces dont : *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *E. faecalis*, et *P. aeruginosa*. Les microorganismes récupérés furent cultivés en phase exponentielle, incubés pendant 2 h avec différents antibiotiques aux valeurs de sensibilité émises par le NCCLS, lavés, puis incubés 10 min avec les fluorochromes. **Résultats :** Une excellente corrélation fut observée entre les comptes de cellules viables, déterminés par cytométrie en flux, et les comptes d'UFC. L'effet post-antibiotique de la gentamicine sur la viabilité du *E. coli* a pu être quantifié. La concordance entre l'interprétation des résultats du TSA-CMF, des antibiogrammes par disques et des microdilutions liquides (effectués selon les méthodes officielles du NCCLS) était de 93,4 % (n = 346 tests). Des 23 erreurs observées, 19 furent attribuables aux espèces autres que *E. coli*. Une correspondance parfaite a été obtenue avec cinq antibiotiques, alors que la nitrofurantoïne et la tétracycline ont causé, à elles seules, 52 % des erreurs. Le TSA-CMF ne requiert qu'environ 5 h. **Conclusion :** Nos résultats indiquent que le TSA-CMF pourrait être une alternative rapide et précise aux méthodes conventionnelles pour évaluer la vitalité bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques.

Rapid methods for antimicrobial susceptibility testing should help control the spread of resistance, and would greatly improve antimicrobial therapy. Several protocols involving the use of flow cytometry to determine rapidly the antimicrobial activity on bacteria have been published, but not yet applied in a clinical setting. We developed a novel flow cytometric antimicrobial susceptibility test (FC-AST) and evaluated its performance on clinical urine isolates and samples. **Methods:** Alterations in plasma membrane integrity were monitored by propidium iodide. The anionic probe bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol [DiBAC₄(3)] was used to measure changes in membrane potential. Microbial size and cellular content were also analyzed by light scattering. Twelve antibiotics were tested on 6 ATCC control strains, 24 urine isolates and 19 clinical urine samples, containing *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *E. faecalis*, and *P. aeruginosa*. The bacteria were grown to an early log phase, incubated for a 2 h period with an antibiotic at the NCCLS MIC breakpoint, washed and incubated for 10 min with the fluorescent probes. **Results:** Excellent correlation was observed between viable counts determined by flow cytometry and by CFU assays. FC-AST viable counts were not affected by the post-antibiotic effect. Agreement between FC-AST results, disk diffusion and broth microdilution tests (following NCCLS guidelines) was 93,4 % (n = 346 tests). Of the 23 errors observed, 19 came from species other than *E. coli*. Perfect agreement was obtained with five antibiotics, while nitrofurantoin and tetracycline were responsible for 52 % of the errors. In all, FC-AST requires about 5 hours. **Conclusion:** Our results indicate that FC-AST could be a rapid and accurate alternative to conventional methods for measuring bacterial viability and antibiotic susceptibility.

INTRODUCTION

La résistance des bactéries est un problème de santé mondial, auquel l'humanité doit faire face à l'aube du troisième millénaire. L'utilisation massive des antibiotiques durant les cinquante dernières années est la cause principale de l'apparition de souches résistantes.

Pour contrer cette dangereuse problématique, une meilleure gestion de l'antibiothérapie fut proposée. Cependant, les méthodes conventionnelles, présentement utilisées dans les établissements de santé, ne fournissent les résultats d'identification et de sensibilité aux antibiotiques pour un échantillon que 48 h au minimum, après sa soumission au laboratoire clinique. Souvent, la maladie doit être affrontée le plus vite possible. Le patient se voit alors administré une forte dose d'agents antimicrobiens à large spectre, sans connaître le profil de sensibilité du microbe en cause.

Les nouvelles méthodes utilisant des technologies moléculaires ou cellulaires, pourraient améliorer substantiellement les temps d'analyses, et, par conséquent, l'antibiothérapie. Une de ces méthodes rapides implique l'utilisation de la cytofluorométrie en flux pour évaluer la viabilité des bactéries individuelles, suite à un bref traitement avec différents agents antimicrobiens.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise consistait à développer une méthode de détection rapide de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques par la cytofluorométrie en flux. Notre étude se déroula en quatre étapes : 1) la détermination des meilleurs fluorochromes pour une détection fiable et précise de la viabilité bactérienne, 2) le développement et l'optimisation d'un protocole de sensibilité aux antibiotiques à l'aide de souches contrôles, 3) l'application du test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF) sur des isolats et des échantillons cliniques, 4) la validation du protocole par les techniques conventionnelles de microbiologie.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Résistance aux antibiotiques

Depuis plusieurs décennies, les microbiologistes ont observé un fait troublant. En effet, les antibiotiques qui réussissaient auparavant à contrôler les micro-organismes pathogènes deviennent de plus en plus inefficaces. Ceci est le résultat des mécanismes de résistance aux antibiotiques, développés par les redoutables et astucieuses bactéries. Le spectre de l'«ère post-antibiotique» - retour à l'époque où une simple infection devenait mortelle due à l'inexistence de traitement efficace – est à nos portes (Tenover et Hughes, 1996).

L'usage des antibiotiques a certainement changé la perception du public sur les maladies infectieuses et leur traitement. Cependant, ce changement n'a pas été entièrement positif, dans la mesure où certaines personnes considèrent les antibiotiques comme une panacée, utilisant ceux-ci autant à des applications thérapeutiques (humaines et animales) qu'en industrie agro-alimentaire. Ce phénomène a contribué essentiellement à l'omniprésence des micro-organismes résistants aux antibiotiques (Davies, 1999).

1.1 Causes

La résistance aux antibiotiques se présente sous quatre formes : 1) l'inactivation ou la destruction de l'agent antimicrobien ; 2) la modification de la cible visée par le mode d'action de l'antibiotique, 3) la mise en place d'une voie métabolique alternative, et finalement, 4) l'interdiction de l'accès de l'antibiotique à sa cible, grâce à une diminution de la perméabilité et/ou l'augmentation de l'efflux de l'agent vers l'extérieur (Davies et coll., 1994 ; Quintiliani et Courvalin, 1995). Les bactéries possèdent un nombre remarquable de mécanismes génétiques leur permettant d'exister en présence d'agents antimicrobiens. En général, trois facteurs ont contribué à l'émergence de ces mécanismes : 1) des mutations chromosomiques spontanées ; 2) le transfert de gènes de résistance (ex : par l'entremise de plasmides R) d'un genre ou d'une espèce à l'autre ; 3) la pression sélective causée par l'usage massif d'antibiotiques (souvent à large spectre

d'activité) dans les établissements institutionnels et communautaires (Tenover, 1995). Ce dernier facteur favorise la prolifération de souches minoritaires ayant acquis leur résistance par mutation spontanée ou par l'acquisition de nouveau matériel génétique (Tenover et McGowan Jr., 1996).

En analysant les plasmides de résistance, on remarque que ceux-ci ont commencé à évoluer depuis les cinquante dernières années, ce qui correspond exactement avec la découverte des antibiotiques et le début de leur utilisation en clinique (Davies, 1998). Une relation cause à effet entre ces deux phénomènes est très probable (Shlaes et coll., 1997). Cependant, des souches résistantes, notamment à la tétracycline, ont été retrouvées dans le sol et des échantillons fécaux humains, à l'intérieur d'une région où cet antibiotique n'avait jamais été utilisé auparavant (Tenover et Hughes, 1996). D'ailleurs, c'est la résistance à la tétracycline qui est le plus souvent rencontrée dans la nature (Quintiliani et Courvalin, 1995). Ceci démontre que la résistance n'est pas seulement une conséquence de l'usage des antibiotiques, mais que ce phénotype est une composante intégrale d'une stratégie de survie de certaines bactéries dans des environnements hostiles.

1.2 Émergence en milieu clinique et conséquences

À la fin des années 50, le cri d'alarme avait déjà été lancé. Environ 50% des souches de staphylocoques étaient résistantes à la pénicilline. La course était commencée entre les biochimistes, cherchant de nouvelles drogues, et les bactéries, trouvant de nouvelles façons de les contourner (Harington, 1957).

De nos jours, l'apparition de souches microbiennes résistantes en milieu clinique est de plus en plus importante, compte tenu du phénomène d'immunodéficience, de l'utilisation de nouvelles techniques et équipements, de la réduction du nombre de nouveaux antibiotiques disponibles et de l'inefficacité de certaines méthodes de laboratoire à détecter les mécanismes de résistance inédits (Tenover et McGowan Jr., 1996). Des souches qui étaient traditionnellement sensibles à tous les agents

antimicrobiens deviennent maintenant résistantes aux thérapies classiques, ainsi qu'aux agents récemment développés. De plus, notre décennie a vu l'apparition de souches résistantes à de multiples antibiotiques (Levy, 1998). Ce n'est donc pas surprenant que le problème de résistance en milieu clinique entraîne une augmentation de la morbidité, de la mortalité et des coûts imputés au système de santé (Shlaes et coll., 1997).

1.3 Prévention et contrôle

Trois comités, un au Canada (Santé Canada, 1997), un aux États-Unis (Shlaes et coll., 1997) et l'autre en Europe (Monnet, 1999) ont été réunis afin de définir les lignes directrices qui permettraient aux communautés de chaque pays de prévenir l'émergence de la résistance aux antibiotiques, ainsi que de contrôler la dissémination de bactéries résistantes dans les hôpitaux. Les recommandations des trois comités sont assez similaires et comprennent, essentiellement, l'instauration de systèmes surveillant l'apparition de résistance, des programmes de lutte anti-infectieuse à l'intérieur des établissements de santé et des normes visant le contrôle de l'administration des antibiotiques, avec et sans prescription. C'est par ce dernier point, le «contrôle des antibiotiques», que l'on espère atteindre l'efficacité maximale des antibiothérapies. L'utilisation optimale des agents antimicrobiens se réalisera par une meilleure sélection des antibiotiques, de déterminer les doses et durées appropriées des traitements et d'utiliser les antimicrobiens de façon cyclique et combinatoire, pour définitivement prévenir l'apparition de la résistance (Shlaes et coll., 1997).

2. Tests de sensibilité aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est détectée par des tests de sensibilité bien définis. Le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), reconnu mondialement, établit les lignes directrices afin de standardiser et valider ces techniques, ainsi que l'interprétation des résultats de sensibilité obtenus.

En milieu clinique, les spécimens récoltés sur des patients présentant des signes et symptômes de maladies infectieuses sont envoyés au laboratoire de microbiologie, afin de déterminer l'identité et la sensibilité de(s) agent(s) microbien(s) en cause. Ceci est effectué selon des techniques conventionnelles bien établies.

2.1 Méthodes conventionnelles

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques nécessite d'abord la culture, puis l'isolement du ou des microbes présents dans les échantillons reçus (Koneman, 1997). Puisque ces deux étapes nécessitent une croissance macroscopique (visible à l'œil nu) des micro-organismes, un minimum de deux périodes d'incubation de 24 h (48 h au total) est nécessaire (Bergeron et Ouellette, 1998). Pour certains micro-organismes, tels les mycobactéries, l'incubation doit être prolongée à environ une semaine. Ainsi, ces méthodes, présentées dans le tableau 1, sont considérées comme «lentes» (Woods et Washington, 1995).

Tableau 1 : Méthodes conventionnelles de sensibilité aux antibiotiques.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Test par (macro- ou micro-) dilution en milieu liquide- Test par dilution en milieu solide- Test d'antibiogramme par disques (diffusion en milieu solide) |
|---|

La conséquence du délai nécessaire à la croissance des micro-organismes pour indiquer leur présence et leur viabilité est grave. En effet, le clinicien se doit, dans la plupart des cas, administrer à son patient un agent antimicrobien bien avant la réception des résultats par le laboratoire de microbiologie, afin d'arrêter le plus rapidement possible la progression de la maladie et la contamination de la population, dans le cas des microbes infectieux (Isenberg, 1981). Le choix de l'antibiotique est empirique, ne reposant que sur les symptômes et l'historique du patient, ainsi que la tradition dictée par l'établissement de soins de santé (Demers et coll., 1997). Aussi, lorsqu'une maladie infectieuse sévère ou nosocomiale est soupçonnée, on administre souvent de fortes doses

d'antibiotiques à large spectre d'activité. Pire encore, dans 70 à 80 % des échantillons envoyés aux laboratoires cliniques, on ne retrouve aucun micro-organisme cultivable (Laverdière et Restieri, 1999). Dans ce contexte, non seulement l'émergence de souches résistantes est favorisée, mais une antibiothérapie est souvent prescrite pour traiter une maladie qui n'est même pas causée par des bactéries (Bergeron et Ouellette, 1998). Cette situation va à l'encontre des principes visant la prévention et le contrôle de la résistance aux antimicrobiens. Il serait donc souhaitable de modifier les habitudes des cliniciens par l'instauration de nouvelles méthodes permettant un compte-rendu rapide de l'identité et/ou de la sensibilité des micro-organismes pathogènes (Matsen, 1981).

2.2 Systèmes semi-automatisés

Afin d'accélérer le processus d'identification, de détermination de sensibilité et d'augmenter la capacité d'analyse d'échantillons des laboratoires cliniques, des systèmes semi-automatisés ont été mis au point, dont Vitek (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO), MicroScan (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA), et, disponible bientôt, le système Phoenix (Becton Dickinson Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ). L'analyse optique de croissance dans des plaques multi-puits est le principe de base de ces appareils. La grande sensibilité des détecteurs et la capacité d'analyse par l'informatique rend ces systèmes très rapides. Les résultats d'identification et de sensibilité sont fournis en 3 à 5 heures (Kelly, 1982). Par contre, ces systèmes ne peuvent analyser que les bactéries les plus répandues en milieu clinique. Des erreurs inacceptables sont occasionnées par des combinaisons antibiotiques-bactéries qui nécessitent un temps plus long pour avoir un effet sur la croissance de la culture. Aussi, ces systèmes ont plusieurs lacunes dans leur programmation, notamment la détection de résistance des pneumocoques aux β -lactames, des entérocoques à la vancomycine (Koneman et coll., 1997) et la résistance des entérobactéries aux quinolones (Steward et coll., 1999).

2.3 Méthodes rapides

Compte tenu des restrictions d'espace et d'embauche de personnel, une augmentation de la rapidité et du nombre d'échantillons cliniques à analyser doit se faire principalement par l'amélioration et l'automatisation des techniques et des équipements (Koontz, 1981). L'impact clinique et économique des méthodes rapides d'identification et de sensibilité aux antibiotiques ont déjà été démontrés (Doern et coll., 1994 ; Barenfanger et coll., 1999). Différentes techniques rapides, ne nécessitant pas l'analyse de croissance macroscopique, seront décrites dans les prochaines sections.

2.3.1 Observation directe et indirecte

Une des techniques les plus sous-utilisées en microbiologie est l'observation au microscope des frottis d'échantillons à l'état frais, avec ou sans coloration (Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen, colorants et fluorochromes non-spécifiques tels le bleu de méthylène et l'acridine orange, etc...). Cette technique ne requiert que quelques minutes et fournit des informations extrêmement pertinentes sur la présence et l'identité des micro-organismes dans les échantillons, ainsi que sur l'état de santé du patient (présence de cellules immunitaires, de globules rouges, etc...) (Randall, 1981).

Puisque que 80 % des cultures d'urine ne contiennent pas une quantité significative de bactéries, il est impératif de trouver des moyens rapides pour dépister les micro-organismes dans les échantillons cliniques (Cardoso, 1998). Par exemple, il est possible de détecter indirectement les bactéries par les différences d'impédance et de conductivité (Brown et Warner, 1981), la présence d'estérases leucocytaires, de la production de nitrite (Vern Juchau, 1984), de catalase (Berger, 1990), ainsi que la présence de lactoferrine leucocytaire (Arao, 1999). Les réactifs de ces derniers tests sont imprégnés sur des bâtonnets faciles à utiliser (Smaill et coll., 1998).

2.3.2 Sensibilité directe

Dans le cas des infections des liquides corporels normalement stériles (ex : sang et urine), il a été démontré que le test de sensibilité aux antibiotiques pouvait se faire directement à partir du spécimen clinique (Oakes et coll., 1994 ; Gillenwater et Clark, 1996). Évidemment, cette technique est controversée, à cause du risque d'erreurs, notamment dues aux infections mixtes. Toutefois, les taux de sensibilité obtenus étaient tout à fait respectables (entre 95 et 98 %) et l'économie de temps (24 h) et d'argent justifie pleinement l'essai de telles techniques (Johnson et coll., 1995).

2.3.3 Détection génétique

Une façon extrêmement rapide de détecter la présence de micro-organismes dans des spécimens cliniques est l'utilisation des technologies d'amplification d'ADN par polymérase en chaîne (PCR) (Vanechoutte et Van Eldere, 1997). Les amorces sont des séquences d'ADN ou d'ARN simple brin qui peuvent s'hybrider spécifiquement avec un brin complémentaire. Celles-ci sont généralement courtes (20 nucléotides) et, lors de leur synthèse, on programme leurs séquences afin qu'elles soient complémentaires avec des régions d'ADN chromosomique spécifiques à certains genres ou espèces de micro-organismes pathogènes.

Il est possible d'utiliser des amorces spécifiques directement dans les échantillons cliniques, ce qui permet, grâce à la technologie du PCR, d'avoir très rapidement (3 à 6 h) une indication de la présence d'un micro-organisme visé. Ces tests moléculaires s'avèrent fort utiles dans le cas de la détection de micro-organismes fastidieux, tels *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* (Bergeron et Ouellette, 1998), le virus du papillome humain et le VIH (Koneman et coll., 1997). L'utilisation de cette technique pour détecter les gènes de résistance est présentement en étude (Bergeron et Ouellette, 1998). Le Food and Drug Administration (FDA) a accepté tout récemment l'utilisation clinique du BDProbeTec™ ET, un système utilisant le principe d'amplification génétique (Becton Dickinson Microbiology Systems, Franklin Lakes,

NJ). Contrairement à tous les autres tests de sensibilité aux antibiotiques, il s'agirait ici de détecter le génotype de résistance, plutôt que le phénotype de sensibilité. Cependant, plusieurs limites à cette technologie restent à être surmontées (Vaneechoutte et Van Eldere, 1997) et plusieurs questions doivent être élucidées ; notamment, est-ce que la présence d'un gène de résistance signifie toujours que le microbe est résistant, et vice versa ? La grande diversité des mécanismes de résistance est un problème en soit, puisqu'une infection peut être occasionnellement due à plusieurs micro-organismes qui, à leur tour possèdent plus d'un mécanisme de résistance.

2.3.4 Bioluminescence de l'ATP

On peut détecter et quantifier la biomasse bactérienne par le test de bioluminescence de l'ATP. L'adénosine triphosphate (ATP) est le substrat spécifique de la réaction luciférine-luciférase, et la quantité de lumière générée est proportionnelle à la quantité initiale d'ATP. Ce test est rapide (1 à 15 min) et peut être utilisé comme dépistage pour la présence de bactéries dans les infections urinaires (Schifman et coll., 1984 ; Pezzlo et coll., 1989). La méthode a été également améliorée, afin d'être appliquée comme test de sensibilité aux antibiotiques (Wheat et coll., 1988). Cependant, certains désavantages ont été notés, entre autres, une discordance entre les résultats de cette méthode et ceux des méthodologies conventionnelles, lors de la quantification de l'effet des antibiotiques (Soren et coll., 1995 ; Hattori et coll., 1998).

2.3.5 Analyses cellulaires

Il existe très peu de méthodes analysant directement l'effet des agents antimicrobiens sur les cellules bactériennes. La microscopie à épifluorescence a été couplée avec des systèmes automatisés (Scholefield et coll., 1981) et d'imagerie informatisée (Le Neel et coll., 1996), pour être appliquée comme test rapide afin de dépister la présence de bactéries dans des échantillons d'urine. Dans le même but, de rares études ont porté sur l'application des compteurs de particules (Coulter Counter) (Smither, 1977 ; Alexander et coll., 1981).

La cytofluorométrie en flux représente l'évolution des compteurs de particules et, parmi sa vaste gamme d'applications, elle fut considérée pour la quantification des effets des composés antimicrobiens sur les cellules individuelles, pour ainsi constituer un test de sensibilité rapide aux antibiotiques (Steen et coll., 1982).

3. La cytofluorométrie en flux

La conception et les applications de la cytométrie en flux ont été développés durant les dernières 25 années. Cet outil est, encore aujourd'hui, largement utilisé en hématologie clinique et expérimentale, en immunologie et en pathologie, mais assez peu de recherches ont été effectuées en microbiologie. De plus en plus accessible et techniquement plus sensible, la cytométrie offre aux microbiologistes la puissance d'analyser qualitativement et quantitativement les populations microbiennes. La cytométrie en flux permet la détection, l'identification et la caractérisation bactérienne de façon rapide, sensible et économique. En microbiologie clinique, l'application de cette technologie comme test rapide de sensibilité aux antibiotiques est exaltante (Shapiro, 1990b).

3.1 Concept

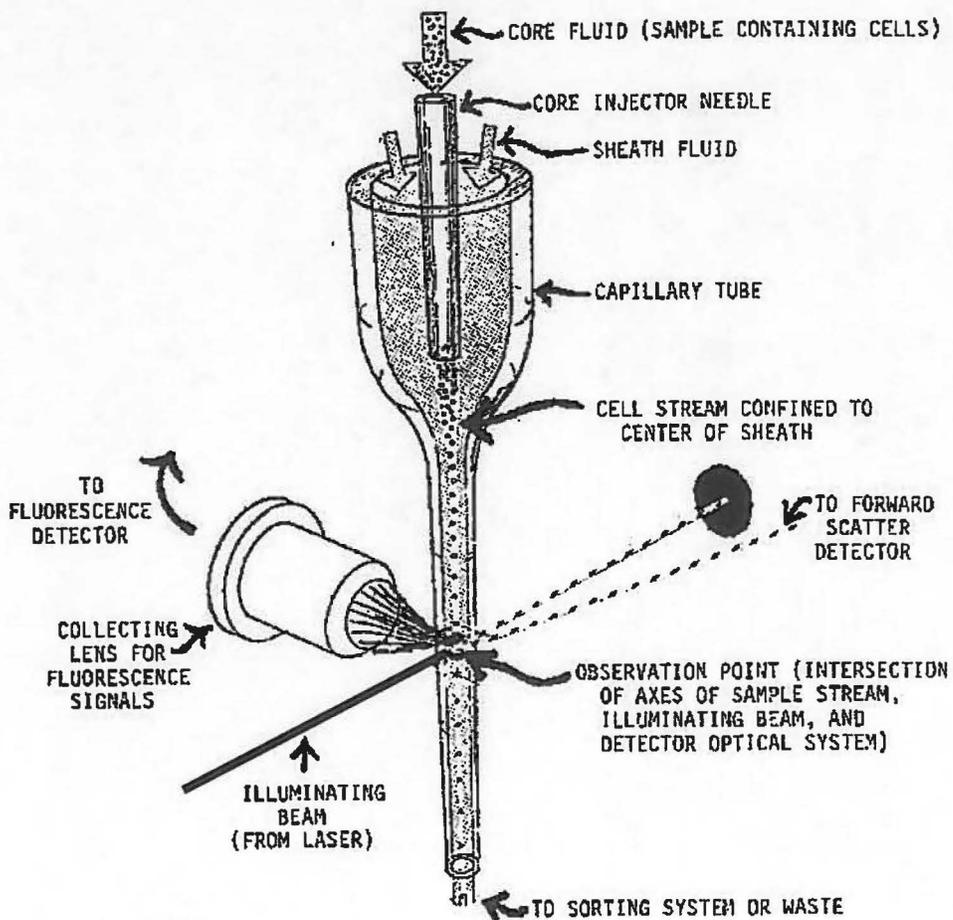
Le principe de base de tout cytomètre en flux est la présentation de cellules individuelles, passant en file simple à travers un faisceau lumineux, à l'intérieur d'une zone de détection optique (figure 1). Le défilement rapide est obtenu grâce à la canalisation des cellules par un flux continu à haute pression d'un liquide (solution saline). La vitesse de ce liquide d'enveloppe est généralement de l'ordre de 10 mètres par seconde, ce qui permet analyse d'environ 2 000 cellules par seconde.

Le faisceau lumineux est généré soit par un laser, soit par une lampe au mercure. L'insertion de différents filtres permet de sélectionner la longueur d'onde émise par une

lampe au mercure, alors qu'un laser émet un rayon lumineux de longueur d'onde fixe. Le passage des cellules à travers le faisceau occasionne une dispersion lumineuse qui sera amplifiée par deux détecteurs (du type photodiodes). Le premier détecteur, situé directement en avant du faisceau incident, se nomme «forward scatter detector» (ou FS) et il recueille la lumière dispersée par la surface d'une cellule, dont l'intensité est proportionnelle à la taille de cette cellule. Le second détecteur, situé à angle droit par rapport au faisceau incident, se nomme «side scatter detector» (ou SS) et recueille la lumière diffractée par les composantes internes d'une cellule, dont l'intensité est proportionnelle à la granulosité de cette cellule (Edwards et coll., 1992).

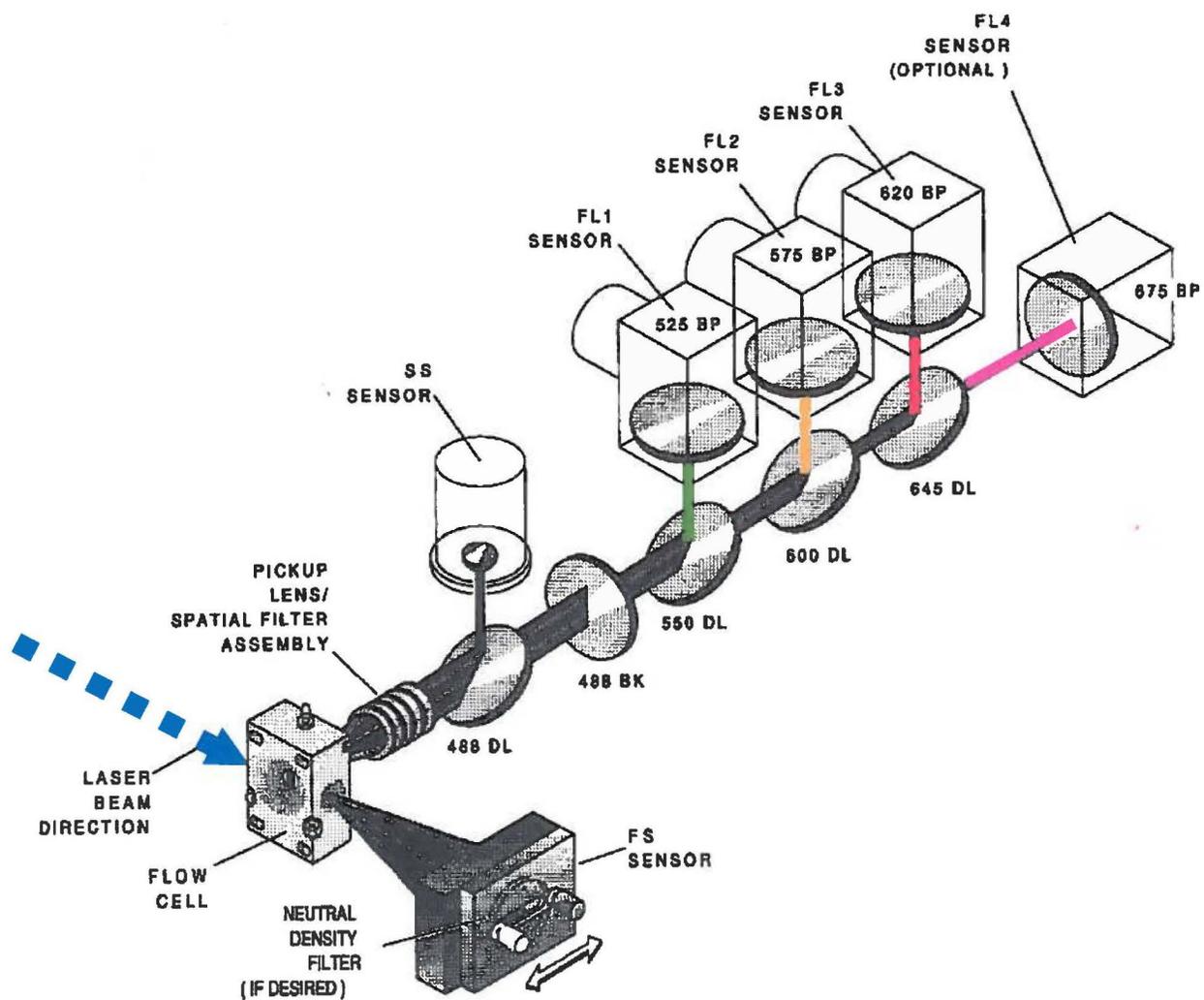
Ces détecteurs convertissent les impulsions photoniques en impulsions électriques qui seront alors mesurées et digitalisées avant d'être transmises, pour analyse subséquente, à un ordinateur (Boye et Steen, 1993).

Figure 1 : Concept de base d'un cytomètre en flux.



En marquant les cellules avec des molécules fluorescentes spécifiques pour une certaine composante cellulaire, il devient possible de mesurer quantitativement cette composante à l'aide de différents détecteurs de fluorescence (FL) qui sont généralement des tubes photomultiplicateurs. La fluorescence peut être divisée en différents spectres de couleurs à l'aide d'une série de lentilles et de miroirs dichroïques (figure 2) (Boye et Steen, 1993).

Figure 2 : Architecture interne d'un cytomètre en flux (Coulter Epics XL™).



3.2 Analyse des procaryotes

Les applications de la cytométrie en flux dans le domaine de la microbiologie ont été initialement limitées par la faible taille des cellules procaryotiques, et conséquemment de leur contenu cellulaire. Par exemple, le contenu en ADN de *E. coli* est 1 400 fois inférieur à celui d'une cellule humaine diploïde, donc en deçà du seuil de détection des premiers cytomètres (Allman et coll., 1993). Vers la fin des années 70, des améliorations en technologie optique et le développement de meilleurs colorants fluorescents ont permis à des chercheurs, comme Hutter et Eipel (1978) de démontrer l'usage de la cytométrie en flux pour déterminer le contenu en ADN et en protéines de divers micro-organismes, dont une bactérie (*E. coli*), une algue (*Chlorella* sp.), des levures (*Saccharomyces* sp. et *Schizosaccharomyces* sp.) et un champignon (*Nectria coccinea*).

Une des percées les plus importantes de la cytométrie en microbiologie fut réalisée par Lindmo et Steen (1979) grâce à leur cytomètre conçu spécifiquement pour l'analyse des bactéries. Leur conception est basée autour d'un microscope à épifluorescence. Les cellules sont canalisées hydrodynamiquement dans un jet liquide passant à la surface d'une lamelle, pour traverser la lumière convergente d'une lampe au mercure (zone d'analyse ouverte). La configuration particulière de cet instrument permet une très grande sensibilité et une diminution du bruit de fond. La version commerciale de ce cytomètre fut le Skatron Argus[®] 100 (Skatron, Newmarket, UK). Repris et amélioré par la compagnie Bio-Rad (Hercules, CA), il devint le Bryte[®] HS. De nombreuses publications citent l'utilisation de ce type d'instrument (Steen et Boye, 1980a-b ; Steen et coll., 1982 ; Davey et Kell, 1993 ; Diaper et coll., 1992 ; Porter et coll., 1995b ; Kirk et coll., 1998 ; Pore et Thomas, 1998). Les cytomètres à laser sont devenus de plus en plus sensibles depuis les dix dernières années, permettant l'analyses de procaryotes avec autant de précision que les instruments à lampe au mercure (Davey et Kell, 1996).

Les applications de cette technologie sur les micro-organismes dépendent principalement du mode d'action des fluorochromes utilisés, et couvrent généralement les domaines suivants : l'analyse du cycle cellulaire des bactéries (Steen et coll., 1986),

l'évaluation du contenu en ADN et/ou en protéines (Boye et coll., 1983 ; Van Dilla et coll., 1983), l'énumération des bactéries (Pinder et coll., 1990 ; Comas et Vives-Rego, 1998 ; Pyle et coll., 1995), la détermination rapide de viabilité bactérienne (Diaper et coll., 1992 ; Kaprelyants et Kell, 1992 ; Jepras et coll., 1995 ; Porter et coll., 1995a-b ; Lopez-Amoros et coll., 1997 ; Nebe-von Caron et coll., 1998 ; Watson et coll., 1998), l'effet de divers composés antibactériens (Comas et Vives-Rego, 1997 ; Chapple et coll., 1998 ; Sheppard et coll., 1997 ; Langsrud et Sundheim, 1996 ; Mason et coll., 1997a ; Virta et coll., 1998 ; Swarts et coll., 1998), et l'effet des antibiotiques (Steen et coll., 1982 ; Gant et coll., 1993 ; Mason et coll., 1994 ; Durodie et coll., 1995b ; Walberg et coll., 1997a-b ; Suller et Lloyd, 1999).

Toutes ces recherches ont démontré les bénéfices de l'utilisation de la cytométrie en flux sur les micro-organismes, soit par l'acquisition et l'analyse à haute vitesse de données multi-paramétriques (Davey et Kell, 1996) et par la possibilité de trier les différentes populations cellulaires, contenues dans un seul échantillon, et de les isoler dans des tubes séparés (Wallner et coll., 1997 ; Porter et coll., 1993). Alors que plusieurs mesures cellulaires sont possibles en n'utilisant que les différents profils de dispersion lumineuse, la véritable force de la cytométrie réside dans sa capacité de quantifier la fluorescence de chaque particule analysée.

3.3 Sondes fluorescentes

Il existe maintenant une panoplie de composés fluorescents ou «fluorochromes», qui permettent de visualiser et de mesurer différents paramètres cellulaires (Haugland, 1996), autant en microscopie photonique, à épifluorescence, à balayage au laser confocal, qu'en cytofluorométrie en flux (McFeters et coll., 1995). On définit une molécule comme étant fluorescente lorsqu'elle émet de la lumière, suite à la chute de ses électrons d'une orbitale énergétique supérieure à une orbitale inférieure ; conséquence à l'excitation de cette molécule par un rayon lumineux de longueur d'onde spécifique. La lumière émise (la fluorescence) est temporaire, et toujours de longueur d'onde supérieure à celle de la lumière excitatrice (Johnson, 1996a).

Les microbiologistes supposent souvent l'homogénéité des cellules dans leurs échantillons. En réalité, les populations sont hétérogènes quant à l'état biologique de chaque cellule (Davey et Kell, 1996). Ces différences sont imputables aux paramètres structuraux et fonctionnels des cellules qui peuvent être marqués par des sondes fluorescentes (Shapiro, 1985). Les sections suivantes décrivent les principaux composés utilisés en microbiologie, qui ont une longueur d'onde d'excitation aux alentours de 488 nm, lumière émise par un laser à l'argon. Le tableau 2 résume les propriétés spectroscopiques de ces sondes, la figure 3 montre les structures chimiques de quelques sondes, alors que la figure 4 illustre des exemples de coloration de bactéries par des fluorochromes.

3.3.1 Colorants d'acides nucléiques

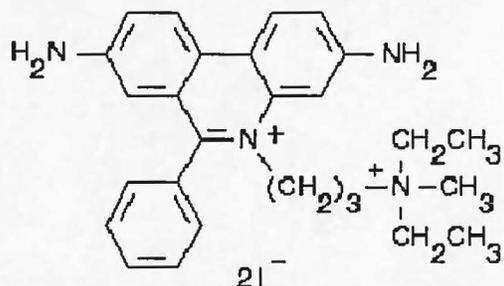
Un grand nombre de fluorochromes s'attachent sélectivement à l'ADN. Le bromure d'éthidium (bromure 2,7-diamino-9-phényl-10-éthylphénanthridinium) et l'iodure de propidium (diiodure 3,8-diamino-5-diéthylméthylamino-propyl-6-phénylphénanthridinium) sont des agents dérivés de la phénanthridine, qui s'intercalent dans l'ADN et l'ARN. Ces deux fluorochromes sont généralement exclus des cellules viables, puisque les membranes cellulaires intactes sont imperméables pour ces composés (Haugland, 1996). L'iodure de propidium (PI) est plus soluble dans l'eau, est moins susceptible de pénétrer les membranes intactes, et sa longueur d'onde d'émission (sa fluorescence) est de 10 à 15 nm supérieure (plus vers le rouge) à celle du bromure d'éthidium (BrEt) (Davey et Kell, 1996). Cette dernière caractéristique permet d'utiliser le PI en combinaison avec d'autres fluorochromes qui émettent une fluorescence verte. Ceci explique la grande popularité du PI en cytofluorométrie (Porter et coll., 1995b ; Nebe-von Caron et coll., 1998 ; Comas et Vives-Rego, 1997 et 1998 ; Lopez-Amoros et coll., 1995 et 1997 ; Mason et coll., 1997a ; Sheppard et coll., 1997 ; Chapple et coll., 1998), quoique plusieurs recherches aient aussi été effectuées avec le BrEt (Steen et Boye, 1980a ; Pinder et coll., 1990 ; Steen et coll., 1990 ; Jernaes et Steen, 1994 ; Walberg et coll., 1999 ; Nebe-von Caron et coll., 1998 ; Cohen et Sahar, 1989).

Tableau 2 : Propriétés spectroscopiques et fonctionnelles des sondes fluorescentes utilisées en microbiologie ayant une longueur d'onde avoisinant 488 nm.

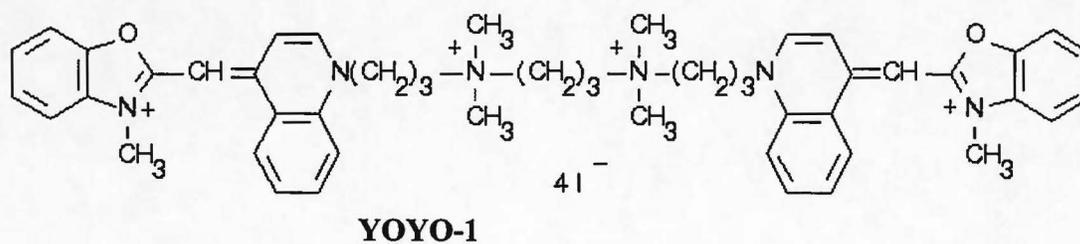
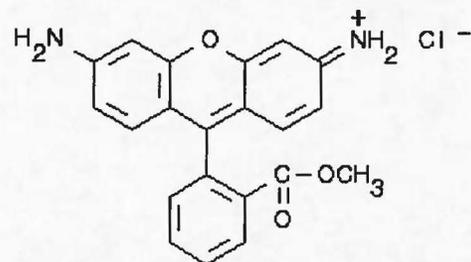
Cible cellulaire	Sonde	Ex (max) (nm)	Em (max) (nm)	
ADN/ARN	Bromure d'éthidium	518	605	
	Iodure de propidium	535	617	
	Iodure d'hexidium	518	600	
	SYTOX Green	504	523	
	SYBR Green	494	521	
	YOYO-1	491	509	
	SYTO 9	~ 488	~ 520	
	SYTO 13	488	509	
	SYTO 16	488	518	
	Acridine orange	(ADN) 500 (ARN) 460	526 650	
	Mithramycin	445	575	
Protéines	Fluorescéine	490	514	
	Fluorescéine isothiocyanate	494	519	
Potentiel électrique membranaire	Rhodamine 123	507	529	
	DiOC2(3)	482	500	
	DiOC5(3)	484	500	
	DiOC6(3)	484	501	
	DiOC7(3)	482	504	
	DiBAC4(3)	493	516	
Chaîne respiratoire	CTC	530-550	variable	Produits d'hydrolyse
Activité enzymatique	Fluorescéine diacétate	473	514	Fluorescéine
	Carboxyfluorescéine diacétate	492	518	Carboxyfluorescéine
	BCECF-AM	482	520	BCECF
	Calcéine-AM	494	517	Calcéine

Figure 3 : Structures chimiques de quelques sondes fluorescentes.

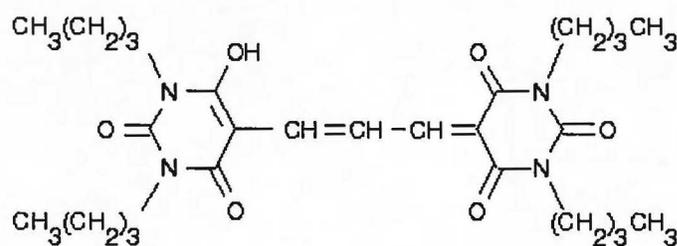
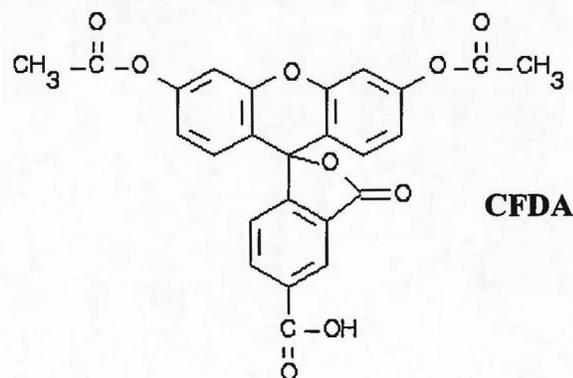
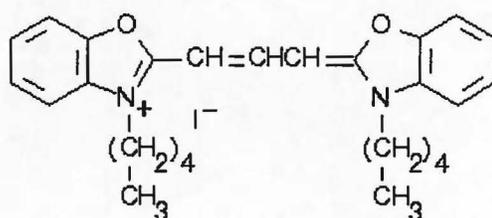
Iodure de propidium (PI)



Rhodamine 123 (Rh123)



DiOC₅(3)



DiBAC₄(3)

Fonctionnant par le même principe, mais structurellement différents des deux fluorochromes précédents, résultant en une affinité très supérieure pour l'ADN, on retrouve les cyanines SYTOX Green et SYBR Green, ainsi que le dimère symétrique de cyanines YOYO-1 (Haugland, 1996). Quelques études ont également montré l'efficacité de ces sondes de mortalité cellulaire (SYTOX Green : Langsrud et Sundheim, 1996 ; Suller et Lloyd, 1999 ; Roth et coll., 1997. SYBR Green : Hyatt et Schentag, 1998 ; Lebaron et coll., 1998 ; Liao et coll., 1999. YOYO-1 : Marie et coll., 1996 ; Guindulain et coll., 1997).

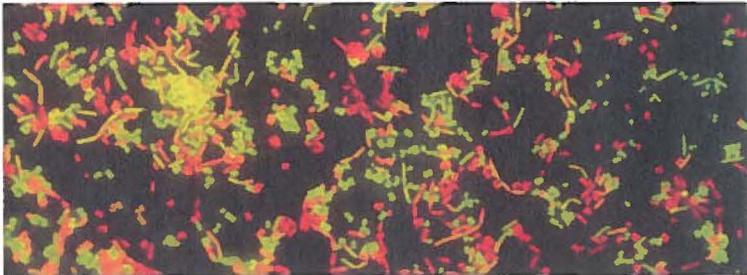
D'autres cyanines, du type SYTO[®], développées par Molecular Probes (Eugene, OR), ont également la propriété de s'attacher aux acides nucléiques avec une bonne affinité, mais, contrairement aux autres fluorochromes énumérés plus haut, celles-ci peuvent diffuser passivement à travers les membranes cellulaires intactes et endommagées de procaryotes et eucaryotes (Haugland, 1996). L'utilisation d'un fluorochrome SYTO permet, entre autres, la détection des bactéries non-cultivables dans des échantillons aquatiques (Guindulain et coll., 1997 ; Lebaron et coll., 1998). Un fluorochrome SYTO peut devenir une sonde de viabilité lorsqu'il est utilisé en combinaison avec une sonde de mortalité. Si cette dernière est également un colorant d'acides nucléiques, alors elle doit avoir une affinité beaucoup plus grande pour l'ADN et l'ARN que le SYTO en question. Ainsi, dans une population mixte, la compétition entre les deux colorants pour s'attacher à l'ADN des cellules aux membranes endommagées (cellules «mortes») sera remportée en grande partie par la sonde de mortalité, alors que les cellules «vivantes» seront exclusivement marquées par la sonde SYTO (Haugland, 1996). Cette coloration double est utilisée dans la trousse LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR), comprenant le SYTO 9 et le PI (Langsrud et Sundheim, 1996 ; Virta et coll., 1998 ; Nexmann Jacobsen et coll., 1997 ; Swarts et coll., 1998 ; Comas et Vives-Rego, 1997). Molecular Probes offre également une autre trousse ; le LIVE *BacLight* Bacterial Gram Stain Kit, combinaison du SYTO 9 et de l'iodure d'hexidium (HI). Les deux fluorochromes diffèrent dans leurs caractéristiques spectrales et dans leur capacité de pénétrer les membranes de bactéries vivantes Gram-positives et Gram-négatives. L'iodure d'hexidium, un colorant d'acides

nucléiques donnant une fluorescence rouge, pénètre très difficilement la paroi des bactéries Gram-négatives. Ainsi, dans une population mixte, les bactéries Gram-positives seront sélectivement colorées en rouge-orange par l'HI, alors que les Gram-négatives présenteront la fluorescence verte du SYTO 9 (Haugland, 1996). Mason et coll. (1998b) ont évalué ce principe en utilisant cependant le SYTO 13 au lieu du SYTO 9. La technique s'est avérée très efficace et d'une fiabilité supérieure à la coloration de Gram traditionnelle.

Un autre colorant d'acides nucléiques est l'acridine orange (AO). Cette molécule possède la propriété intéressante d'émettre une fluorescence différentielle, selon son substrat. En effet, l'intercalation de l'AO sur l'ADN résulte en l'émission d'une fluorescence verte à ~525 nm, alors que son attachement à l'ARN donne un maximum de fluorescence à ~650 nm (couleur rouge) (Haugland, 1996). L'avantage de cet effet dichroïque est la possibilité de mesurer qualitativement le ratio ARN:ADN (McFeters et coll., 1995). Cependant, ce fluorochrome distingue avec peu de fiabilité les cellules bactériennes physiologiquement actives et les cellules mortes (Mason et Lloyd, 1997b).

La mithramycine est un antibiotique fluorescent qui peut s'attacher électrostatiquement à l'ADN (Crissman et Tobey, 1990). La mithramycine a été utilisée seule (Steen et coll., 1982) ou en combinaison avec le BrEt, afin d'augmenter la fluorescence de celui-ci, par transfert énergétique (Steen et Boye, 1980a ; Boye et coll., 1983 ; Walberg et coll., 1999). La chromomycine A3 est un analogue de la mithramycine, mais elle requiert une excitation par lumière UV (Crissman et Tobey, 1990). Il en est de même pour les autres colorants ; DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole) et Hoechst 33342 / 33258 (Walberg et coll., 1999 ; Van Dilla et coll., 1983).

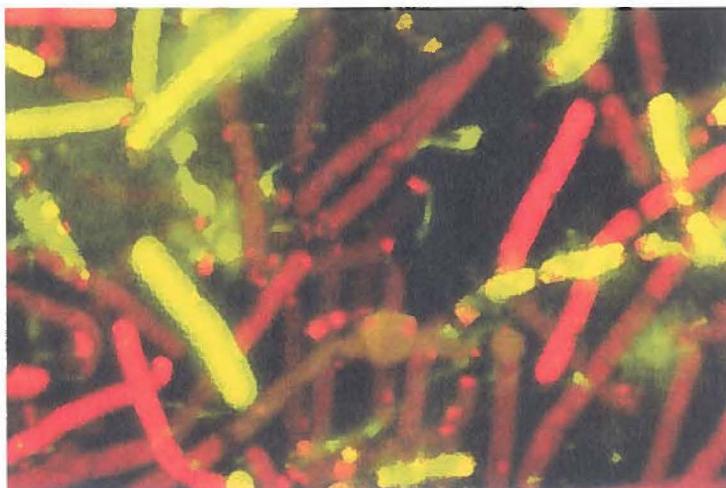
Figure 4 : Photographies en microscopie à épifluorescence de bactéries marquées avec quelques colorants d'acides nucléiques.



LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit
(SYTO 9 + PI)
Micrococcus luteus et *Bacillus cereus*
Un mélange de bactérie vivantes et tuées à
l'alcool isopropylique.



LIVE BacLight Bacterial Gram Stain Kit
(SYTO 9 + HI)
Micrococcus luteus (Gram +) et
Salmonella oranienburg (Gram -).



SYTOX Green + SYTO 59
(5 μ M chaque)
Bacillus cereus vivant et tué à la
chaleur

Les cellules vivantes sont colorées en rouge par le SYTO 59 (ex 603 nm / em 645 nm), alors que les cellules perméabilisées par la chaleur sont vertes par la fluorescence du SYTOX Green.

3.3.2 Colorants potentiométriques

Les cellules eucaryotes, les mitochondries, ainsi que les cellules procaryotes possèdent un gradient de potentiel électrique de part et d'autre de leur membrane plasmique avec un cytosol électriquement négatif par rapport à l'espace extracellulaire. Ce potentiel membranaire est maintenu dans les cellules métaboliquement actives, puisqu'il est dû aux différentes concentrations d'ions sodium, potassium et chlorures entre ces deux compartiments. Les caractéristiques du potentiel de membrane chez les bactéries sont très similaires à celles des mitochondries ; le système métabolique, responsable du gradient d'ions, est situé sur la portion membranaire (interne) cytoplasmique et le potentiel membranaire est diminué ou perdu quelques minutes suivant le retrait des sources énergétiques (Shapiro, 1990a-b).

L'augmentation ou la diminution du potentiel de membrane – respectivement désignés par les termes hyperpolarisation et dépolarisation membranaire – sont des indicateurs de viabilité cellulaire. Des sondes potentiométriques permettent de visualiser ces changements par l'intensité de leur fluorescence. Trois catégories de sondes, notamment les rhodamines et carbocyanines cationiques, ainsi que les oxonols anioniques, sont particulièrement intéressantes pour étudier les variations du potentiel membranaire chez les bactéries (Haugland, 1996).

La rhodamine 123 (Rh123), traditionnellement réservée pour l'observation de mitochondries (Shapiro, 1990a), a démontré son utilité en microbiologie pour évaluer la viabilité bactérienne (Bercovier et coll., 1987 ; Diaper et coll., 1992 ; Kaprelyants et Kell, 1992 ; Diaper et Edwards, 1994 ; Yu et McFeters, 1994 ; Mason et coll., 1993a et 1995a ; Porter et coll., 1995b ; Langsrud et Sundheim, 1996 ; Comas et Vives-Rego, 1997 et 1998 ; Lopez-Amoros et coll., 1995 et 1997 ; Nexmann Jacobsen et coll., 1997). Diaper et coll. (1992) et Kaprelyants et Kell (1992) ont démontré que l'intensité de la fluorescence de cette sonde permet de distinguer les cellules «viables», «viables-mais-non-cultivables» et «mortes». Cependant, ceux-ci sont arrivés aux mêmes observations quant à la difficulté, pour les bactéries Gram-négatives, à accumuler la Rh123, à cause de la faible

perméabilité de leur paroi externe pour ce composé. Un simple traitement au Tris-EDTA résout ce problème (Kaprelyants et Kell, 1992). La Rh123 n'est pas un colorant universel ; plusieurs espèces, dont *B. subtilis* et *P. fluorescens* ne peuvent pas être colorés par la Rh123 (Diaper et coll., 1992). Même le traitement à l'ionophore valinomycin, utilisé pour hyperpolariser les cellules, n'est efficace que pour certaines espèces (Porter et coll., 1995c).

Les indo- (DiI), thia- (DiS) et oxa- (DiO) carbocyanines, à courte chaîne alkyl (de un à sept carbones), sont des colorants cationiques qui s'accumulent sur les membranes hyperpolarisées, pour ensuite s'enfouir dans la double couche lipidique. Lorsque confinées à l'intérieur des membranes polarisées, ces sondes deviennent généralement non-fluorescentes, quoique l'amplitude et même la direction du changement de fluorescence soient fortement dépendantes de la concentration du colorant et de ses caractéristiques structurales (Haugland, 1996). Plusieurs carbocyanines ont été essayées pour démontrer le potentiel de membrane et ses variations suite à un traitement par des agents hyper- ou dépolarisants (incluant aussi les antibiotiques et les antifongiques), et comprennent principalement les dérivés d'iodure d'oxacarbocyanine ($\text{DiOC}_2(3)$) : Mason et coll., 1995a ; Novo et coll., 1999. $\text{DiOC}_5(3)$: Ordonez et Wehman, 1993 ; Peyron et coll., 1997. $\text{DiOC}_6(3)$: Diaper et coll., 1992 ; Mason et coll., 1995a ; Liao et coll., 1999. $\text{DiOC}_7(3)$: Mason et coll., 1995a). Novo et coll. (1999) ont effectué un excellent travail, en expérimentant avec plusieurs cyanines (DiI, DiS et DiO) et avec l'oxonol $\text{DiBAC}_4(3)$, pour trouver un colorant (le $\text{DiOC}_2(3)$) : l'iodure de 3,3'-diéthylloxacarbocyanine) qui permet de mesurer très précisément, par cytométrie en flux, le potentiel membranaire bactérien.

Les acides bis-barbituriques oxonols sont des fluorochromes hydrophobiques chargés négativement qui s'attachent aux membranes et aux protéines intracellulaires des cellules dépolarisées, pour alors afficher une forte augmentation de fluorescence. L'hyperpolarisation a pour effet d'expulser ces sondes anioniques, donc de diminuer leur fluorescence (Haugland, 1996). Contrairement aux cyanines cationiques, les oxonols sont relativement non-toxiques, ils possèdent l'avantage de démontrer les changements

potentiométriques chez les bactéries sans aucun traitement de perméabilisation (par exemple avec l'EDTA) et, étant des anions, ils sont moins sujets à devenir des substrats pour les pompes à efflux, simplifiant ainsi l'interprétation des résultats de coloration (Davey et Kell, 1996).

Le bis-(acide 1,3-dibutylbarbiturique) triméthine oxonol (DiBAC₄(3)) est sans doute le plus populaire, compte tenu de son maximum d'excitation à 493 nm. Cette molécule s'est montrée très efficace et sensible pour rendre fluorescentes des cellules dépolarisées et perméabilisées. La sonde fut appliquée initialement sur des levures traitées avec un antifongique (Carter et coll., 1993), pour ensuite être essayée chez les bactéries (Mason et coll., 1994, 1995a et 1997a ; Jepras et coll., 1995 ; Deere et coll., 1995 ; Lopez-Amoros et coll., 1995 et 1997 ; Comas et Vives-Rego, 1997 et 1998 ; Nebevon Caron et coll., 1998).

3.3.3 Colorants de la chaîne respiratoire

Une autre catégorie de fluorochromes permettent de visualiser directement l'activité respiratoire des bactéries. Il s'agit de colorants du type sels de tétrazolium. Le chlorure de 2-(*p*-iodophényl)-3-(*p*-nitrophényl)-5-phényltétrazolium (INT) a souvent été utilisé pour observer directement, au microscope, les bactéries actives dans des échantillons environnementaux. Ce colorant rivalise avec l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électron dans la chaîne respiratoire. Le INT est alors réduit en un cristal rougeâtre insoluble, le INT-formazane, qui s'accumule dans les cellules métaboliquement actives (Rodriguez et coll., 1992 ; McFeters et coll., 1995 ; Walsh et coll., 1995).

Cependant, les cristaux d'INT-formazane ne sont pas fluorescents, alors un fluorochrome dérivé, le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium (CTC), a été développé. Ce nouveau composé a permis d'énumérer, dans des échantillons d'eau, les bactéries possédant une bonne activité respiratoire (Rodriguez et coll., 1992 ; Schaule et coll., 1993 ; Yu et McFeters, 1994 ; Pyle et coll., 1995), et a aussi servi de sonde pour évaluer la viabilité bactérienne (Walsh et coll., 1995 ; Lopez-Amoros et coll., 1997).

3.3.4 Colorants protéiques et substrats enzymatiques

La fluorescéine et ses dérivés (par ex : fluorescéine isothiocyanate «FITC»), qui réagissent avec les groupements amines, sont sûrement les réactifs fluorescents les plus utilisés, en microscopie et en cytométrie, pour marquer les protéines de façon covalente (Haugland, 1996). Par sa capacité à se lier aux protéines, la FITC a été combinée avec des anticorps pour une détection spécifique des bactéries. Cette application sera discutée plus loin (section 3.3.5).

Le contenu cellulaire en protéines peut donc être mesuré par la FITC (Hutter et Eipel, 1978 ; Steen et Boye, 1980b ; Porter et coll., 1995b). Une corrélation linéaire a aussi été remarquée entre la lumière recueillie par le détecteur frontal (FS) et l'intensité de fluorescence du FITC pour une population bactérienne en croissance exponentielle (Boye et Steen, 1993). Ce principe (ratio contenu protéique : grosseur cellulaire) fut appliqué pour la détermination rapide et directe de l'effet de différents antibiotiques sur *E. coli* (Durodie et coll., 1995b).

Une autre façon de déterminer l'activité cellulaire consiste en l'utilisation d'esters «fluorogéniques». Ces composés, initialement non fluorescents, sont chargés passivement à l'intérieur des cellules, pour être ensuite clivés par les estérases intracellulaires non-spécifiques. Les produits de cette hydrolyse affichent alors leur fluorescence et ne seront retenus qu'à l'intérieur des cellules ayant des membranes plasmiques intactes (Haugland, 1996). Ainsi, on considère ces composés comme étant des sondes de viabilité, puisqu'une cellule rendue fluorescente doit obligatoirement avoir un métabolisme actif et des membranes intactes (McFeters et coll., 1995).

Quatre substrats d'estérases, tous dérivés de la fluorescéine, ont été étudiés comme sonde de viabilité chez les bactéries (Diaper et Edwards, 1994 ; Porter et coll., 1995b ; Nexmann Jacobsen et coll., 1997) ; il s'agit de la fluorescéine diacétate (FDA) (Bercovier et coll., 1987 ; Diaper et coll., 1992 ; McFeters et coll., 1995), la carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) (Breeuwer et coll., 1994 ; Porter et coll., 1995a),

l'ester acétoxyméthyl de 2'-7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5(6)-carboxyfluorescéine (BCECF-AM), et l'ester acétoxyméthyl de calcéine (calcéine-AM) (Comas et Vives-Rego, 1998). Un autre ester fluorogénique, dont la composition est inconnue, est le ChemChrome B (Chemunex, Cambridge, UK) (Porter et coll., 1995a ; Clarke et Pinder, 1998). C'est ce dernier substrat qui semble avoir la capacité de colorer le plus grand nombre d'espèces bactériennes (Diaper et Edwards, 1994 ; Nexmann Jacobsen et coll., 1997).

3.3.5 Autres sondes

Dans une catégorie à part, on retrouve les additifs de lessive qui donnent un effet de blancheur aux vêtements par fluorescence, sous l'excitation des rayons UV. Des composés comme le «calcafluor white» et le Tinopal CBS-X (Ciba-Geigy, Macclesfield, UK) font partie de cette catégorie. Des chercheurs ont exploité le fait que, pour le calcafluor white, les cellules viables ont la capacité de rejeter ce colorant, alors que les cellules mortes vont l'accumuler et devenir fortement fluorescentes (Mason et coll., 1995a). Pour le Tinopal CBS-X, les cellules de différentes espèces bactériennes vont présenter des intensités variables de fluorescence, ce qui permet de les distinguer dans une population mixte (Davey et Kell, 1997). Cependant, le microscope ou le cytofluoromètre utilisé doit avoir la capacité de fournir une lumière excitatrice dans les longueurs d'ondes de l'ultraviolet.

On retrouve finalement deux autres catégories de sondes, permettant l'analyse des procaryotes en cytométrie, soit les anticorps et les séquences nucléotidiques conjuguées avec des fluorochromes (Davey et Kell, 1996). La disponibilité des anticorps monoclonaux a grandement contribué à l'utilité et la puissance de la cytométrie en flux. Steen et coll. (1982) avaient démontré la possibilité de combiner les techniques de l'immunofluorescence et de la cytofluorométrie en flux, afin de détecter spécifiquement certains antigènes dans une population bactérienne. De plus, ils ont remarqué que l'intensité de fluorescence émise par les anticorps conjugués était proportionnelle avec la grosseur de la cellule présentant l'antigène. La combinaison d'anticorps monoclonaux conjugués avec la FITC et d'iodure de propidium a rendu possible la détection et la

caractérisation de *Legionella* spp. (bactéries responsables de la maladie du légionnaire) dans l'eau des tours de refroidissement (Tyndall et coll., 1985), ainsi que la détection de *Listeria monocytogenes* dans le lait (Donnelly et Baigent, 1986). Avec une autre combinaison, cette fois avec le CTC, des auteurs ont décrit une méthode de détection du *E. coli* O157:H7, de *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* dans l'eau potable et les eaux usées (Pyle et coll., 1995). L'immunofluorescence par cytométrie en flux a aussi permis la détection des spores de *Bacillus anthracis* et *Legionella pneumophila* (Phillips et coll., 1987 ; Phillips et Martin, 1988), quoique certains problèmes de résolutions aient été soulevés (Phillips et Martin, 1988 ; Obernesser et coll., 1990).

Le suivi de population microbienne de l'environnement est réalisable par la technique de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) et possède plusieurs avantages, notamment la disponibilité des bases de données des séquences d'ARNr, la détection de microorganismes non cultivables, et la grande quantité d'ARNr par cellule. Ceci a donc propulsé l'utilisation d'oligonucléotides marqués par des fluorochromes, spécifiques pour des séquences d'ARNr 16S en cytométrie (Wallner et coll., 1993 ; Amann et coll., 1995 ; Thomas et coll., 1997 ; Fuchs et coll., 1998).

3.4 Applications de la cytométrie en microbiologie clinique

La cytométrie en flux a été appliquée avec succès en microbiologie afin de détecter, d'identifier, d'évaluer la viabilité et l'état physiologique de souches connues et de microorganismes retrouvés dans des échantillons environnementaux.

Ces applications sont très intéressantes pour la microbiologie clinique, où le besoin d'augmenter les capacités d'analyse et de diminuer le temps d'obtention de résultats d'identification et de sensibilité, se justifie par un plus grand nombre de vies humaines sauvées, ainsi qu'une baisse des frais hospitaliers directs et indirects (Doern et coll., 1994).

En milieu clinique, la détection et la détermination de sensibilité aux antimicrobiens est longue et problématique pour certains microorganismes pathogènes. Aussi, il peut être essentiel d'évaluer la viabilité des microbes récupérés. Des méthodes par cytométrie furent développées pour détecter, dans les échantillons fécaux, les oocystes du *Cryptosporidium parvum* (Valdez et coll., 1997) et les entérobactéries anaérobiques (Van der Waaij, et coll., 1994), et pour déterminer la viabilité du *Trichomonas vaginalis* (Humphreys et coll., 1994). Il a été aussi possible d'évaluer l'efficacité d'agents antimicrobiens sur des organismes difficilement cultivables, comme les bactéries causant l'acné (Arrese et coll., 1998), le *Rickettsia* (Kelly et coll., 1995), et le *Borrelia burgdorferi* (Liu et coll., 1994).

Steen et coll. (1982) ont été les premiers à démontrer les possibilités de la cytométrie en flux comme méthode de mesure de sensibilité aux antibiotiques. Ces efforts initiaux étaient alimentés par les avantages présumés offerts par la cytométrie ; précision, vitesse, sensibilité et reproductibilité. La cytométrie était donc une méthode prometteuse pour les applications en microbiologie expérimentale et clinique (Boye et coll., 1983). Un petit nombre d'auteurs ont poursuivi la recherche, afin de déterminer des tests de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF) rapides et fiables, suivant les améliorations techniques des cytomètres et l'identification de meilleures sondes de viabilité et de mortalité fluorescentes. Une excellente revue sur le développement et la situation du TSA-CMF a été écrite par Pore (1994).

Une autre publication de Steen et coll. (1986) faisait état de l'observation d'effets significatifs du chloramphénicol et de la pénicilline sur le cycle cellulaire, la morphologie et le nombre de cellule, en moins d'une heure d'incubation avec *E. coli*. Mais cette découverte n'a entraîné que peu de réactions autant chez les spécialistes de la cytométrie en flux que chez les microbiologistes cliniques (Pore, 1994). Cohen et Sahar (1989) ont décrit une méthode rapide pour détecter les bactéries dans des échantillons cliniques de pus et de liquides corporels, en utilisant le BrEt. Ils rapportent également la possibilité de détecter en une heure, la sensibilité des bactéries à l'antibiotique amikacin.

Deux études, publiées en 1993, furent importantes pour le développement des TSA-CMF. La première, par Gant et coll. (1993), démontra, à l'aide d'un cytomètre commercial au laser, le FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA), et de l'iodure de propidium (PI), les effets de différents antibiotiques (gentamicine, ampicilline, mecillinam, cefotaxime et ciprofloxacine) sur *E. coli*. Après trois et six heures d'incubation avec ces antibiotiques, ils ont observé différents changements dans la lumière dispersée au détecteur frontal (la grosseur des cellules), au détecteur de côté (la granularité cytoplasmique), ainsi que l'augmentation de la fluorescence rouge pour le PI. Bien que les antibiotiques utilisés n'exercent pas directement leurs actions sur la membrane cytoplasmique, Gant et coll. (1993) ont réussi à démontrer que les agents bactéricides, peu importe leurs cibles cellulaires, vont éventuellement causer des dommages à la membrane. Une autre indication importante de la sensibilité aux antibiotiques était la diminution du nombre de cellules dans les échantillons traités aux antibiotiques, par rapport au nombre de bactéries dans l'échantillon témoin. L'autre étude, par Ordonez et Wehman (1993), utilisait également le FACScan pour analyser des échantillons de *S. aureus*, incubés pendant 90 minutes avec de la pénicilline ou de l'oxacilline. Cependant, ils utilisèrent une sonde potentiométrique, le DiOC₅(3), prouvant encore une fois que l'action d'un antibiotique, sur un organisme sensible, a des répercussions sur le potentiel membranaire. Les auteurs ont corrélé les résultats du TSA-CMF avec ceux des tests de diffusion par disques, en utilisant des souches de référence et de sensibilités inconnues.

À partir de 1994, plusieurs chercheurs étudièrent l'application du TSA-CMF sur différents organismes, avec de multiples combinaisons de sondes fluorescentes, et d'agents antimicrobiens. Mason et coll. (1994) ont établi un TSA-CMF en observant les paramètres morphologiques (lumière recueillie par la photodiode FS, proportionnelle au volume cytoplasmique) et la fluorescence pour le DiBAC₄(3) du *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*, suite à l'incubation (de 2 à 5 h) avec les antibiotiques ampicilline, gentamicine et ciprofloxacine. Durodie et coll. (1995b) ont choisi d'utiliser le ratio du contenu protéique (par coloration au FITC) par rapport à la grosseur des cellules (intensité lumineuse du FS), pour détecter les effets de cinq antibiotiques sur *E. coli*.

Walberg et coll. (1996 et 1997a), quant à eux, ont utilisé la combinaison de la mithramycine et du bromure d'éthidium. Par cette technique, ils ont réussi à distinguer les deux populations d'*E. coli* et de *Klebsiella pneumoniae* incubés avec l'ampicilline dans une co-culture (Walberg et coll., 1997b). Chez Molecular Probes (Eugene, OR), Roth et coll. (1997) ont démontré l'efficacité de leur produit, le SYTOX Green, comme marqueur de mortalité dans un TSA-CMF et en quantifiant l'effet de l'ampicilline sur *E. coli*. Finalement, Suller et Lloyd ont étudié récemment (1999) les dommages causés à des isolats cliniques de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* par la ceftazidime, l'ampicilline et la vancomycine, respectivement, en essayant les fluorochromes DiBAC₄(3), SYTOX Green, CTC et le BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes). Il est intéressant de noter que plusieurs groupes de recherche ont identifié, durant les quatre dernières années, le DiBAC₄(3) et l'iodure de propidium (PI) comme étant des sondes fluorescentes fiables et efficaces pour évaluer les mécanismes d'action des composés antibactériens (Mason et coll., 1995b et 1997a ; Sheppard et coll., 1997 ; Jepras et coll., 1995 et 1997 ; Deere et coll., 1995 ; Comas et Vives-Rego, 1995 et 1997).

Il y a eu aussi un intérêt pour évaluer rapidement la sensibilité des levures (entre autres, le *Candida albicans*) aux antifongiques (Green et coll., 1994 ; Wenisch et coll., 1997 ; Ramani et coll., 1997 ; Kirk et coll., 1997 ; Peyron et coll., 1997 ; Liao et coll., 1999), et aussi la sensibilité du *Mycobacterium tuberculosis* aux agents tuberculostatiques (Bercovier et coll., 1987 ; Kirk et coll., 1998 ; Moore et coll., 1999).

4. Infections urinaires

En milieu hospitalier, la plus grande portion de la charge de travail du laboratoire de microbiologie est accaparée par l'analyse des échantillons urinaires (Oakes et coll., 1994). Au Canada et aux États-Unis, plus de 8 millions de visites médicales par année sont attribuables à des patients souffrant d'infections des voies urinaires (IVU). Environ 300 000 patients vont développer des pyélonéphrites (l'infection des reins) aiguës à chaque année, nécessitant souvent l'hospitalisation. Les IVU sont aussi la principale cause de septicémies à bactéries Gram-négatives en milieu hospitalier, pouvant trop

souvent mener à la mort les patients cathétérisés (Bergeron, 1997). L'impact économique de la gestion des IVU est énorme ; plusieurs milliards de dollars sont dépensés annuellement aux États-Unis seulement ! (Patton et coll., 1991).

4.1 Causes et caractéristiques

Les IVU sont divisées en trois grandes parties : 1) les IVU asymptomatiques, 2) les IVU symptomatiques supérieures (infections des reins «pyélonéphrites», des bassins rénaux «pyérites» et des uretères «urétrites»), et 3) les IVU symptomatiques inférieures (infections de la vessie «cystites» et de l'urètre «urétrites»). Les cystites et urétrites sont les infections que l'on rencontre le plus souvent et elles sont régulièrement associées. La pyélonéphrite est moins courante, et beaucoup plus dangereuse (Reddy, 1999).

Les voies urinaires peuvent être infectées par deux routes : 1) la route descendante, où les bactéries circulant dans le sang réussissent à pénétrer dans les reins, et 2) la route ascendante, où les bactéries entrant par l'urètre cheminent vers la vessie. Les infections provenant de la route descendante sont assez rares. Les personnes qui doivent recevoir un cathéter (un tube) dans la vessie pour une période de temps prolongée sont particulièrement à risque pour développer une infection urinaire. Les femmes sont généralement plus à risque pour contracter une IVU, à cause de leur urètre plus court et à proximité de l'anus. Aussi, la grossesse provoque une pression sur la vessie et les uretères, facilitant alors l'ascension des bactéries. Toute personne immunodéficente, les personnes âgées et les personnes possédant des malformations anatomiques sont également à risque (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases NIDDK, 1991). Chez les hommes, l'hypertrophie de la prostate et la présence de calculs rénaux sont des facteurs prédisposants (Koneman et coll., 1997). Malgré tout, les IVU se déclarent souvent chez des personnes saines, d'anatomie normale, sans aucun facteur prédisposant (Warren, 1996).

Le microorganisme qui cause 80 % des cas non-complicés d'IVU est *Escherichia coli*. Le reste est dû à un nombre limité de microbes opportunistes

(*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *S. epidermidis*) (Warren, 1996). Les isolats expriment généralement des facteurs de virulence, notamment les fimbriae P et les pili de type 1 (Donnenberg et Welch, 1996). Ces pili permettent l'adhésion des bactéries sur les cellules épithéliales du système urinaire (figure 5).

Une IVU sera compliquée lorsque : 1) le patient possède un système urinaire anormal, ou 2) celui-ci est sensible (prédisposé) à l'infection. Le spectre d'agents infectieux est alors élargi (*Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* groupe B, *Mycoplasma hominis*, *Haemophilus influenzae*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, levures) (Bergeron, 1997 ; Gorbach et coll., 1997 ; Laverdière et Restieri, 1999). De plus, la réponse du patient à l'antibiothérapie est incertaine et ce dernier risque une ou plusieurs rechutes (Warren, 1996).

Figure 5 : Cellules d'une souche d'*E. coli* uropathogène, exprimant des pili de type 1, adhérant aux cellules épithéliales du système urinaire.

(© Tirée de Hopkin, 1999)



4.2 Traitement

Le médecin doit être capable d'ajuster l'antibiothérapie selon la situation clinique particulière à chaque patient, afin d'obtenir l'efficacité maximale, de diminuer les coûts du traitement et de garder les effets néfastes reliés à l'utilisation d'agents antimicrobiens (allergies, résistance) au minimum. Pour atteindre ces objectifs, le clinicien doit s'assurer de tracer le tableau complet de l'historique et des symptômes de son patient, d'être familier avec les antibiotiques couramment utilisés ainsi que les lignes directrices de leur utilisation, et finalement, du patron géographique local de la sensibilité aux antimicrobiens (Johnson, 1996b).

Les trois types d'IVU (asymptomatiques, symptomatiques supérieures et inférieures) sont traités différemment. Le tableau 3 résume les prophylaxies habituelles pour ces types d'IVU.

Tableau 3 : Prophylaxie habituelle des infections des voies urinaires (IVU).

Situation clinique	Prophylaxie	
	Premier choix	Alternatives
Bactériurie asymptomatique	Aucun traitement	Antibiothérapie indiquée en cas de grossesse ou de diabète
IVU non compliquée inférieure (cystite aiguë et urétrite)	TMP-SMX (oral) ou Céphalosporine (ex: Cephalexin)	Ciprofloxacine (oral) ou Triméthoprim ou Amoxicilline
IVU non compliquée supérieure (pyélonéphrite aiguë)	Cefazolin (iv) + Nétilmicine (iv) ou Ciprofloxacine (oral) ou Ceftriaxone (iv)	Ciprofloxacine (iv) ou TMP-SMX (iv). Si <i>P. aerug.</i> : Pipéracilline ou Ceftazidime +/- Nétilmicine
IVU compliquée	Pipéracilline (iv) et Nétilmicine (iv) ou TMP-SMX ou Nitrofurantoïne	Ciprofloxacine (oral-iv) ou Imipénem (iv)

(Adapté de Demers et coll., 1997)

Le traitement des IVU se base traditionnellement sur les résultats des cultures quantitatives des échantillons d'urine et des profils de sensibilité aux antibiotiques pour les isolats significatifs cultivés. Cette approche est suivie pour les cas d'IVU

descendantes (envahissante), les IVU compliquées et les infections des patients suivant déjà une antibiothérapie. Cependant, à cause de la prévisibilité de la flore et des patrons connus de sensibilité aux antibiotiques pour chaque pathogène, plusieurs autorités médicales recommandent d'abroger les cultures d'urines dans les cas de cystites non compliquées chez les femmes, en faveur de tests de dépistage plus rapide et moins coûteux, comme les bâtonnets détectant le nitrite et les estérases leucocytaires (Smaill et coll., 1998), ou l'observation microscopique de l'urine (Johnson, 1996b). Dans cette situation, l'antibiothérapie devient empirique, et suit les règles de la probabilité.

Dans les situations cliniques urgentes, comme la pyélonéphrite ou l'IVU descendante (systémique envahissante), il devient essentiel non seulement de détecter rapidement les micro-organismes dans l'urine, mais aussi de commencer immédiatement le traitement aux antibiotiques. Le contexte clinique dicte alors le choix de l'antibiothérapie initiale, ce choix pouvant ensuite être ajuster à la réception (au minimum 48 h plus tard) des résultats de culture et de sensibilité (Bergeron, 1997).

4.3 Diagnostic

L'urine est un liquide corporel normalement stérile. Cependant la présence de minéraux et de sucres peut favoriser la croissance bactérienne (NIDDK, 1991 ; Reddy, 1999). Des facteurs d'adhésion (ex : fimbriae) permettront aux souches uropathogènes d'infiltrer et de se multiplier dans l'épithélium urinaire (figure 5), causant alors l'inflammation (Agace et coll., 1996). Les signes et symptômes annonçant une IVU sont les suivants : fièvre, frissons, douleur aux flancs (surtout pour les IVU supérieures), besoin fréquent d'uriner, douleur (sensation de brûlure) lors de la miction et douleur supra-pubienne, apparence et odeur particulière de l'urine (Koneman, 1997).

La détection des microorganismes dans l'urine est nécessaire pour déterminer avec certitude l'étiologie de la maladie. Beaucoup de soin doit être apporté à la collecte et au transport des échantillons, afin d'éviter la contamination des échantillons (Eisenstadt et Washington, 1996). Habituellement, la détection et l'analyse de la sensibilité des

bactéries se font en deux étapes de culture sur géloses nutritives (voir la section 2.1 : Méthodes conventionnelles), la première étant une culture semiquantitative (critère : une concentration supérieure ou égale à 10^5 UFC/ml) et sélective, (par l'utilisation de géloses sang et MacConkey), alors que la deuxième s'effectue à partir de colonies isolées, incubées sur gélose, en présence de disques diffusant les antibiotiques choisis (Laverdière et Restieri, 1999).

Les méthodes rapides de détection et de sensibilité aux antibiotiques (voir la section 2.3 : Méthodes rapides) ne sont pas encore appliquées à grande échelle. Cependant, elles contribueraient globalement à des économies substantielles, à améliorer la qualité de vie des patients et surtout, à prévenir la dissémination de résistance (Doern et coll., 1994 ; Bergeron et Ouellette, 1998 ; Barenfanger et coll., 1999).

4.4 Analyse d'échantillons urinaires par cytométrie en flux

L'idée d'utiliser un compteur de particule pour analyser le contenu des urines date de plus de 20 ans. En 1977, Smither proposa une méthode pour dépister les bactériuries significatives dans des échantillons cliniques d'urine, à l'aide d'un Coulter Counter. Alexander et coll. (1981) suivirent, en étudiant le compte de bactéries dans les urines et, parallèlement, le volume des cellules comptées. Van Dilla et coll. (1983) ont analysé le contenu en ADN des cellules d'*E. coli*, de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* recueillies à partir d'échantillons d'urines infectées, à l'aide d'un cytomètre en flux de leur conception.

L'examen microscopique des sédiments urinaires est requis dans plusieurs situations cliniques. Ce travail est laborieux et subjectif ; la cytométrie en flux a donc été proposée pour accomplir cette tâche. Après une transplantation de rein, il est possible de déterminer rapidement et d'une manière non-envahissante, les possibilités de rejet ou d'infection, par l'analyse du sédiment d'urine, en cytométrie en flux (Gomez Jorge, 1991). Le groupe de Yasui et coll. (1995) ont évalué la performance d'un cytomètre modifié, bâti autour du Sysmex R-1000 (TOA Medical Electronics Co., Kobe, Japon), à analyser les sédiments d'urine. Le même cytomètre modifié fut utilisé pour détecter les

globules rouges dans l'urine et déterminer leur origine. Ainsi, Hyodo et coll. (1996) ont démontré que les globules rouges retrouvées dans l'urine des personnes saines proviennent des glomérules rénaux. Ce cytomètre modifié spécifiquement pour l'examen des composantes urinaires était le prototype du Sysmex UF-100. Le UF-100 (Sysmex, Corp., Long Grove, IL) est un cytomètre entièrement automatisé qui effectue une analyse microscopique des cellules retrouvées dans les échantillons d'urine. À partir d'un rayon laser, il recueille la lumière dispersée (mesurant la taille des particules), l'impédance électrique (mesurant le volume des particules) et la fluorescence émise, suite à la coloration automatisée par deux colorants ; une phénanthridine pour colorer l'ADN et une carbocyanine pour les membranes, permettant la discrimination du type cellulaire (Ben-Ezra et coll., 1998 ; Fenili et Pirovano, 1998 ; Langlois et coll., 1999).

Finalement, Mason (1998a) a suggéré de remplacer le dépistage microscopique des bactéries dans les échantillons cliniques d'urine par une analyse plus rapide et moins subjective, la cytométrie en flux. Plusieurs études ont été réalisées par cet auteur, notamment sur les effets de l'ampicilline, la gentamicine, le ciprofloxacine (Mason et coll., 1994 et 1995b), et du peptide antimicrobien CAP18₁₀₆₋₁₃₇ sur les bactéries (Mason et coll., 1997a), grâce au cytomètre Bryte[®] HS (Bio-Rad) et les fluorochromes DiBAC₄(3) et PI. Il a été démontré que, lors d'une incubation avec un agent antimicrobien dont la concentration ou le temps d'exposition sont croissants, le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) diminuait, parallèlement à l'augmentation du nombre de cellules fluorescentes pour l'iodure de propidium ou le DiBAC₄(3), indiquant respectivement les répercussions de l'agent antimicrobien en question sur l'intégrité et le potentiel membranaire des bactéries. Les résultats de ces expériences laissent entrevoir la possibilité d'une application éventuelle de la cytométrie en flux dans les analyses microbiologiques de routine en milieu clinique, notamment sur les échantillons urinaires. Mason (1998a) proposa donc une analyse initiale des urines en cytométrie, afin d'obtenir rapidement un compte précis des divers éléments contenus dans le sédiment urinaire (micro-organismes, globules blancs, globules rouges, cellules épithéliales, particules néphrétiques). La faisabilité de cette technologie pour évaluer directement la sensibilité aux antibiotiques des bactéries dans les échantillons cliniques reste à évaluer.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes

Les expériences préliminaires furent effectuées à partir de souches provenant du laboratoire du Dr Richard Villemur ou du service de microbiologie appliquée (Guy McSween), à l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, QC).

Souches pour expériences préliminaires :

<i>Escherichia coli</i> LE392	<i>Proteus mirabilis</i> LSPQ 3700 /
<i>Escherichia coli</i> CC118 pUTminiTn5Km	ATCC 12453
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>Staphylococcus hominis</i> (souche P1)
<i>Proteus mirabilis</i> LSPQ 3402	

Les souches bactériennes ayant servi à optimiser et à évaluer le test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF) étaient fournies par le Département de microbiologie et d'infectiologie du CHUM Pavillon Maisonneuve-Rosemont (HMR) (Montréal, QC). Vingt-quatre isolats d'infections de voies urinaires (IVU), dix-neuf échantillons d'urine infectée et six souches témoins de l'American Type Culture Collection (ATCC) furent étudiés. Les échantillons d'urine (de 2 à 15 ml) étaient conservés dans des tubes ou des pots stériles, à 4°C pendant une période de temps n'excédant pas 24 h, afin de sélectionner, pour analyses subséquentes, les urines comportant un nombre significatif (10^5 UFC/ml ou plus) de microorganismes.

Isolats urinaires cliniques :

<i>Escherichia coli</i> (11 souches)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1 souche)	(1 souche)
<i>Proteus mirabilis</i> (1 souche)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1 souche)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2 souches)	<i>Staphylococcus coagulase-négatif</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> (2 souches)	(1 souche)
<i>Staphylococcus aureus</i> (4 souches)	

Souches présentes dans les échantillonscliniques :*Escherichia coli* (13 souches)*Klebsiella pneumoniae* (4 souches)*Proteus mirabilis* (1 souche)*Enterococcus sp.* (1 souche)Souches de l'ATCC :*Escherichia coli* ATCC 25922*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853*Enterococcus faecalis* ATCC 29212*Enterococcus faecalis* ATCC 51299*Staphylococcus aureus* ATCC 29213*Staphylococcus aureus* ATCC 43300**2. Antibiotiques**

Douze antibiotiques furent utilisés:

- AP : ampicilline (ICN, Mississauga, ON)
- CB : carbénicilline (Pharmacie de HMR, Montréal, QC)
- CT : ceftriaxone (Hoffman-La Roche, Mississauga, ON)
- CZ : ceftazidime (Lilly Canada, Scarborough, ON)
- GE : gentamicine (ICN)
- NI : nitrofurantoïne (Sigma Chemicals, St-Louis, MI)
- NO : norfloxacin (Sigma)
- OX : oxacilline (Sigma)
- PG : pénicilline G (Sigma)
- TR : tétracycline (ICN)
- TS : triméthoprim (TMP) / sulfaméthoxazole (SMX) 1/19 (Sigma)
- VA : vancomycine (Sigma).

Les solutions concentrées (5 mg/ml) de ces antibiotiques ont été préparées avec de l'eau MilliQ (deminéralisée et filtrée 0.2 µm), sauf pour les antibiotiques AP, CT, NI, NO, TR, TMP et SMX, qui ont nécessité des solvants et/ou des diluants autres que l'eau, tels que décrit par le NCCLS : tableau 4 du document M100-S9 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA). Toutes les solutions concentrées furent conservées à -20°C.

3. Détermination de la sensibilité

Les profils de sensibilité ont été obtenus pour chacune des souches bactériennes étudiées, selon trois méthodes reconnues ; l'antibiogramme par disques, la microdilution liquide et la capacité de croissance sur géloses nutritives (Woods et Washington, 1995).

3.1 Antibiogramme par disques

L'analyse de sensibilité des souches cliniques, par diffusion en milieu solide, a été effectuée uniquement par le laboratoire de microbiologie à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR), en suivant les lignes directrices du NCCLS (document M2-A6 : Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - Sixth Edition ; Approved Standard, 1997). Les interprétations de sensibilité pour chaque isolat (S «sensible», I «intermédiaire» ou R «résistant») nous étaient retransmises de 36 h à 72 h, après la cueillette des isolats ou des spécimens d'urine (Laverdière et Restieri, 1999).

Le Département de microbiologie de l'HMR a établi une liste de douze antibiotiques à tester dans la méthode de diffusion par disques, contre les bactéries Gram-négatives isolées dans les urines. Parmi ceux-ci, six correspondaient aux antibiotiques disponibles pour notre étude, soit l'AP, la CT, la CZ, la NI, le NO et le TS. Pour les bactéries Gram-positives rencontrées dans les échantillons urinaires, HMR a choisi de tester les antibiotiques NI, NO, OX, PG, TS et VA par la méthode d'antibiogrammes. Par conséquent, la comparaison des résultats de nos expériences avec ceux des tests de sensibilité par disques ne fut effectuée que pour les antibiotiques correspondants.

3.2 Microdilution liquide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) furent testées sur toutes les souches bactériennes, à l'aide de la méthode officielle du NCCLS (document M7-A4 : Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow

Aerobically – Fourth Edition ; Approved Standard, 1997) de dilution liquide en microplaques.

L'inoculum a été préparé par la technique directe (culture en phase stationnaire) ; un nombre suffisant de colonies, ayant poussé (18 à 24 h / 35°C) sur des géloses Trypticase Soy Agar (40 g/l de poudre TSA dans H₂O MilliQ) (Difco Laboratories, Detroit, MI), furent dispersées dans 5 ml de bouillon Mueller Hinton supplémenté avec cations (MHSC : 22 g/l de poudre MH dans H₂O MilliQ + 50 mg/l CaCl₂ + 20 mg/l MgCl₂, pH = 7.3) (BBL, BD Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ), pour obtenir une turbidité égale à un standard 0.5 McFarland (0.05 ml de BaCl₂ 1% + 9.95 ml H₂SO₄ 1%) (Smibert et Krieg, 1994). L'inoculum a été alors dilué 1/100 avec du MHSC et 50 µl a été ajouté à l'aide d'une pipette multi-canaux dans chaque puits d'une microplaque stérile FALCON[®] 96 puits Microtest[™] à fond plat, avec couvercle (Becton Dickinson Labware, Oakville, ON), contenant 50 µl des dilutions d'antibiotiques (dans du MHSC). La concentration finale de bactéries était aux alentours de 5x10⁵ UFC/ml. Pour les contrôles de stérilité et de croissance, certains puits sur chaque plaque n'ont reçu que 100 µl de MHSC ou 50 µl MHSC + 50 µl d'inoculum. Les plaques furent incubées à 35°C, de 16 à 24 h. La CMI a été définie comme étant la plus faible dilution d'antibiotique qui a réussi à inhiber complètement la croissance bactérienne. La croissance correspondait à une turbidité visible ou un sédiment dans le puits (Power et McCuen, 1988).

3.3 Croissance sur géloses nutritives

La viabilité bactérienne a été évaluée et quantifiée par la technique conventionnelle d'unités formatrices de colonies (UFC). Un volume de 10 µl a été prélevé d'un échantillon et déposé dans 990 µl de solution saline tamponné au phosphate (PBS) (solution concentrées 10X : 10 mM Na₂HPO₄ + 10 mM NaH₂PO₄ + 130 mM NaCl, pH = 7.2). Cette dilution 10⁻² pouvait être conservée quelques heures sur glace. D'autres dilutions (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) ont pu être effectuées à partir de la dilution 10⁻², dans du PBS stérile, afin d'obtenir entre 10 et 1000 colonies. Cent µl des dilutions

choisies ont été étalés sur des géloses TSA, à l'aide de 4 ou 5 billes de verres (5 mm) stériles. Les géloses furent incubées à 35°C, de 16 à 24 h.

4. Fluorochromes

Plusieurs fluorochromes furent évalués :

- SYTO 9 et PI (iodure de propidium) constituant la trousse LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit
- SYTO 16
- SYTOX Green
- YOYO-1
- CFDA (5-carboxyfluorescéine diacétate)
- Rh123 (rhodamine 123)
- DiOC₅(3) (3,3'-dipentyloxacarbocyanine iodide)
- DiBAC₄(3) (bis-(1,3-acide dibutylbarbiturique) triméthine oxonol)

Tous ces fluorochromes provenaient de Molecular Probes (Eugene, OR). Cependant, lorsque l'iodure de propidium fut utilisé seul ou en combinaison avec d'autres sondes que le SYTO 9, le fournisseur était Sigma Chemicals (St. Louis, MI).

Certains fluorochromes étaient vendus en poudre et d'autres en solution. Le tableau 4 énumère la liste des solvants, des diluants et des concentrations pour préparer les solutions concentrées. Les poudres et les solutions concentrées furent conservées à l'obscurité, à 4°C ou - 20°C.

Tableau 4 : Liste des solvants, des diluants et des concentrations pour les solutions concentrées des fluorochromes utilisés.

Fluorochromes	Solvants	Diluants (si autres que solvants)	Concentrations (sol. concentrées)
PI (Sigma)	H ₂ O		1.5 mM (1 mg/ml)
PI (kit <i>BacLight</i>)	DMSO		20 mM
SYTO 9 (kit <i>BacLight</i>)	DMSO		3.34 mM
SYTO 16	DMSO		1 mM
SYTOX Green	DMSO		5 mM
YOYO-1	DMSO		1 mM
CFDA	DMSO		21.7 mM (10 mg/ml)
Rh123	MeOH		2.6 mM (1 mg/ml)
DiOC ₅ (3)	DMSO	MeOH	1 mM
DiBAC ₄ (3)	DMSO	EtOH	2 mM (1 mg/ml)

4.1 Protocoles d'incubation

Les protocoles de colorations ont été établis pour chaque fluorochromes et combinaisons utilisés. Ainsi, pour la trousse *BacLight*[™], après avoir décongeler à température de la pièce (T°p) les deux tubes de colorants, ils ont été centrifugés brièvement, afin de déposer les cristaux non dissous au fond des tubes. Les deux fluorochromes ont alors été dilués avec du MeOH (99.9%) ; le SYTO 9 a été dilué 1/20 et le PI, 1/10. Lorsque les colorants furent utilisés indépendamment, alors 1.5 µl de chacun étaient incorporés dans les échantillons de bactéries lavés par centrifugation (13 000 x g, 2 min) et resuspendus dans 1 ml de PBS pré-filtré à 0.2 µm (pour arrêter l'action de l'antibiotique sur les cellules et éviter toute interaction chimique entre les molécules d'antibiotique et de fluorochrome). Lors d'une coloration double, les deux dilutions ont été d'abord mélangées en proportions égales dans un tube, puis, 3 µl de cette mixture ont été ajoutés à chaque 1 ml d'échantillon bactérien lavé. L'incubation s'est déroulée à la noirceur, à T°p, pendant 15 min.

Les solutions mères de SYTO 16, de SYTOX Green et de YOYO-1 furent d'abord décongelées à T°p, puis centrifugées brièvement. Les cellules ont été, après traitement aux agents antimicrobiens, centrifugées et remises en suspension dans 1 ml de PBS, contenant soit 2 µM de SYTO 16, 5 µM de SYTOX Green ou 0.1 µM de YOYO-1. L'incubation n'a duré que 5 minutes (T°p / noirceur).

Le protocole de coloration au CFDA fut particulier à cause du mécanisme de cette sonde ; la coloration dut se dérouler avant le traitement des bactéries aux agents antimicrobiens. Les cellules ont d'abord été centrifugées, puis remises en suspension dans 1 ml de tampon TE (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH = 8) contenant 100 µg/ml de CFDA. Le tampon TE facilite le chargement du CFDA dans les cellules (Diaper et Edwards, 1994). L'incubation s'est déroulée pendant 1 heure, à la noirceur et à 37°C. Les échantillons ont été lavés (par centrifugation et resuspension) dans 1 ml de PBS filtré.

Pour la rhodamine123 (Rh123), les bactéries ont aussi été centrifugées (13 000 x g, 2 min), puis remises en suspension dans 1 ml de tampon TE contenant 5 µg/ml de Rh123. Cependant, l'incubation (30 min / 37°C / noirceur) s'est déroulée après le traitement aux agents antimicrobiens. Les cellules furent ensuite lavées au PBS filtré.

Les protocoles d'incubations pour les sondes potentiométriques DiOC₅(3), DiBAC₄(3), ainsi que le colorant d'acide nucléique PI, furent assez similaires et très simples. Les échantillons ont été centrifugés (13 000 x g, 2 min) et resuspendus dans 1 ml de PBS contenant soit 0.5 µM de DiOC₅(3), 10 µg/ml de DiBAC₄(3) ou 10 µg/ml de PI. Les incubations se sont déroulées à la noirceur et à T°p, pour 5 minutes (DiOC₅(3)) ou 10 minutes (DiBAC₄(3) et PI). Ainsi, pour la combinaison DiBAC₄(3) + PI, les culots d'échantillons ont été remis en suspension dans 1 ml de PBS contenant 10 µg/ml de DiBAC₄(3) plus 10 µg/ml de PI, et incubés 10 min / T°p / noirceur. Nous avons choisi cette combinaison pour les tests d'optimisation (cinétiques : différentes concentrations / différents temps d'incubation) et le protocole final de TSA-CMF.

4.2 Témoins

Afin de vérifier l'efficacité de coloration, différents échantillons témoins ont été conçus. Trois témoins sont essentiels dans un test de viabilité en fluorométrie : un échantillon de cellules vivantes non-colorées (témoin pour l'autofluorescence des bactéries), un échantillon de cellules vivantes (non-traitées aux antibiotiques) colorées et un échantillon coloré de cellules mortes ou endommagées.

Plusieurs traitements pour endommager les cellules furent essayés. Ceux-ci comprenaient la resuspension d'un culot de bactéries dans 1 ml d'éthanol (EtOH) 70 % (Anachemia, Montréal, QC) pendant 5 minutes, ou dans 1 ml de PBS + 20 µg/ml de Gramicidin S (Sigma) pour 2 minutes. Une autre technique consistait à incuber un échantillon de bactéries en phase de croissance dans un bain-marie ou un chauffe-module (Baxter) à 70°C, pendant 20 minutes. Ces traitements visaient principalement à perméabiliser les membranes cellulaires. Le témoin de mortalité à l'éthanol 70 % fut le plus utilisé.

5. Paramètres d'incubation avec les antibiotiques

Le maintien des cultures et la préparation des inoculums se sont effectués selon les recommandations du NCCLS (document M7-A4). Cependant, les expériences préliminaires (Essais des fluorochromes, Résultats section 1) se sont déroulées avec le milieu de culture Luria-Bertani (LB) (Difco). Toutes les expériences, par la suite, ont été effectuées avec milieu Mueller-Hinton supplémenté avec cations (MHSC) (BBL).

5.1 Culture de départ

Les souches bactériennes étaient conservées dans du glycérol 15 %, à - 70°C. Les isolats cliniques et les bactéries recueillies dans les échantillons urinaires furent également conservés de cette façon, après les analyses.

Pour les expériences préliminaires, une colonie bactérienne, issue d'un repiquage sur gélose TSA (18 h / 37°C) a été transférée dans 5 ml de bouillon LB, puis les cellules ont été ré-incubées à 37°C avec agitation (250 rpm) pour environ 2 h, afin d'obtenir une croissance en phase exponentielle.

Pour les expériences subséquentes, une à trois colonies, obtenues après un repiquage sur géloses TSA (18 h / 35°C), ont été transférées dans 5 ml de bouillon MHSC, de une à deux heures, à 37°C, avec agitation (250 rpm), afin d'obtenir une légère turbidité dans le milieu de culture. Dans le cas des échantillons cliniques d'IVU, 100 µl d'urine ont été transférés dans 4.9 ml de bouillon MHSC et incubés par la suite, pendant environ deux heures (37°C / 250 rpm).

5.2 Inoculum initial

La turbidité des cultures en phase exponentielle a été ajustée à un standard de turbidité de 0.5 McFarland, ce qui correspond à une concentration bactérienne d'environ 10^8 UFC/ml (Power et McCuen, 1988). Avant l'incorporation des bactéries dans le milieu contenant les antibiotiques, une première dilution 1/5 dans du bouillon nutritif (LB ou MHSC) a été effectuée. Ensuite, 500 µl de bactéries ont été mélangés avec 500 µl d'antibiotique, résultant en une dilution totale de 1/10, soit une concentration variant entre 5×10^6 et 1×10^7 UFC/ml.

5.3 Optimisation de la concentration des antibiotiques

La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 fut la seule utilisée lors des expériences de cinétiques (différentes concentrations / différents temps d'incubation) avec les antibiotiques ampicilline, ceftriaxone, gentamicine, nitrofurantoïne, norfloxacin et triméthoprim/sulfaméthoxazole.

Pour chaque antibiotique, huit concentrations (incluant 0 µg/ml) en série ont été testées. Les dilutions en série ont été effectuées de manière à obtenir trois concentrations

d'antibiotique inférieures à la CMI pour le *E. coli* ATCC 25922 et trois concentrations supérieures à cette CMI (ex : *E. coli* ATCC 25922, CMI pour le norfloxacine = 0.03 µg/ml ; concentrations de norfloxacine testées : 0.004, 0.008, 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 µg/ml). L'activité sous-inhibitrice (concentrations inférieures à la CMI) de l'ampicilline sur *E. coli* LE392 et de la gentamicine sur *P. aeruginosa* 57RP a également été évaluée.

5.4 Optimisation du temps d'incubation

En utilisant deux concentrations d'antibiotiques (la CMI et quatre fois la CMI), sept temps d'incubation ont été testés : 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h et 4 h.

6. Analyse par cytométrie en flux

Le cytomètre en flux utilisé pour toutes les expériences fut le Coulter Epics® XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA), équipé avec un laser à l'ion argon de 15 mW émettant à 488 nm.

6.1 Traitement des échantillons

Après la coloration, un lavage au PBS filtré pouvait s'avérer nécessaire selon le fluorochrome utilisé (voir section 4.1). L'échantillon de cellules non-colorées, permettant de mesurer l'autofluorescence, a été invariablement lavé au PBS filtré, afin de retirer toute trace de particules et de cristaux dans le milieu de culture qui aurait pu occasionner un surplus de bruit de fond.

Avant d'analyser les échantillons au cytomètre en flux, il fallut effectuer des dilutions appropriées pour qu'idéalement, 100 à 200 événements par seconde soient comptés par le cytomètre, à la pression basse du liquide d'enveloppe (correspondant à un débit de 10 µl/minute). Ceci réduit le phénomène de coïncidence, c'est-à-dire lorsque deux ou plusieurs particules (cellules) sont analysées simultanément pour constituer un seul événement. Typiquement, pour un inoculum (à 5×10^6 UFC/ml) de *E. coli*, ayant été

incubé pendant 2 h dans du bouillon MHSC, sans antibiotique, il ne suffisait que de 20 μ l dans 1 ml de PBS filtré pour atteindre le nombre d'événements par seconde approprié. La concentration bactérienne finale, avant l'acquisition de données en cytométrie, devait correspondre à environ 10^6 UFC/ml.

6.2 Protocoles d'acquisition

La dispersion lumineuse (frontale et de côté), ainsi que la fluorescence de chaque cellule furent amplifiées par les photomultiplicateurs et mesurées sur une échelle logarithmique. La fluorescence verte fut canalisée, grâce à un filtre à bande passante de 525 nm, vers le détecteur FL1. La fluorescence rouge fut canalisée, par un filtre de 620 nm, vers le FL3. Les voltages nécessaires pour avoir un signal adéquat ont dû être ajustés pour chacun de ces détecteurs (tableau 5). Lorsque deux fluorochromes furent utilisés simultanément, le chevauchement optique des spectres d'émission des fluorochromes a dû être considéré et compensé (figure 6).

Les détecteurs de dispersion lumineuse (FS et SS) ont été ajustés à 750 V et 760 V respectivement, avec un courant amplifié (IGain) à 5.0 sur le SS. L'amplification auxiliaire était à 140 V et 10.0 de IGain. Le premier canal du FS servait de limite minimale à partir de laquelle les événements étaient analysés.

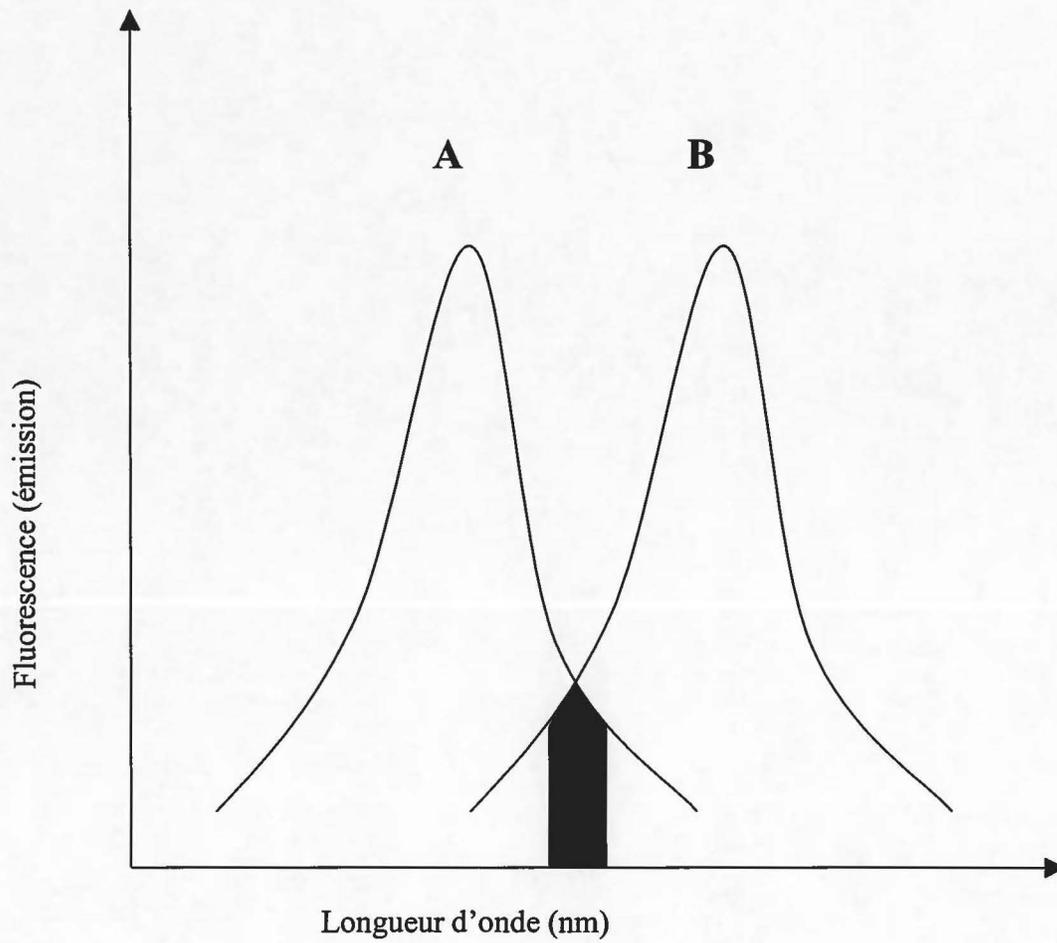
L'analyse primaire des données a été effectuée par le logiciel XL (Coulter Corp., Hialeah, FL). Le logiciel WinMDI Version 2.8 (J. Trotter, Scripps Institute, 1999) a été utilisé pour la présentation des données.

Tableau 5 : Voltages et compensation de fluorescence pour les détecteurs FL1 et FL3 selon les fluorochromes utilisés.

Fluorochromes		FL1 (volts)	FL3 (volts)	% Compensation (FL3 = FL3 - % FL1)
Trousse <i>Bac Light</i>	SYTO 9	990		7.1
	PI		1040	
SYTO 16		620		
SYTOX Green		500		
YOYO-1		750		
CFDA		680 ou 900*		
Rh123		780		
DiOC ₃ (3)		930		
DiBAC ₄ (3)		720		
Combinaison DiBAC ₄ (3) + PI	DiBAC ₄	720		7.3
	PI		850	

(* : L'analyse du *E. coli* et du *P. aeruginosa* nécessitait une amplification du FL1 à 900 volts, alors que *S. aureus* et *P. mirabilis* nécessitaient 680 volts, lors des colorations avec le CFDA.)

Figure 6 : Spectres de fluorescence pour deux fluorochromes présentant un chevauchement optique.



= Proportion de fluorescence de la sonde A à soustraire de la fluorescence de la sonde B.

7. Microscopie

La qualité des résultats interprétés par le cytomètre en flux (CMF) a été vérifiée par l'observation directe des échantillons en microscopie optique et en microscopie à épifluorescence.

7.1 Comptes totaux

L'utilisation d'un hématimètre LEVY «Improved Neubauer pattern» a permis d'effectuer des comptes totaux bactériens, qui furent corrélés avec les comptes d'événements, donnés par le CMF. Les échantillons ont été observés à 500x avec un microscope Leitz Laborlux (Leica, Heerbrugg, Suisse).

7.2 Épifluorescence

L'efficacité des protocoles de coloration avec les différents fluorochromes a d'abord été évalué qualitativement en microscopie à épifluorescence. Le microscope utilisé, le Leitz Dialux 20, était équipé avec une lampe au mercure de 100W, un filtre fournissant une lumière d'excitation à 488 nm, ainsi qu'une caméra Wild MP 551 et son contrôleur MPS 45 (Leica), ce qui nous a permis de photographier certains des échantillons. Toutes les observations se sont déroulées à un grossissement de 500x.

RÉSULTATS

1. Essais des fluorochromes

Le premier objectif de ce projet consistait à déterminer quels étaient les meilleurs fluorochromes pour une détection précise de la vitalité ou la mortalité des bactéries. Ainsi, les protocoles d'incubations avec les différents fluorochromes furent d'abord établis grâce à plusieurs observations qualitatives de l'efficacité de coloration, en microscopie à épifluorescence, avec, principalement, les souches d'*E. coli* LE392 et de *P. aeruginosa* 57RP (données non présentées). Par la suite, des échantillons de cellules «vivantes» (sans traitement) et «mortes» (tuées à l'éthanol, à la chaleur, à la gramicidin S ou affectées par une brève incubation avec soit l'ampicilline, soit la gentamicine) des souches *E. coli* LE392, *P. aeruginosa* 57RP, *P. mirabilis* LSPQ 3700 et *S. aureus* ATCC 6538 furent analysés par cytofluorométrie en flux, après coloration avec différents fluorochromes. Une évaluation de la sensibilité par des tests de croissance en milieu liquide (tableau 6), nous montra que seule la souche *P. aeruginosa* 57RP est résistante à l'ampicilline ; les autres souches étant sensibles à l'ampicilline et la gentamicine.

Tableau 6 : Interprétations des tests de sensibilité en dilution liquide pour les souches de laboratoire utilisées au développement des protocoles de coloration avec les fluorochromes.

	Ampicilline	Gentamicine
Souches		
<i>E. coli</i> LE392	S	S
<i>P. aeruginosa</i> 57RP	R	S
<i>P. mirabilis</i> 3700	S	S
<i>S. aureus</i> 6538	S	S

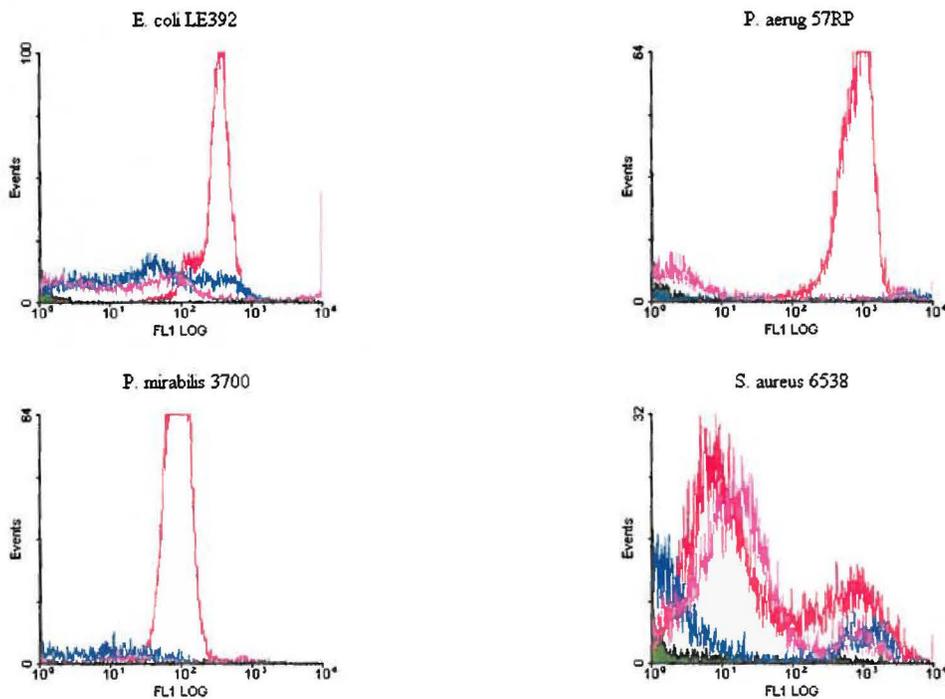
Des résultats représentatifs des protocoles de coloration des souches témoins (sans traitement et avec divers traitements antimicrobiens) avec neuf fluorochromes, ainsi que leurs combinaisons sont illustrés aux figures 7 à 13.

La figure 7 montre des histogrammes de fluorescence générés par l'emploi de fluorochromes se fixant sur les acides nucléiques. Pour les quatre espèces bactériennes testées, la perméabilisation à l'éthanol (70 %, 5 min) a permis aux sondes YOYO-1 et SYTOX Green de pénétrer la paroi et la membrane cellulaire. La forte fluorescence verte résultant de l'intercalation de ces molécules dans l'ADN est évidente. Cependant, une courte incubation (30 min à 1 h 30 min) avec l'ampicilline ou la gentamicine à de fortes doses (100 µg/ml) n'a pas suffi, mise à part le traitement d'*E. coli* avec l'ampicilline, pour affecter l'intégrité membranaire, et permettre l'entrée de ces deux indicateurs de mortalité. La sonde SYTO 16 est, par contre, un intercalateur d'ADN auquel les cellules intactes sont perméables. Le SYTO 16 n'étant qu'une variante du SYTO 9, compris dans la trousse LIVE/DEAD® *BacLight*[™], très peu d'expériences furent effectuées avec ce fluorochrome.

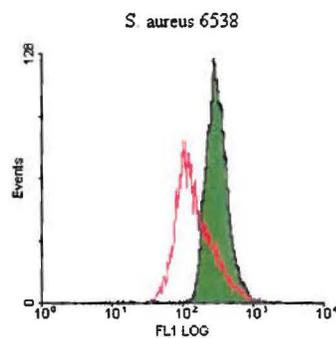
La figure 8, montre certains résultats représentatifs des expériences avec la combinaison SYTO 9 et iodure de propidium (trousse *BacLight*[™]). La sensibilité des souches aux antibiotiques ampicilline et gentamicine a été observée par une forte augmentation de la fluorescence rouge (recueillie par le détecteur FL3) résultant de la pénétration de l'iodure de propidium dans les cellules, couplée à une diminution significative de la fluorescence verte (recueillie par le détecteur FL1) provenant du SYTO 9. L'inconvénient avec les fluorochromes SYTO 9 et SYTO 16 est leur faible spécificité pour les cellules vivantes. Bien qu'on les désigne «sondes de vitalité», ces fluorochromes pénètrent et marquent également les cellules mortes. Leur utilité est surtout de permettre la distinction entre les particules possédant un contenu d'acides nucléiques (les bactéries) et les particules organiques ou inorganiques dépourvues d'ADN (le bruit de fond).

Figure 7 : Histogrammes de fluorescence montrant l'efficacité des fluorochromes YOYO-1, SYTO 16 et SYTOX Green.

YOYO-1 :

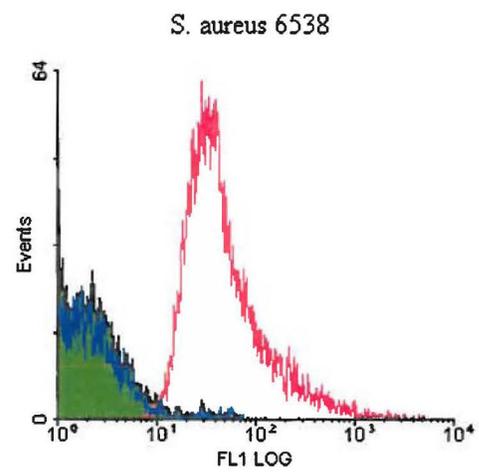
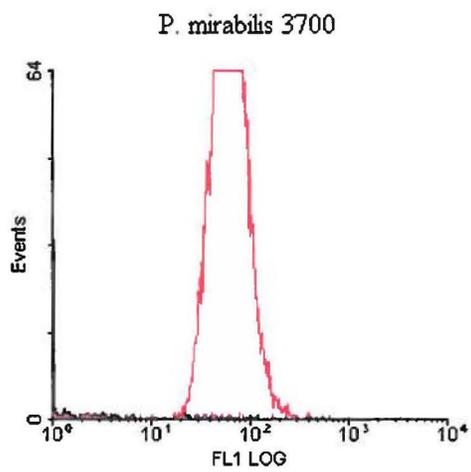
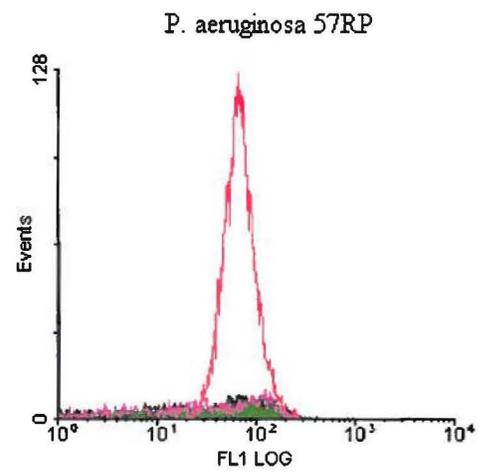
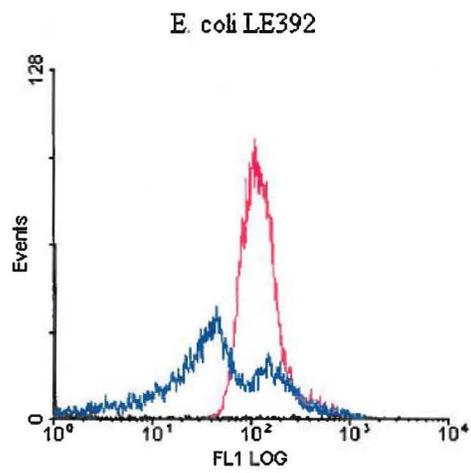


SYTO 16 :



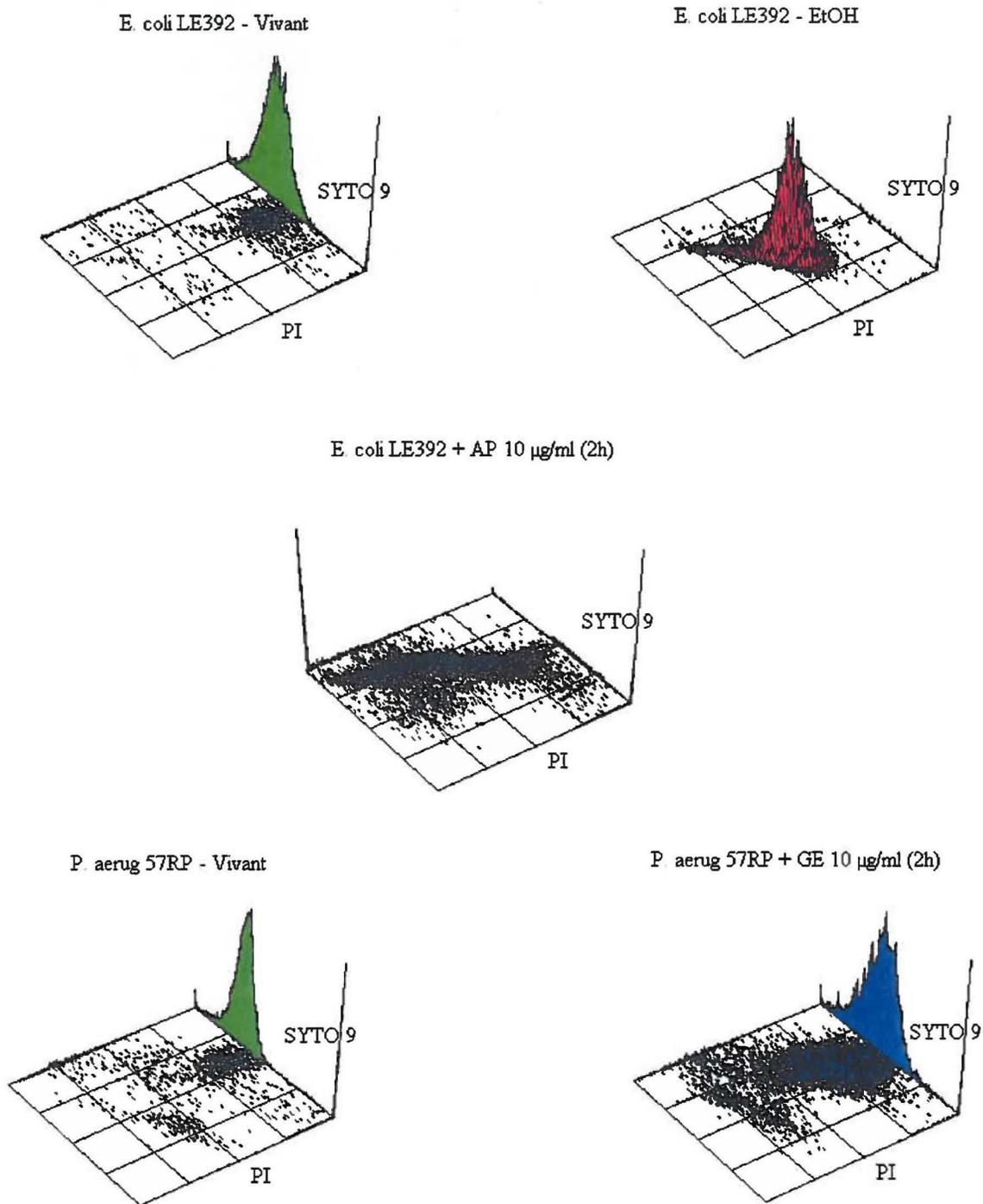
— : Échantillon «vivant» — : Échantillon + AP 100µg/ml (1h30)
— : Échantillon «EtOH» — : Échantillon + GE 100µg/ml (1h30)

L'autofluorescence des bactéries fut négligeable dans ces expériences, et n'est donc pas représentée. L'axe des x correspond à l'intensité de fluorescence verte, sur une échelle logarithmique. L'axe des y représente le nombre d'événements fluorescents enregistrés.

SYTOX Green :

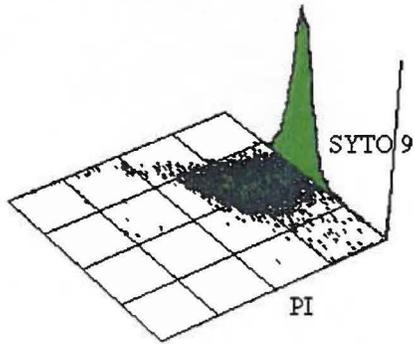
- : Échantillon «vivant»
- : Échantillon «EtOH»
- : Échantillon + AP 100µg/ml (30 min)
- : Échantillon + GE 100µg/ml (30 min)

Figure 8 : Histogrammes biparamétriques tridimensionnels montrant l'efficacité de coloration pour la trousse LIVE/DEAD® BacLight™ (SYTO 9 + PI).

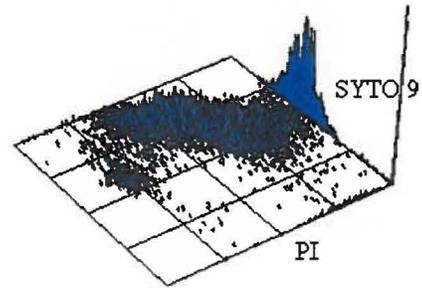


L'axe des z représente le nombre d'événements fluorescents enregistrés.

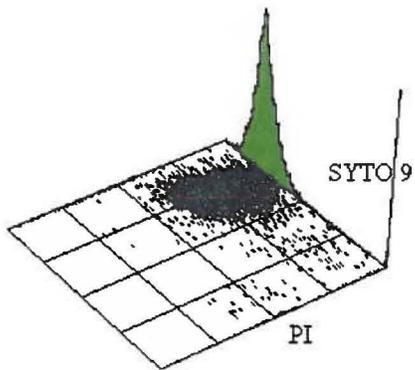
P. mirabilis 3700 - Vivant



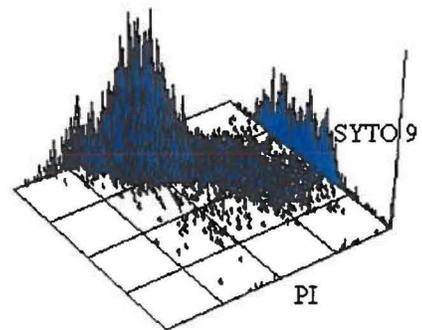
P. mirabilis 3700 + GE 100 µg/ml (2h)



S. aureus 6538 - Vivant



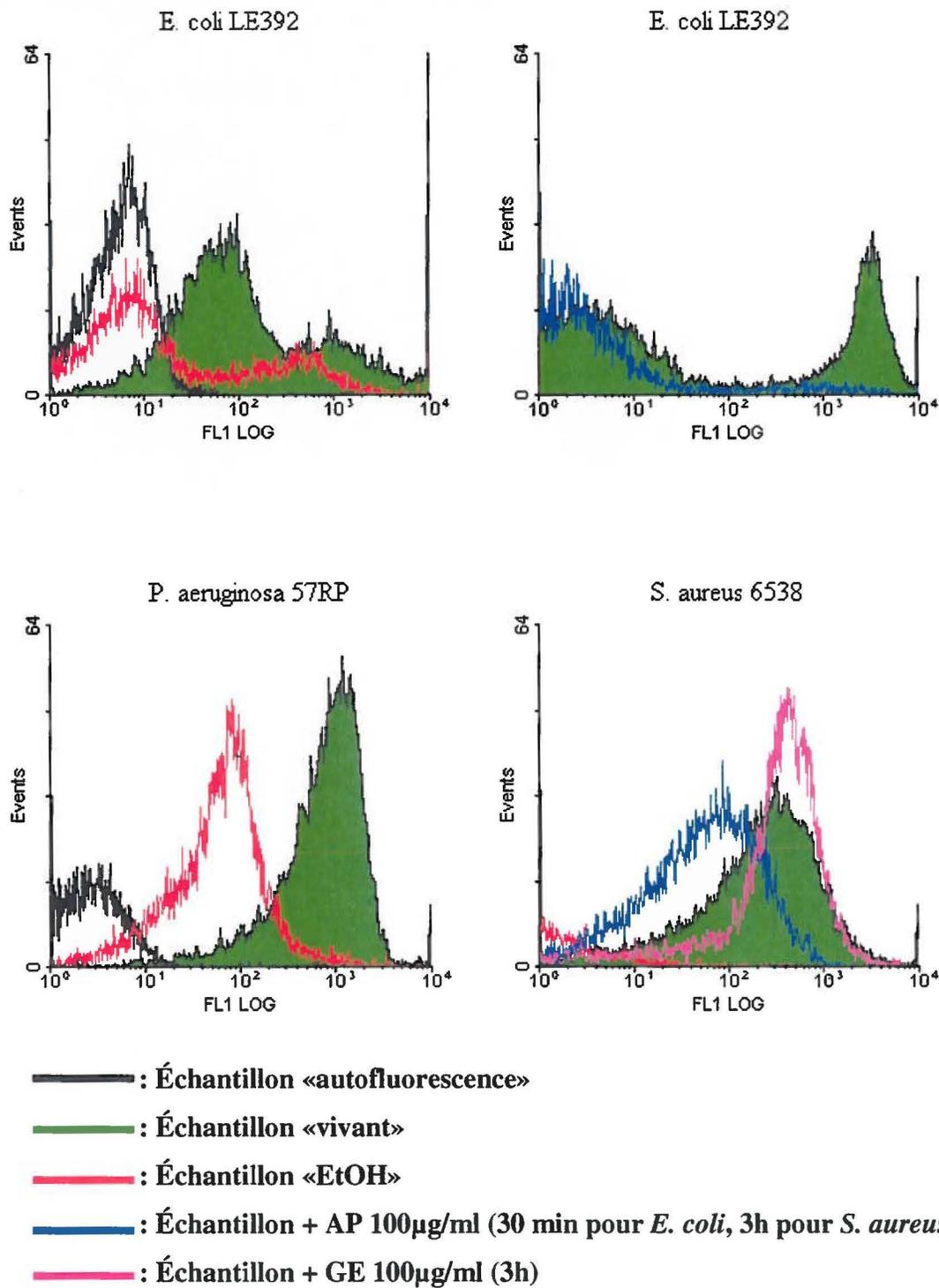
S. aureus 6538 + GE 100 µg/ml (2h)



Les résultats des expériences de marquage à la 5-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) sont présentés à la figure 9. Nos résultats corroborent ceux de Diaper et Edwards (1994) sur le fait que les bactéries Gram-positives sont colorées plus efficacement par le CFDA que les bactéries Gram-négatives. La forte intensité de fluorescence pour l'échantillon «vivant» de *S. aureus* est le résultat d'un ajustement du détecteur FL1 à 680 volts, alors qu'il fallait, pour les échantillons «vivants» des bactéries Gram-négatives *E. coli* et *P. aeruginosa*, une amplification à 900 volts. La coloration des souches Gram-négatives a été également peu reproductible, tel que démontré par les échantillons «vivants» de *E. coli* LE392, dans les deux histogrammes de la figure 9. Généralement, la fuite de la carboxyfluorescéine (composé fluorescent produit par l'hydrolyse du CFDA sous l'action des estérases intracellulaires non-spécifiques) hors des cellules démontrait la sensibilité des souches à l'ampicilline. Cependant un antibiotique comme la gentamicine, qui n'affecte pas directement l'intégrité membranaire, a eu plutôt un effet contraire, c'est-à-dire l'accumulation du produit fluorescent, la carboxyfluorescéine, à l'intérieur des cellules. Par conséquent, le marquage au CFDA des bactéries sensibles à la gentamicine a généré une augmentation de fluorescence, bien que cette sonde soit théoriquement un indicateur de vitalité.

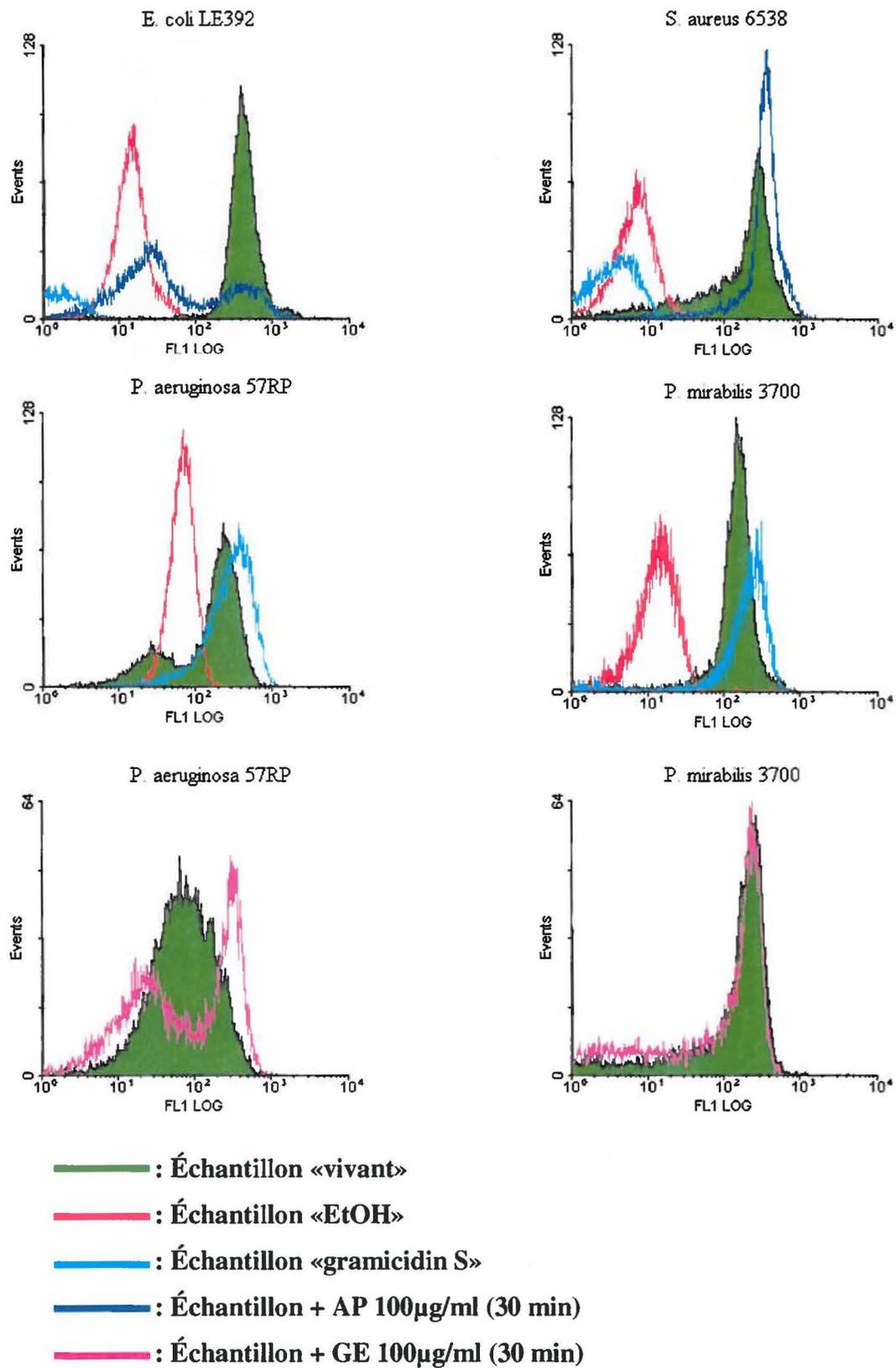
La rhodamine 123 est une sonde potentiométrique qui nécessite, tout comme la carboxyfluorescéine diacétate, un traitement des cellules au Tris-EDTA (particulièrement les bactéries Gram-négatives) afin d'obtenir une coloration efficace. Également, la coloration à la rhodamine ou au CFDA requièrent une étape de lavage avant l'analyse des échantillons, afin d'éliminer la fluorescence non-spécifique. La figure 10 montrent la perte du potentiel membranaire des témoins traités à l'éthanol. La direction du changement de fluorescence, suite au traitement avec l'ionophore gramicidin S, est fonction de l'espèce bactérienne testée. Aucun changement significatif de fluorescence, suite à l'incubation du *P. mirabilis* avec la gentamicine, n'a été relevé par cette sonde, alors que les deux autres indicateurs potentiométriques, DiOC₅ et DiBAC₄ (figures 11 et 12), ont réussi à démontrer la sensibilité de cette souche après un seul cycle de génération (30 min).

Figure 9 : Coloration avec le CFDA.



(N.B. : Les résultats présentés pour *S. aureus* sont issus d'une coloration après traitement aux antibiotiques, contrairement à la coloration avant traitement pour les autres espèces)

Figure 10 : Coloration avec la Rh123.



Les figures 11, 12 et 13 présentent les résultats des colorations avec, respectivement, le DiOC₅(3), le DiBAC₄(3) et la combinaison DiBAC₄(3) + iodure de propidium. Dans la figure 11, on peut observer que le DiOC₅(3) a rendu les cellules d'échantillons non traités fortement fluorescentes avec à peu près la même efficacité pour toutes les espèces. Cependant, les traitements dépolarisants (éthanol, gramicidin S) et les incubations brèves avec antibiotiques ont occasionné des changements d'intensité de fluorescence dont l'orientation était difficilement prévisible. De plus, les différences d'intensité de fluorescence entre les échantillons témoins «vivants» ou «tués» ont été très faibles par rapport à ceux observés par la coloration au DiBAC₄(3).

Nous pouvons apprécier, dans la figure 12, l'amplitude des rapports d'intensité de fluorescence entre les échantillons traités et non traités, suite à la coloration à l'oxonol anionique DiBAC₄(3). Ce fluorochrome est également un indicateur de potentiel membranaire, mais, contrairement à la carbocyanine cationique DiOC₅(3), l'oxonol possède une charge négative qui permet à la molécule d'être presque entièrement non-fluorescente lorsqu'elle est intégrée aux composantes lipidiques d'une cellule polarisée et métaboliquement active (Jepras et coll., 1995 ; Haugland, 1996). Nos résultats ont confirmé cette propriété. Les effets des traitements qui ont affecté le potentiel de membrane, ainsi que les traitements aux antibiotiques, visant directement (ampicilline) ou indirectement (gentamicine) la membrane cellulaire, ont été démontrés chez les quatre espèces testées de façon reproductible et sans équivoque par le DiBAC₄(3).

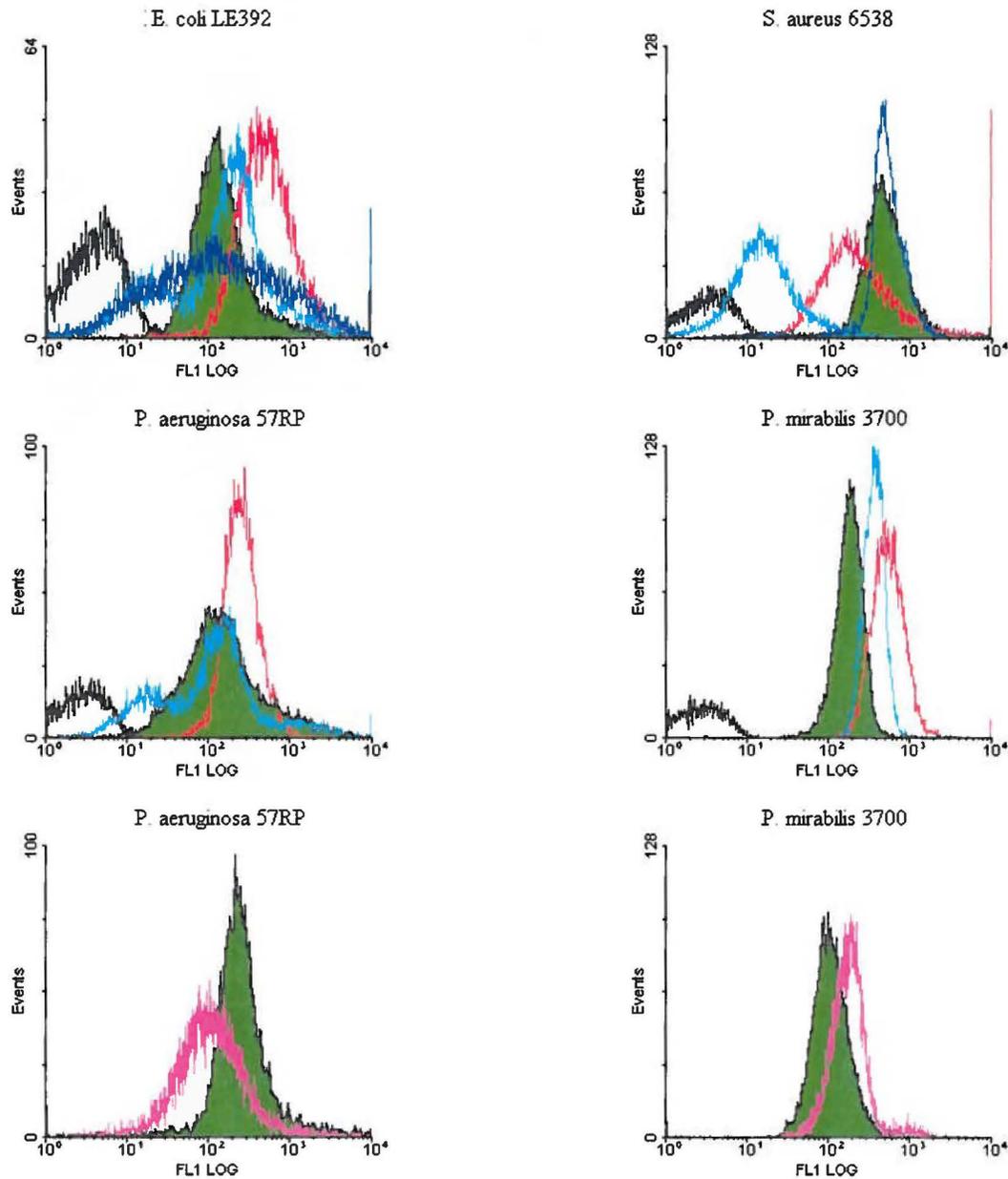
La grande sensibilité et spécificité de cette sonde a pu être mise à profit en combinant dans une seule solution de coloration le DiBAC₄(3) et l'iodure de propidium. Ces deux fluorochromes peuvent être excités par un laser à 488 nm et ils émettent chacun une fluorescence à des longueurs d'ondes assez éloignées pour être recueillies par des détecteurs différents (DiBAC₄(3) → FL1, PI → FL3). Ceci permet donc la quantification séparée de leur fluorescence et une interprétation indépendante des effets d'un traitement antimicrobien sur le potentiel et l'intégrité membranaire.

La figure 13 nous montre les histogrammes biparamétriques d'une coloration double sur des échantillons témoins et traités aux antibiotiques d'*E. coli* LE392 et de *P. aeruginosa* 57RP. En abscisse, nous retrouvons l'intensité de fluorescence pour le DiBAC₄(3) et en ordonnée, la fluorescence pour l'iodure de propidium, toutes deux sur des échelles logarithmiques. Un quadrant a été tracé dans les histogrammes et, en bordure de ces histogrammes, nous avons indiqué les pourcentages d'événements contenus dans chacune des quatre régions des quadrants. La région 1 (supérieure gauche) contient les particules qui affichent une forte fluorescence pour l'iodure de propidium, mais très peu ou pas de fluorescence pour le DiBAC₄(3). La région 2 (supérieure droite) contient les particules qui sont fortement fluorescentes pour les deux fluorochromes. Ainsi, nous retrouvons dans cette région les cellules qui ont perdu à la fois leur intégrité et leur potentiel membranaire. Compte tenu que ces cellules ont une chaîne métabolique brisée et sont structurellement endommagées, nous pouvons considérer ces dernières comme étant «mortes» (la perte de leur capacité de reproduction a été démontrée à la figure 17). La région 3 (inférieure droite) représente les cellules qui ont perdu leur potentiel de membrane, mais ayant conservé leur intégrité membranaire (fluorescence positive pour le DiBAC₄(3), mais négative pour le PI). La région 4 (inférieure gauche) contient les particules non-fluorescentes représentent soit des cellules viables (métaboliquement actives et dont la structure membranaire est intègre), soit des débris ou des cristaux, dont la taille et l'indice de réfraction avoisinent ceux des bactéries intactes, issus du milieu de culture, du PBS ou de l'éclatement des cellules.

Dans le cas d'*E. coli* LE392, les cellules non traitées furent à 99 % non fluorescentes (figure 13A), alors que des cellules perméabilisées à l'éthanol furent à 99 % positives pour le DiBAC₄(3) et le PI (figure 13B). Lorsque que nous avons incubé cette souche pendant deux heures avec 10 µg/ml d'ampicilline ou de gentamicine, nous avons obtenu respectivement 96 % et 43 % d'événements fluorescents pour une ou deux sondes de mortalité (figure 13C, D). Une culture en phase exponentielle de *Pseudomonas aeruginosa* possède la caractéristique d'avoir un pourcentage de cellules fluorescentes variant de 15 à 60 %. Ici la population «vivante» présenta 26 % de cellules fluorescentes (figure 13 E). Toutefois, lorsque la souche 57RP fut incubée avec un antibiotique auquel

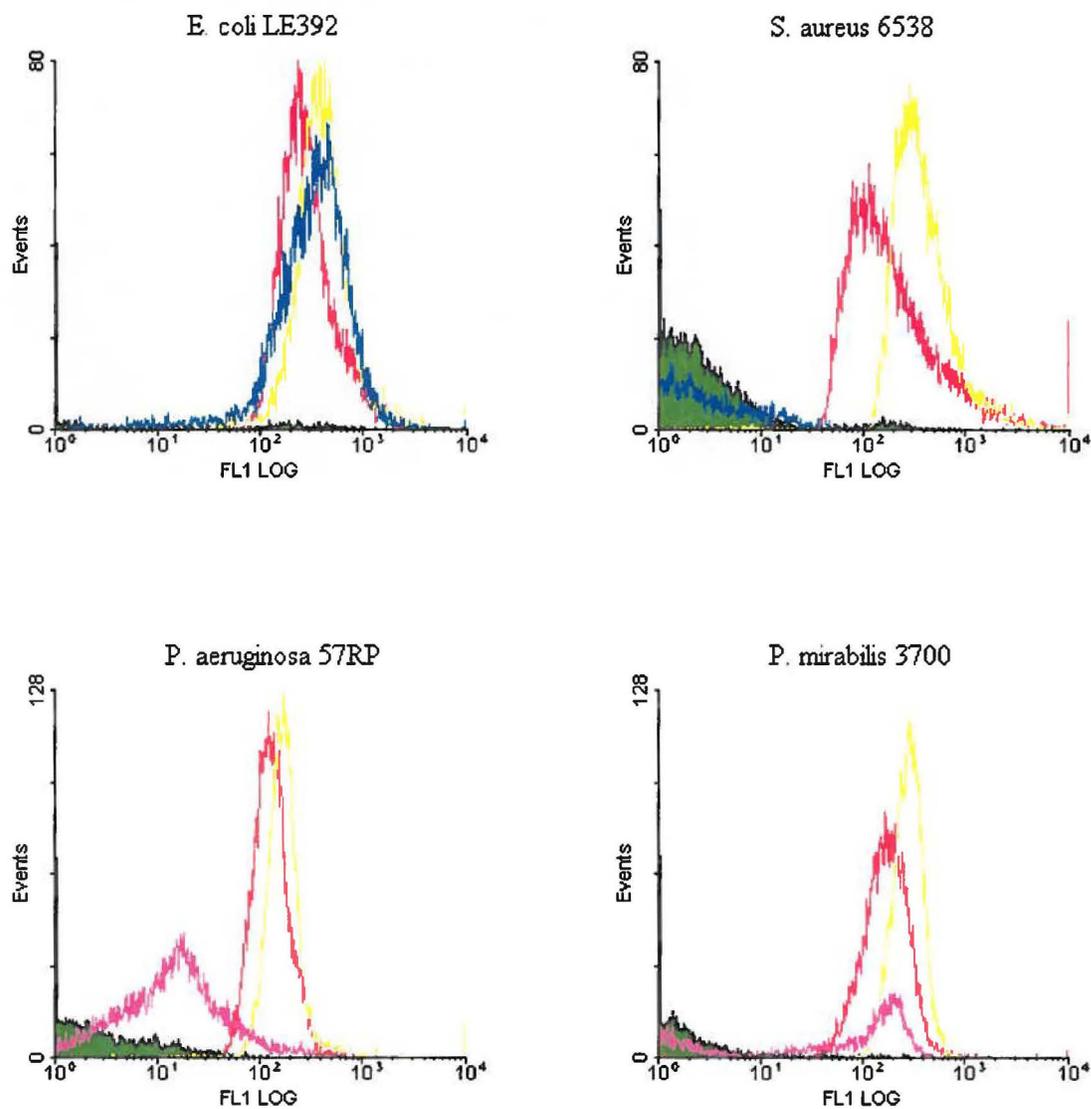
elle est sensible, la gentamicine, 87 % des cellules affichèrent alors une fluorescence simple ou double (figure 13H). En incubant cette bactérie avec un antibiotique à une concentration à laquelle elle est résistante (10 µg/ml d'ampicilline), nous avons obtenu environ 40 % d'événements fluorescents (figure 13G). Cette augmentation de fluorescence est non significative pour le *P. aeruginosa*, puisque qu'un échantillon non traité de cette espèce peut donner une proportion de cellules fluorescentes atteignant les 60 %, comme mentionné plus haut. De plus, si nous comparons qualitativement le profil de fluorescence de l'échantillon traité à l'ampicilline avec le profil de l'échantillon non traité, aucun changement important n'est observé.

Le tableau 7 résume l'évaluation de la fiabilité et de l'efficacité des fluorochromes à distinguer la sensibilité à l'ampicilline et la gentamicine avec différentes souches de laboratoire. Nos résultats ont permis de conclure que la combinaison des fluorochromes DiBAC₄(3) et iodure de propidium colore les quatre souches testées avec une très grande efficacité et détecte la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques d'une manière reproductible et sans ambiguïté. Cette combinaison fut choisie pour la suite des expériences.

Figure 11 : Coloration avec le DiOC₅(3).

- : Échantillon «autofluorescence»
- : Échantillon «vivant»
- : Échantillon «EtOH»
- : Échantillon «gramicidin S»
- : Échantillon + AP 100µg/ml (30 min)
- : Échantillon + GE 100µg/ml (30 min)

Figure 12 : Coloration avec le DiBAC₄(3).



- : Échantillon «vivant»
- : Échantillon «EtOH»
- : Échantillon «chaleur»
- : Échantillon + AP 100µg/ml (30 min)
- : Échantillon + GE 100µg/ml (30 min)

Figure 13 : Coloration avec la combinaison DiBAC₄(3) + PI.

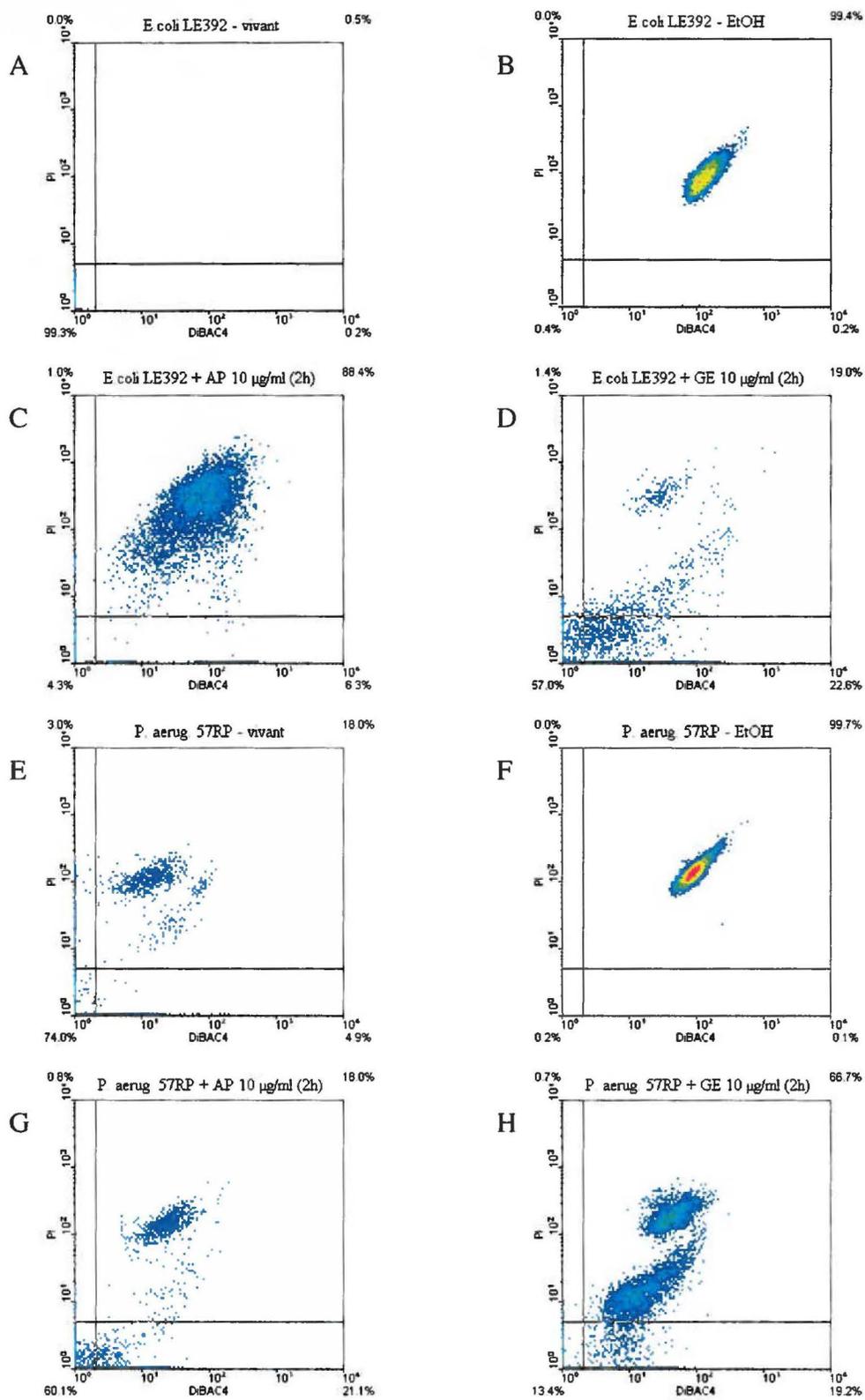


Tableau 7 : Comparaison de la fiabilité, de l'efficacité de coloration et de la capacité des fluorochromes à distinguer la sensibilité à l'ampicilline (AP) et à la gentamicine (GE) avec les souches de laboratoire.

Fluorochromes	<i>E. coli</i> LE392		<i>P. aeruginosa</i> 57RP	<i>P. mirabilis</i> 3700	<i>S. aureus</i> 6538	
	AP	GE	GE	GE	AP	GE
Kit <i>Bac</i> Light	++	++	+	+	+	++
SYTOX Green	++	?	+	-	-	?
YOYO-1	+	+	+	-	+	++
CFDA	++	++ (sens -)	?	++ (sens -)	++	+(sens -)
Rh123	++	?	+	-	-	?
DiOC ₅ (3)	++	?	++	+	-	?
DiBAC ₄ (3)	++	++	++	++	-	?
DiBAC ₄ (3) + PI	++	++	++	++	++	+
	Fiabilité	Efficacité				
Kit <i>Bac</i> Light	++	++				
SYTO 16	?	++				
SYTOX Green	++	++				
YOYO-1	++	++				
CFDA	-	- (Gram -)/++ (Gram +)				
Rh123	+	+				
DiOC ₅ (3)	+	++				
DiBAC ₄ (3)	++	++				
DiBAC ₄ (3) + PI	++	++				

Légende : Traitement à l'ampicilline et la gentamicine

- ++ Excellente discrimination des cellules mortes/vivantes
- + Faible discrimination des cellules mortes/vivantes
- Aucune (ou très faible) discrimination des cellules mortes/vivantes
- ? Non testé
- (sens -) Direction imprévisible du changement de fluorescence
- Fiabilité de la coloration**
- ++ Résultats très reproductibles
- + Résultats reproductibles (différences d'intensité)
- Résultats peu reproductibles
- ? Pas assez de résultats pour conclure
- Efficacité de la coloration**
- ++ Coloration très intense
- + Intensité moyenne
- Faible intensité
- ? Pas assez de résultats pour conclure
- (Gram -)/ (Gram +) Différence significative entre la coloration des bactéries Gram - et Gram +

2. Optimisation des paramètres d'incubation avec les antibiotiques

Le choix des fluorochromes étant fait, la prochaine étape fut de développer et d'optimiser un protocole de sensibilité aux antibiotiques. Les résultats présentés sont représentatifs d'un minimum de deux expériences indépendantes.

La figure 14 présente les résultats issus d'une expérience avec la souche *E. coli* LE392, visant à démontrer les effets de l'antibiotique ampicilline à des concentrations en deçà de la CMI (dans ce cas-ci, 2 µg/ml, tableau 10), pendant une incubation de 2 h 30 min. Ces concentrations sont désignées : «sous-inhibitrices». Les comptes de viabilité, effectués par la méthode standard des unités formatrices de colonies (UFC), sont indiqués pour chaque échantillon. L'apparition de cellules affichant une forte fluorescence pour les deux fluorochromes, indicateurs de «mortalité», coïncide précisément avec une première diminution d'unités viables (ayant la capacité de former une colonie sur milieu nutritif), à 0.5 µg/ml. Ces effets se sont accentués évidemment avec l'augmentation de la concentration de l'antibiotique.

Les expériences d'optimisation des concentrations et du temps d'incubation ont été effectués avec *E. coli* ATCC 25922 et six antibiotiques (AP, CT, GE, NI, NO et TS). Les résultats sont présentés aux figures 15 et 16. Cette souche est sensible à tous ces agents antimicrobiens. Nos résultats ont révélé que, pour la plupart des antibiotiques, la concentration optimale pour visualiser rapidement la sensibilité des cellules par la CMF se situait aux alentours de quatre fois la concentration minimale inhibitrice. Les effets de certains antibiotiques bactéricides, comme l'ampicilline, la gentamicine et le ceftriaxone, étaient perceptibles à 1 heure d'incubation seulement. Pour une fiabilité maximale, 2 heures furent généralement nécessaires.

Figure 14 : Effets des concentrations sous-inhibitrices de l'ampicilline sur *E. coli* LE392 observés par cytométrie en flux.

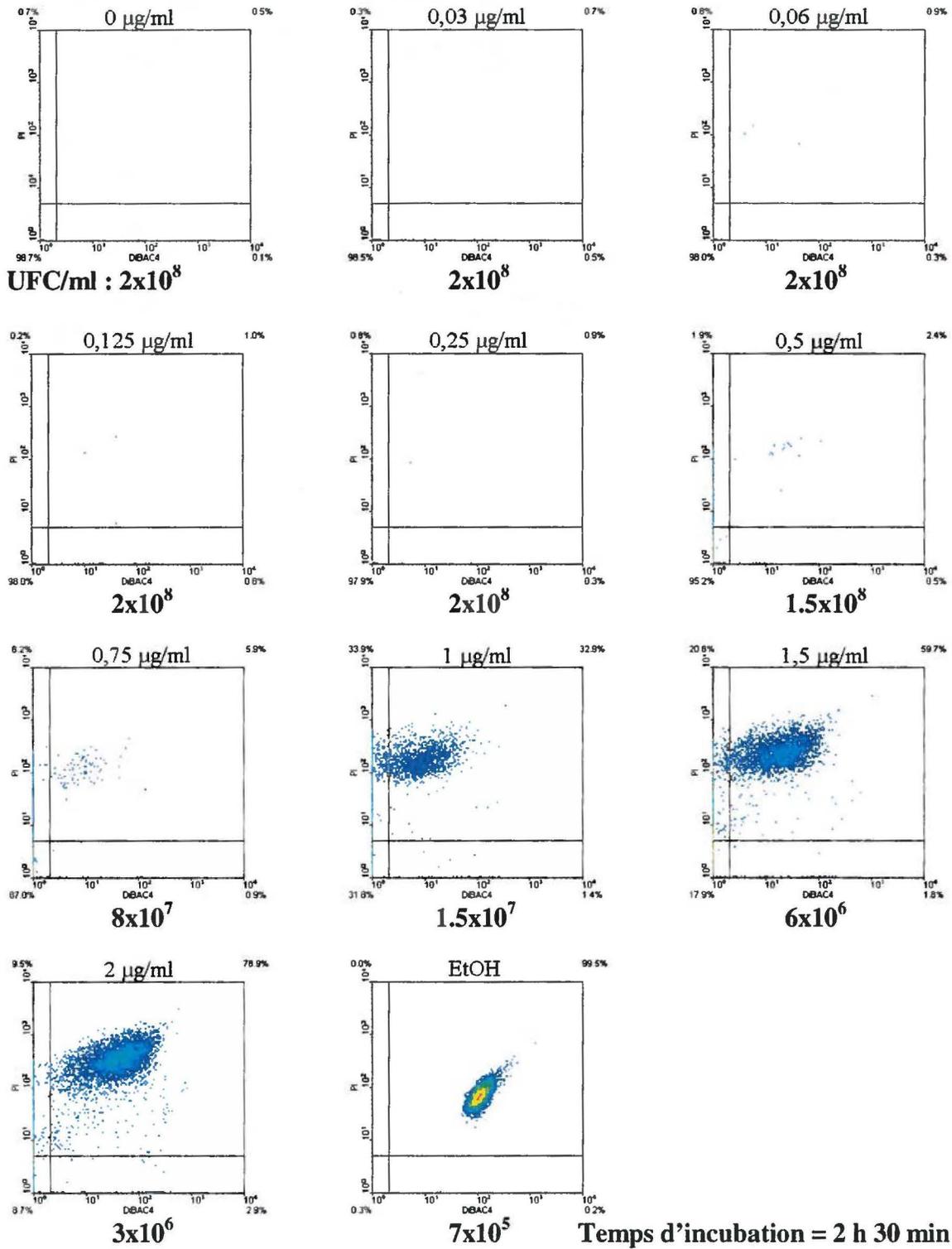
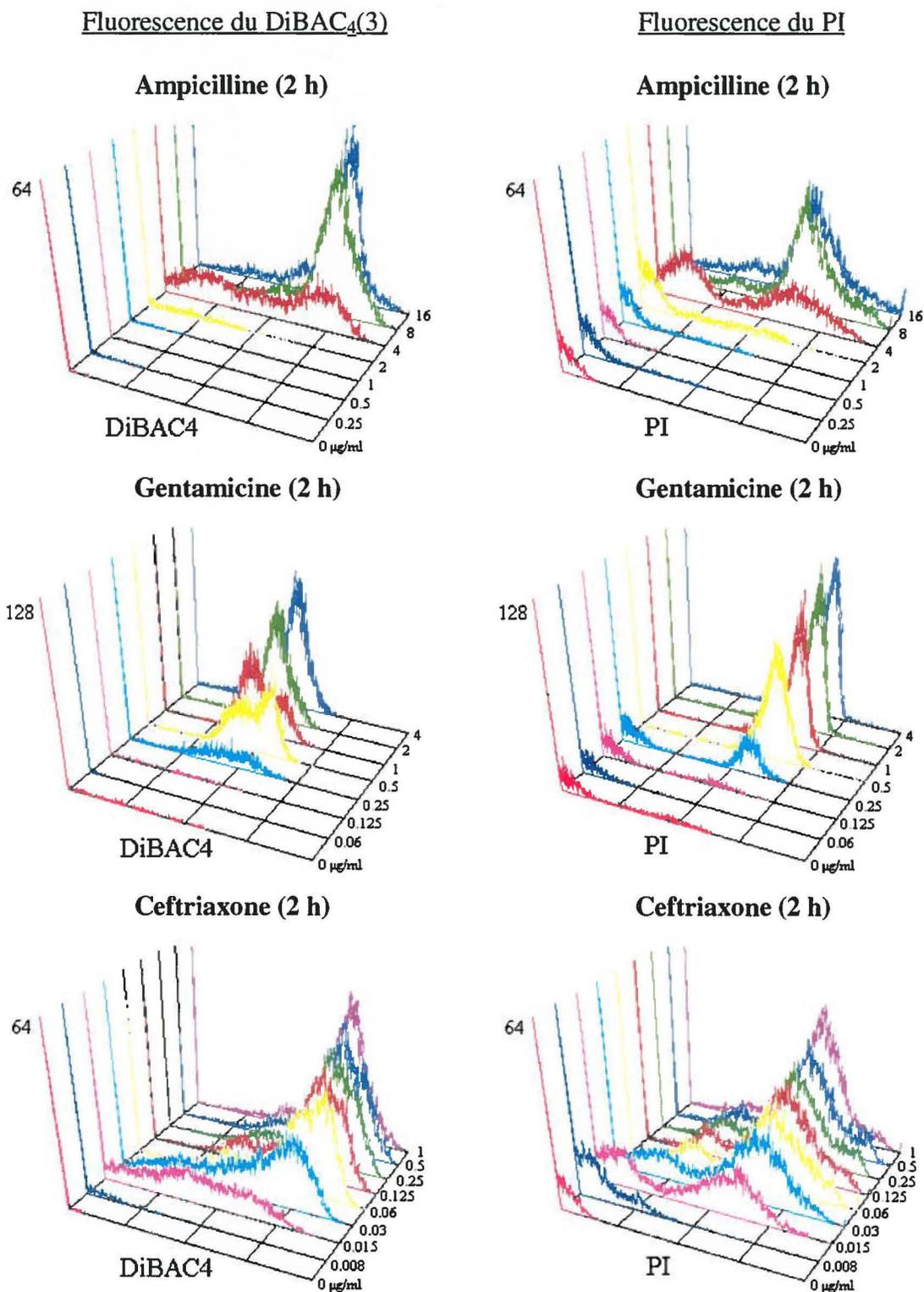
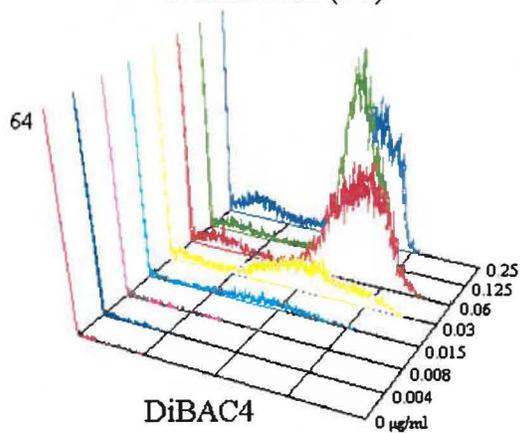


Figure 15 : Optimisation de la concentration de six antibiotiques sur *E. coli* ATCC 25922 pour un test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF).



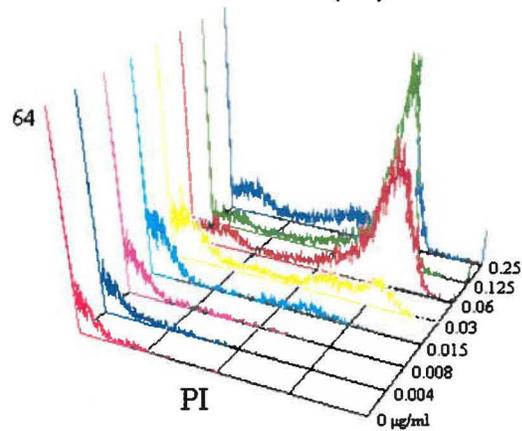
Fluorescence du DiBAC₄(3)

Norfloxacine (2 h)

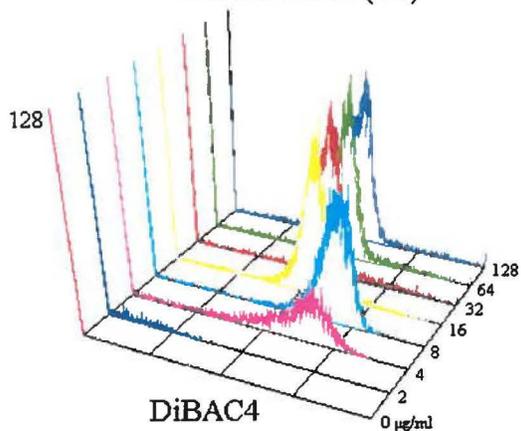


Fluorescence du PI

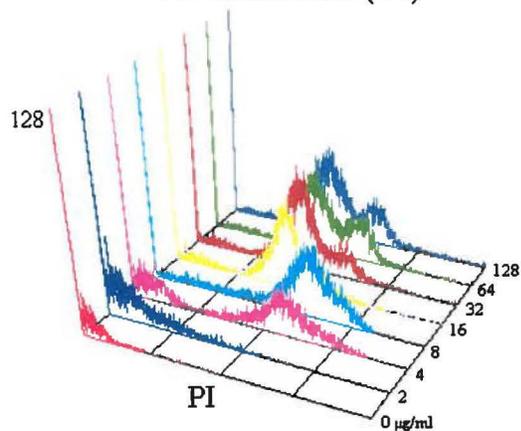
Norfloxacine (2 h)



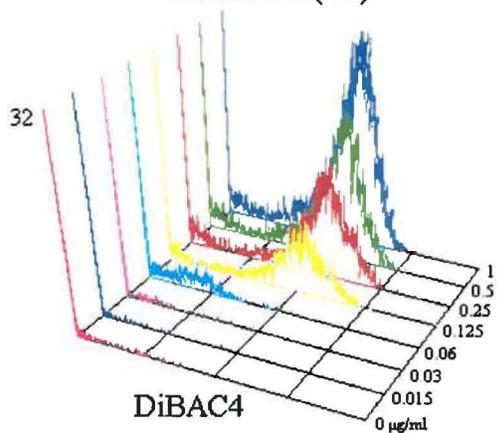
Nitrofurantoïne (2 h)



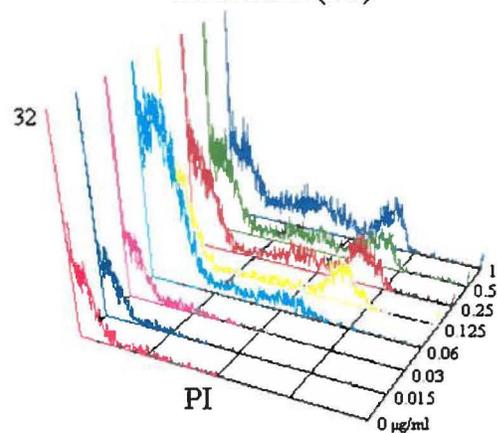
Nitrofurantoïne (2 h)



TMP/SMX (2 h)

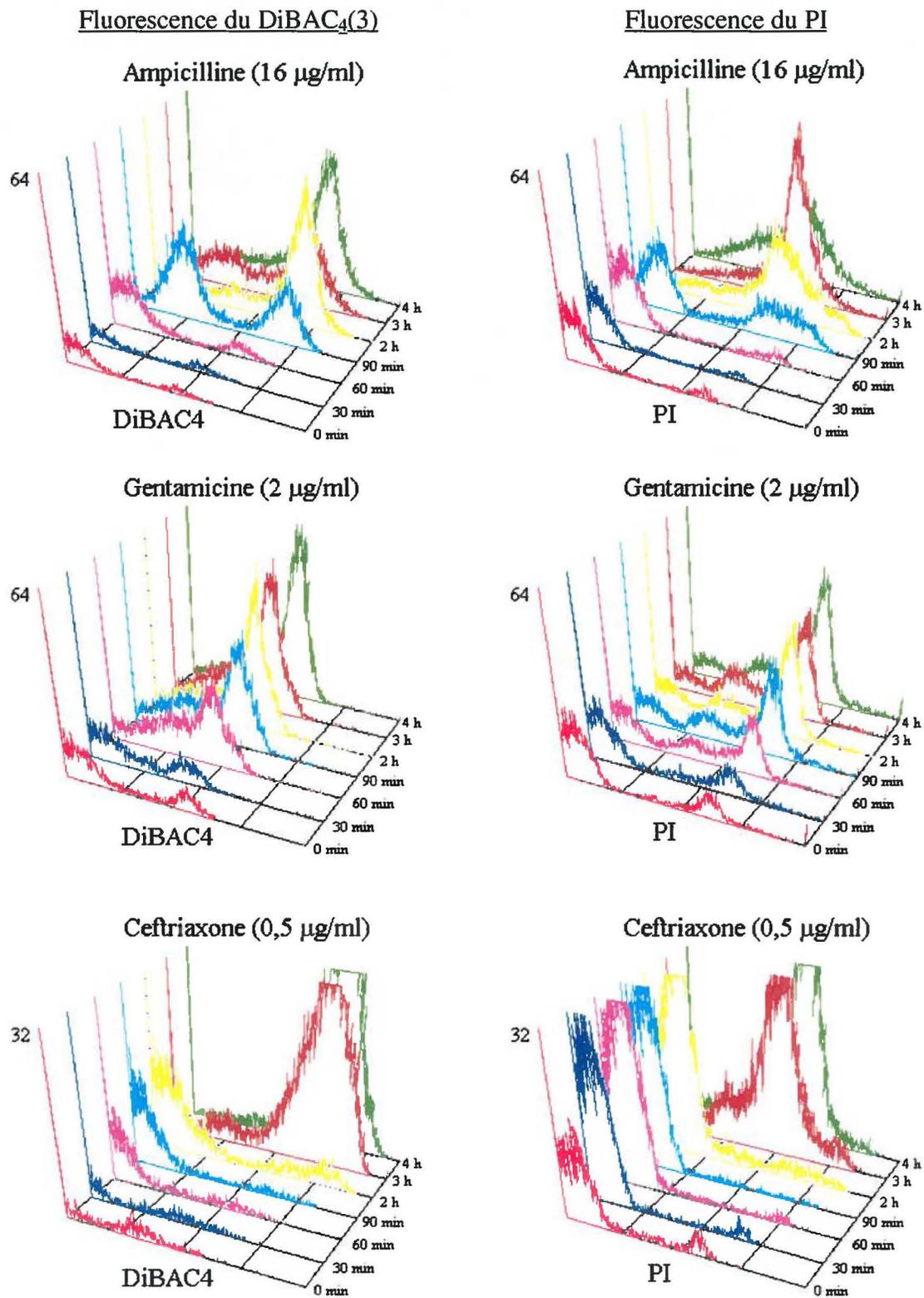


TMP/SMX (2 h)



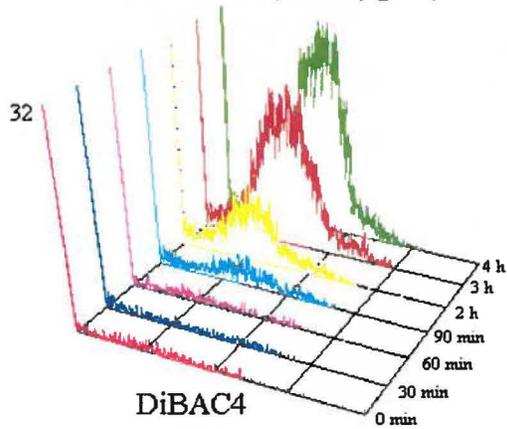
L'axe des x représente l'intensité de la fluorescence, l'axe des y la concentration des antibiotiques et l'axe des z le nombre d'événements fluorescents.

Figure 16 : Optimisation du temps d'incubation pour six antibiotiques avec *E. coli* ATCC 25922.



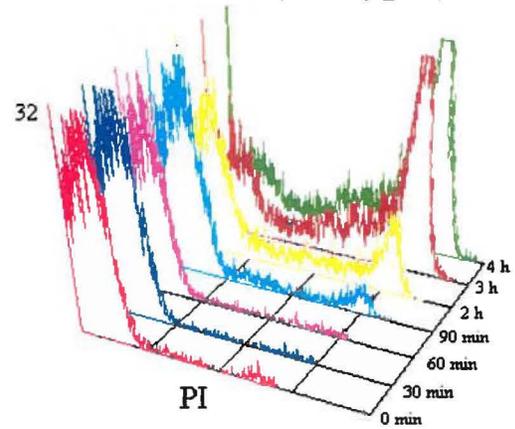
Fluorescence du DiBAC₄(3)

Norfloxacine (0,125 µg/ml)

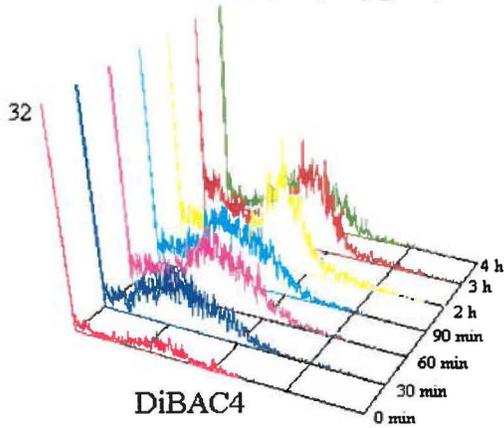


Fluorescence du PI

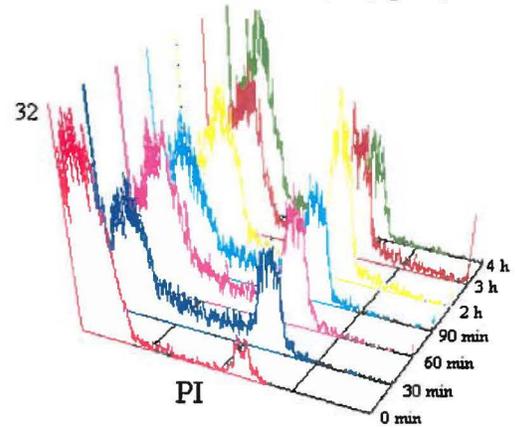
Norfloxacine (0,125 µg/ml)



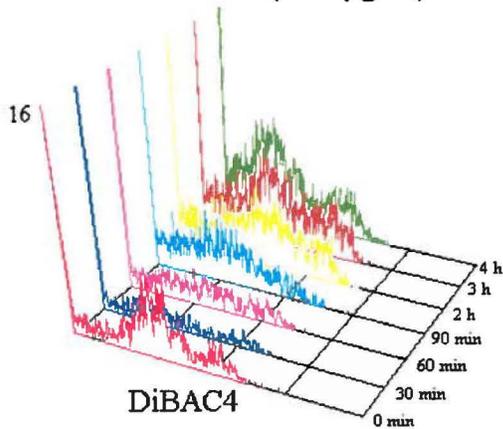
Nitrofurantoïne (64 µg/ml)



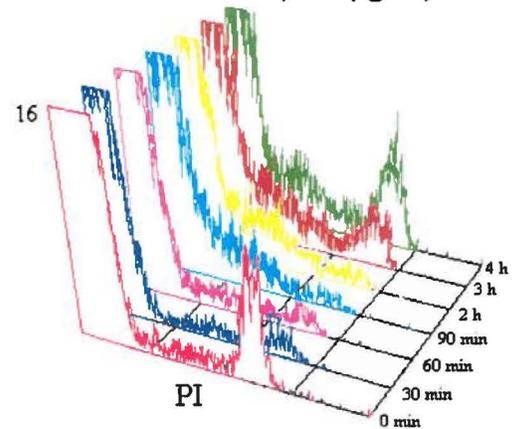
Nitrofurantoïne (64 µg/ml)



TMP/SMX (2/38 µg/ml)



TMP/SMX (2/38 µg/ml)



À cette figure, l'axe des y représente le temps d'incubation des souches avec les antibiotiques.

3. Corrélation des comptes de viabilité

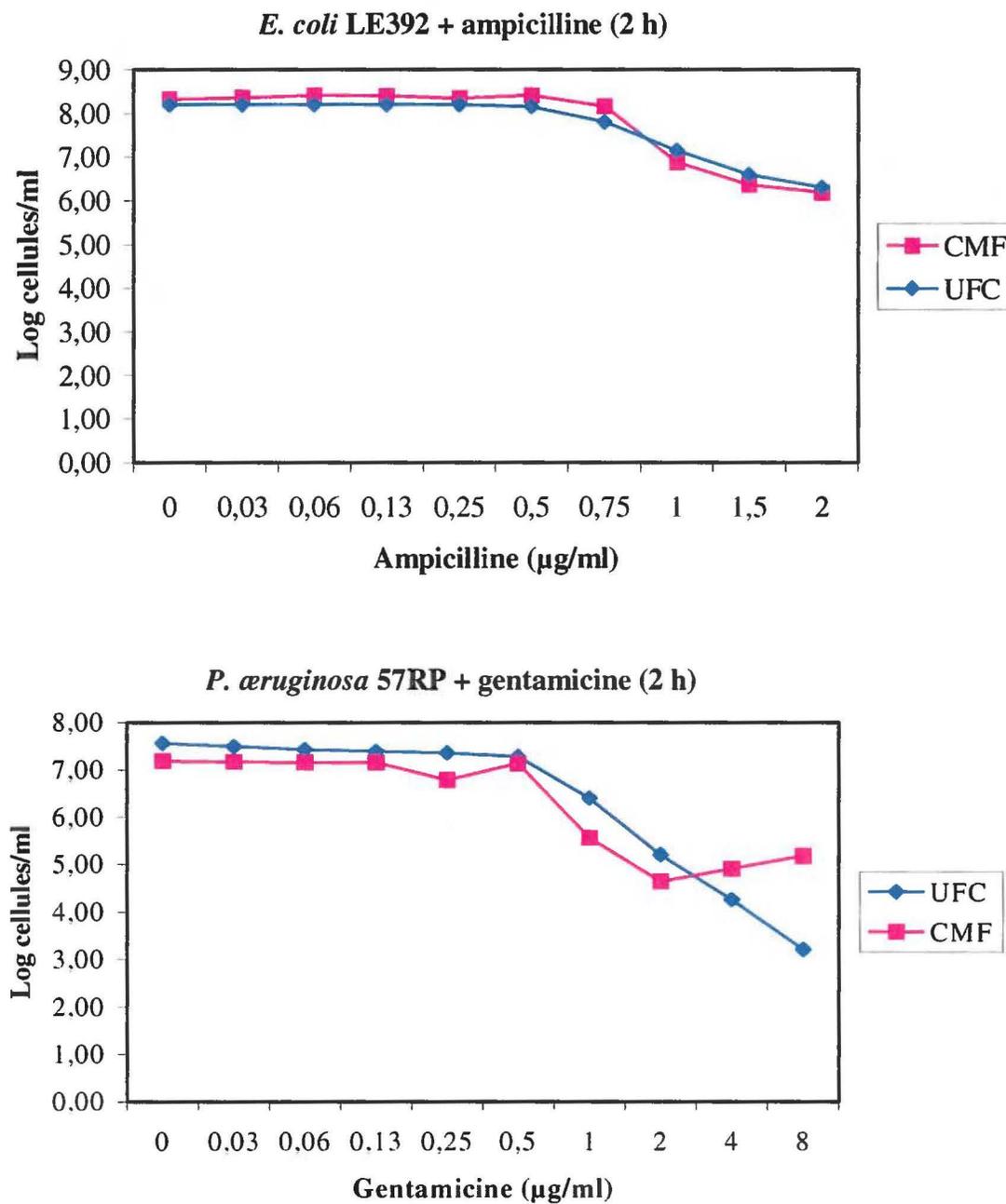
Pour vérifier que les événements analysés par le cytomètre en flux (CMF) correspondaient bien, pour la plupart, à des cellules monodispersées, les souches *E. coli* LE392 et *P. mirabilis* LSPQ 3700 en phase de croissance exponentielle ont été observées en microscopie optique (compte total) et dénombrées par les unités viables, formatrices de colonies (UFC) (tableau 8). Une excellente corrélation a été observée entre les divers comptes cellulaires et les comptes de viabilité, dans le cas d'une culture pure en croissance exponentielle. Les calculs permettant d'établir le compte d'événements (cellules) par le cytomètre, se sont basés sur le débit connu (10 μ l par minute) de l'injection des échantillons à pression basse, dans l'appareil utilisé.

Tableau 8 : Vérification des comptes bactériens par cytométrie en flux.

Souches	CMF (événements/ml)	Compte total (cellules/ml)	UFC/ml
<i>E. coli</i> LE392	1.5×10^8	1.7×10^8	1.6×10^8
<i>P. mirabilis</i> 3700	1.1×10^8	1.7×10^8	1.0×10^8

Nous avons voulu ensuite évaluer la capacité du protocole utilisant les sondes DiBAC₄(3) et PI à quantifier le nombre de cellules viables (événements peu ou pas fluorescents) dans des échantillons traités aux antibiotiques. Les résultats de l'expérience des concentrations sous-inhibitrices de l'ampicilline sur *E. coli* LE392 (nombres d'événements dans les quadrans inférieurs gauche, figure 14) sont présentés à la figure 17, en corrélation avec les comptes d'UFC correspondants. Les résultats d'une incubation du *P. aeruginosa* 57RP avec des concentrations croissantes de gentamicine sont également présentés. Une bonne corrélation a été observée dans les deux cas. Pour le *P. aeruginosa*, les comptes totaux et d'UFC étaient généralement dix fois inférieurs à ceux obtenus pour *E. coli*.

Figure 17 : Corrélation des comptes de viabilité dans un test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux avec les comptes d'UFC pour des échantillons de *E. coli* LE392 et *P. aeruginosa* 57RP incubés respectivement avec des concentrations croissantes d'ampicilline et de gentamicine.



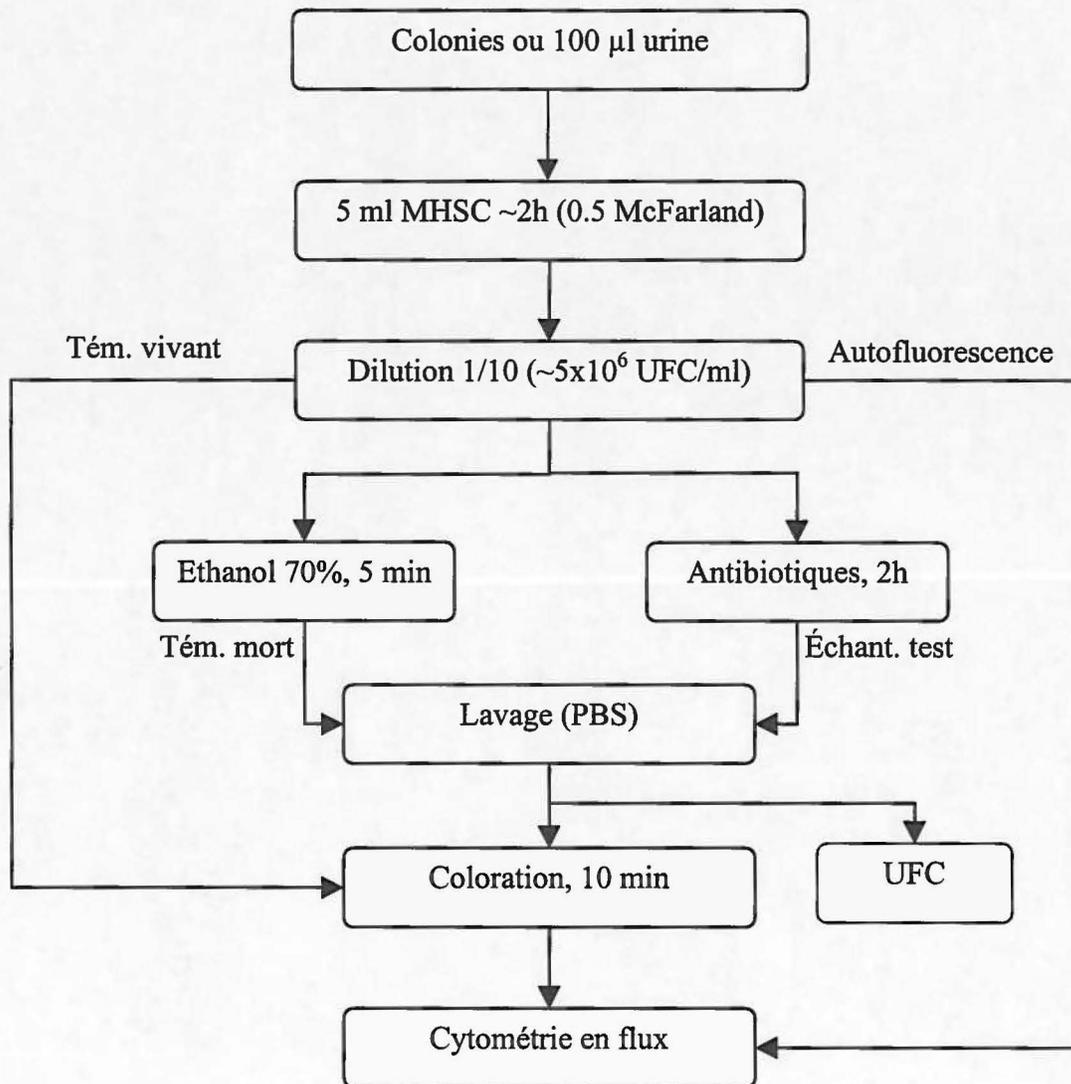
4. Protocole final

Les résultats présentés jusqu'à présent visaient à déterminer et à optimiser les paramètres constitutifs d'un test rapide de sensibilité aux antibiotiques, grâce à l'application de la CMF. Les effets des antibiotiques ont pu être évalués, notamment grâce aux CMI connues des souches de laboratoire. Cependant, en vue d'une application du protocole sur des échantillons cliniques, contenant des microorganismes dont les CMI étaient inconnues, une modification s'imposait. Ainsi, chaque antibiotique évalué dans le TSA-CMF a été utilisé à la concentration limite pour une interprétation de sensibilité, tel qu'établi par le NCCLS (document M100-S9, 1999). Ces concentrations sont énumérées dans le tableau 9. De cette façon, lorsque les bactéries récupérées d'un échantillon clinique ont affiché une réponse (augmentation de cellules fluorescentes et/ou diminution du compte total bactérien) suite à une brève incubation avec un antibiotique à la concentration décrite au tableau 9, nous pouvions alors qualifier cette population bactérienne comme étant sensible à l'antibiotique. Au contraire, lorsqu'aucun effet n'a pu être perçu soit par les deux sondes de mortalité ou par une diminution significative du nombre de bactéries dans l'échantillon contenant cette concentration d'antibiotique, par rapport à l'aliquote de cellules incubées dans du bouillon nutritif en absence d'antibiotique, nous avons interprété cette population comme résistante. Les critères de sensibilité, de sensibilité intermédiaire et de résistance sont décrits à la section 5. Deux des douze antibiotiques disponibles ont dû être utilisés à deux concentrations différentes, selon le type de bactérie rencontrée ; la pénicilline G (8 µg/ml pour les entérocoques - 0.125 µg/ml pour les autres) et la carbénicilline (128 µg/ml pour *Pseudomonas* - 16 µg/ml pour les autres).

Tableau 9 : Concentrations (µg/ml) des antibiotiques utilisés dans le protocole final du TSA-CMF.

AP	CB	CT	CZ	GE	NI	NO	OX	PG	TR	TS	VA
8	16	8	8	4	32	4	2	0.125	4	2/38	4
	128							8			

La figure 18 illustre le protocole final que nous avons établi pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Brièvement, les bactéries ont d'abord été cultivées 2 heures pour qu'elles atteignent une phase de croissance exponentielle. La culture a ensuite été diluée pour obtenir une concentration de 5×10^6 UFC/ml et aliquotée pour une incubation de 2 heures avec les antibiotiques. Après lavage et coloration avec les deux fluorochromes (DiBAC₄(3) + PI), les échantillons furent analysés par cytométrie. Trois témoins, incubés sans antibiotique, ont été effectués. L'un pour mesurer l'autofluorescence des cellules. Le deuxième fut la coloration de cellules vivantes (non traitées), pour mesurer le niveau de base de fluorescence, auquel toutes les aliquotes traitées furent comparées. Finalement, un témoin positif de mortalité a été effectué par un traitement à l'éthanol 70 %.

Figure 18 : Protocole final schématique du TSA-CMF.

5. Critères d'interprétation

Il est essentiel de décrire les critères d'interprétation nous ayant permis d'affirmer qu'une bactérie fût sensible, de résistance intermédiaire ou résistante pour un antibiotique selon les résultats du TSA-CMF. Une interprétation de sensibilité par le TSA-CMF fit appel à l'évaluation de trois paramètres : 1) une augmentation significative de cellules fluorescentes (surtout celles positives pour les deux sondes) par rapport à l'échantillon incubé sans antibiotiques, 2) une déformation du profil de dispersion lumineuse et 3) une diminution du nombre total de cellules dans l'échantillon traité, tel qu'évalué par le calcul du nombre d'événements par millilitre analysés par le cytomètre.

Une bactérie fut catégorisée comme résistante lorsque : 1) le nombre de cellules fluorescentes n'était pas significativement supérieur à celui observé dans l'échantillon non traité, 2) le profil de dispersion lumineuse, indiquant un changement morphologique, n'avait pas changé et 3) le nombre total de cellules (événements/ml) dans l'échantillon était à peu près égal à celui du témoin vivant. Lorsqu'un échantillon présentait à la fois des caractéristiques de sensibilité et de résistance, ou que les effets semblaient contenus entre les limites de ces deux extrêmes, nous affirmions alors que la bactéries était de sensibilité intermédiaire.

Il nous a été impossible d'évaluer les trois catégories de sensibilité pour toutes les combinaisons possibles d'espèces bactériennes et d'antibiotiques. Ainsi, une description complète et objective de tous les critères utilisés pour l'interprétation des combinaisons testées n'a pu être réalisée dans le cadre de ce projet.

Lorsqu'une nouvelle méthode permettant la détermination de sensibilité aux antibiotiques est comparée à des tests standards, trois types d'erreurs peuvent survenir ; 1) l'erreur «mineure», 2) l'erreur «majeure» et 3) l'erreur «très majeure». Une erreur mineure est soulevée en deux occasions, soit lorsque la méthode étudiée donne un résultat de sensibilité intermédiaire, alors que les méthodes conventionnelles donnent des résultats de résistance ou de sensibilité, ou lorsque la méthode étudiée donne un résultat

de sensibilité, alors que les autres méthodes donnent un résultat de sensibilité intermédiaire. On qualifie d'erreurs «majeures», les résultats de fausse-résistance obtenus par la méthode évaluée, alors que les résultats de fausse-sensibilité sont des erreurs qualifiées comme «très majeure».

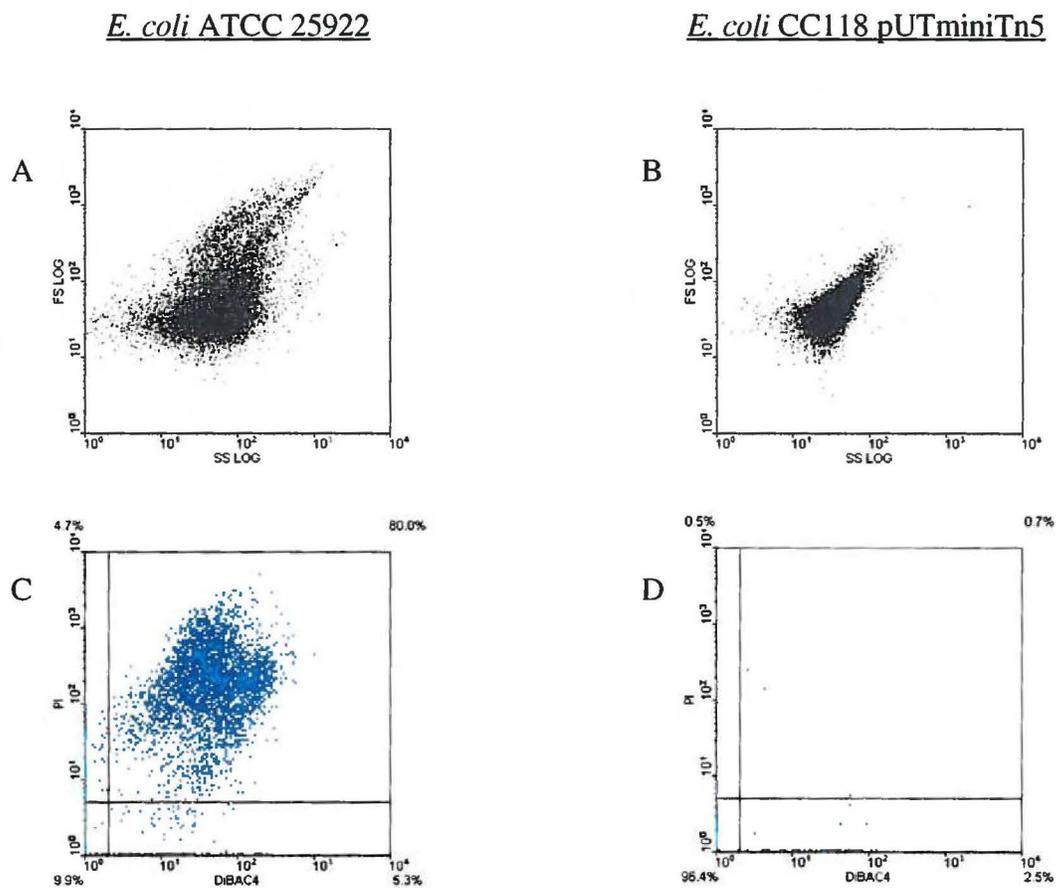
6. Application du TSA-CMF

Le protocole du TSA-CMF, ainsi que les critères d'interprétation de sensibilité étant établis, nous avons pu alors procéder à l'analyse de différentes bactéries ; tout d'abord *E. coli*, puis d'autres espèces témoins, notamment des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*Enterococcus faecalis* et de *Staphylococcus aureus*, provenant de l'ATCC.

6.1 Application sur *E. coli*

Étant donné la forte prévalence de *E. coli* dans les infections urinaires, le protocole finale de TSA-CMF a d'abord été testé sur cette espèce. Les résultats suivants démontrent la capacité du TSA-CMF à détecter une résistance bien déterminée ; celle de la souche *E. coli* CC118, portant un plasmide (pUTminiTn5 Km) qui contient un gène de résistance à l'ampicilline (CMI >512 µg/ml). Le profil de dispersion lumineuse et l'histogramme biparamétrique, montrant l'intensité de fluorescence du DiBAC₄(3) et du PI, pour cette souche sont comparés à la figure 19 à ceux du *E. coli* ATCC 25922, souche sensible à l'ampicilline (CMI = 4 µg/ml).

Figure 19 : Profils de dispersion (SS vs FS) et histogrammes biparamétriques (DiBAC₄(3) vs PI) du *E. coli* CC118 pUTminiTn5Km (AP^r) et du *E. coli* ATCC 25922 (AP^s) incubés pendant 2h avec 16 µg/ml d'ampicilline.



Il est intéressant d'observer les changements dans les profils de dispersion de la lumière. Ainsi, pour la souche CC118 pUTminiTn5Km, ce profil n'a pas changé en présence ou en absence d'antibiotique et est demeuré compact (figure 19B). Cependant, lorsque la souche 25922 fut affectée par l'ampicilline, son profil s'est étendu (figure 19A), suggérant un changement important de l'état des cellules. Ces changements coïncident avec les augmentations de l'intensité de fluorescence pour les deux fluorochromes indicateurs de la perte du potentiel de membrane (DiBAC₄(3)) et la perte d'intégrité membranaire (PI) (figure 19C).

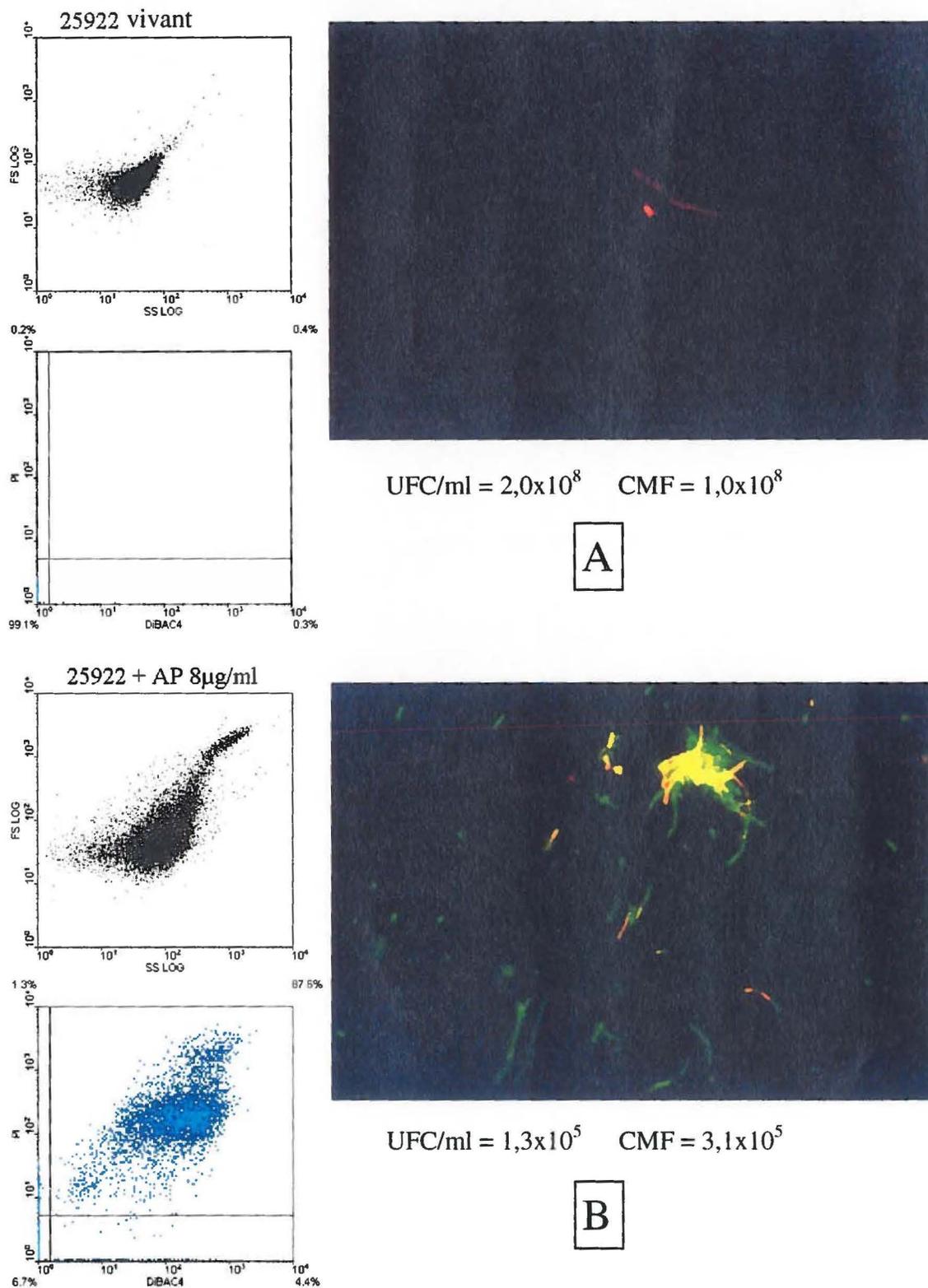
Nous avons vérifié l'état des cellules de la souche 25922 en microscopie à épifluorescence, après 2h d'incubation avec cinq antibiotiques (AP, CT, CZ, GE et TS). Cette souche est sensible à ces antibiotiques (tableau 10). Les concentrations utilisées représentent les critères limites pour l'interprétation de sensibilité, lors de tests en dilution liquide (NCCLS, 1999). La figure 20 illustre ces résultats. Ainsi, avec le témoin vivant, peu ou pas de cellules fluorescentes ont été observées par cytométrie en flux et par microscopie (figure 20A). De forts signaux de fluorescence ont été mesurés avec les cellules traitées à l'ampicilline, le ceftriaxone et la ceftazidime (figure 20B, C et D). Le profil de dispersion de ces trois échantillons était étendu et similaire ce qui reflète le même mécanisme d'action de ces antibiotiques, puisqu'ils appartiennent à la famille des β -lactames. Des cellules fluorescentes allongées ou regroupées ont été observées par microscopie. La perte de viabilité, évaluée par les comptes d'UFC, corrèle très bien avec la diminution du nombre d'événements non fluorescents dans la région 4 (inférieure gauche) des histogrammes biparamétriques, lorsque le *E. coli* est incubé avec les antibiotiques du type β -lactames.

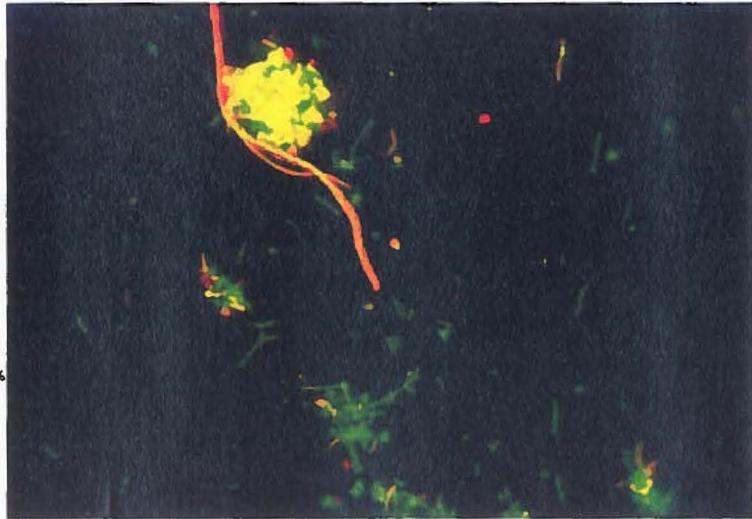
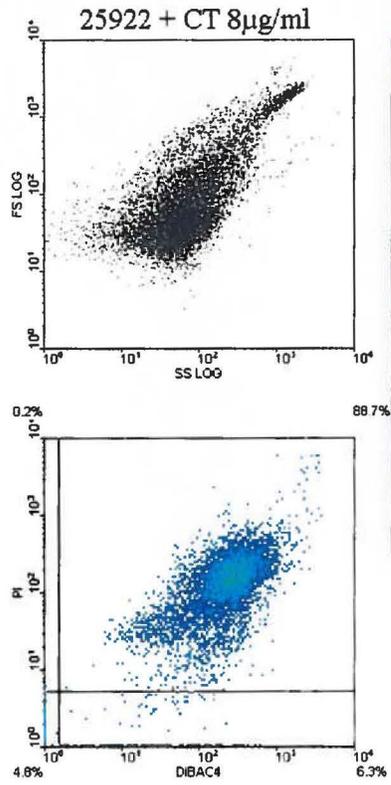
Dans le cas de l'échantillon traité à la gentamicine, le profil de dispersion n'a pas beaucoup changé (figure 20E). Cependant, l'histogramme biparamétrique de fluorescence montre que la culture était composée de deux sous-populations ; l'une fortement fluorescente au PI et l'autre au DiBAC₄. Ce type de profil reflète l'évolution des changements physiologiques de cellules traitées à la gentamicine où le potentiel membranaire des cellules est probablement affecté en premier suivi de l'intégrité

membranaire. La photographie en épifluorescence confirme que l'inhibition de la synthèse protéique, causée par la gentamicine a un impact minime sur la morphologie cellulaire. La forte coloration rouge des cellules, qui est en fait un mélange de rouge et de vert, souligne bien l'intensité supérieure pour le PI que pour le DiBAC₄, tel qu'enregistré dans l'histogramme de fluorescence. On remarque une faible corrélation entre les comptes d'UFC et d'événements non fluorescents. Le nombre d'unités viables, ayant la capacité de former une colonie en 24 heures est, en réalité, sous-estimé, puisque la gentamicine possède un effet «post-antibiotique» (Gottfredsson et coll., 1998).

Finalement, pour l'échantillon incubé avec la combinaison des agents bactériostatiques triméthoprime/sulfaméthoxazole (1/19) (figure 20F), un étalement relativement compact du profil de dispersion a été créé et très peu (~ 12%) de cellules fluorescentes ont été générées. Ceci fut caractéristique de cette combinaison d'antibiotiques qui bloque, de façon séquentielle, la synthèse de l'acide folique. L'observation en épifluorescence a permis de vérifier les données du cytomètre. La sensibilité de la souche 25922 au TMP/SMX fut démontrée par la chute du compte d'unités viables à 0,24 % par rapport à l'échantillon vivant, tandis que le nombre de cellules non fluorescentes chuta à 7,8 % (ce calcul considère la proportion de cellules non-fluorescentes, avant dilution, dans l'échantillon traité au TMP/SMX [$7,8 \times 10^6$ cellules/ml] par rapport à la quantité de cellules non-fluorescentes dans l'échantillon non traité [$1,0 \times 10^8$ cellules/ml]).

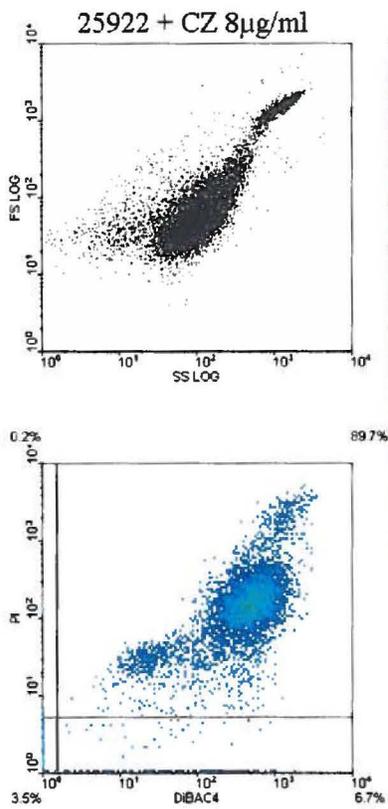
Figure 20 : Profils de dispersion (SS vs FS) et histogrammes biparamétriques (DiBAC₄(3) vs PI) comparés à la microscopie en épifluorescence, aux comptes UFC et aux comptes de viabilité par cytométrie, pour *E. coli* ATCC 25922.





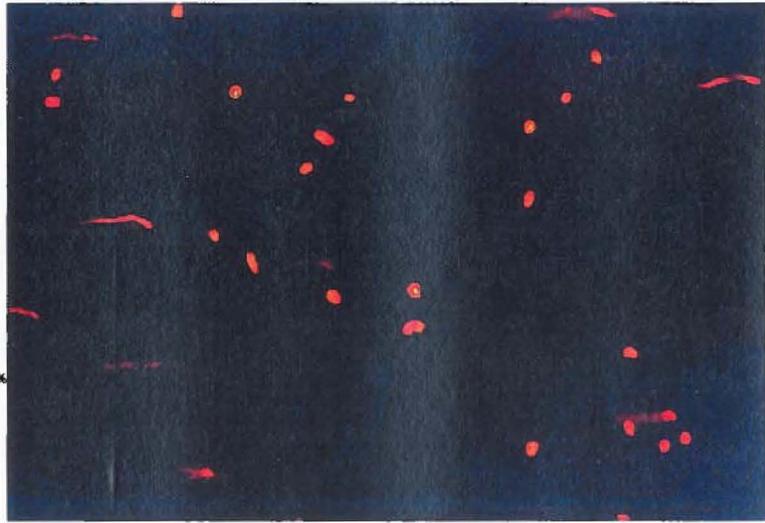
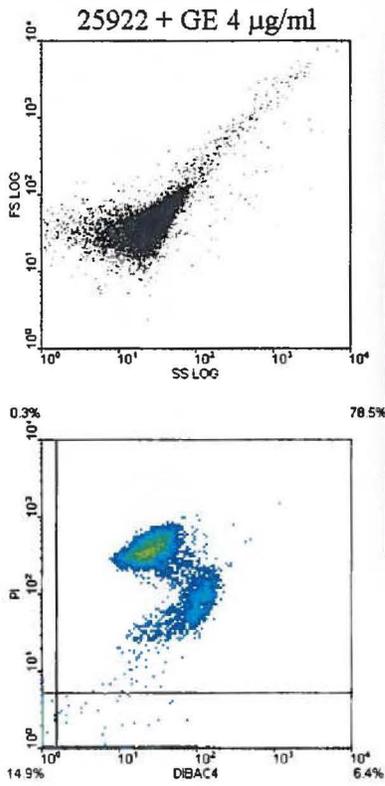
UFC/ml = $2,5 \times 10^4$ CMF = $2,3 \times 10^5$

C



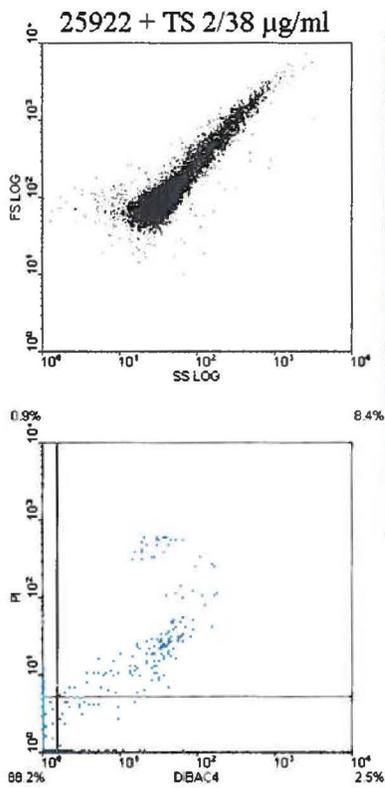
UFC/ml = $5,5 \times 10^4$ CMF = $3,0 \times 10^5$

D



UFC/ml = $<10^3$ CMF = $1,4 \times 10^6$

E



UFC/ml = $4,8 \times 10^5$ CMF = $7,8 \times 10^6$

F

6.2 Application sur les autres espèces témoins

Notre protocole de TSA-CMF a été évalué sur d'autres souches témoins de l'ATCC. Trois espèces autres que *E. coli* étaient représentées dans les six souches témoins, soit *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et ATCC 51299 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et ATCC 43300. La souche d'*E. faecalis* ATCC 51299 a la particularité de présenter une sensibilité intermédiaire à la vancomycine (8 µg/ml), alors que la souche *S. aureus* ATCC 43300 est résistante à l'oxacilline (4 µg/ml) (NCCLS, 1999). Les CMI pour ces souches de l'ATCC et les deux *E. coli* utilisées dans les expériences précédentes (LE392 et CC118 pUTminiTn5Km) sont énumérées au tableau 10.

Les figures 21, 22 et 23 présentent les résultats du TSA-CMF et des tests de sensibilité conventionnels, pour ces trois espèces. Dans les trois cas, aucun signal d'autofluorescence a été observé (histogrammes A) et le témoin mort (histogrammes C) a généré les signaux de fluorescence attendus. Dans le cas du témoin vivant, une forte proportion de cellules du *P. aeruginosa* ATCC 27853 et du *E. faecalis* ATCC 51299 a été colorée (respectivement 70 % et 80 %), surtout avec le PI. Les histogrammes 21A et 22A démontrent que ce phénomène n'est pas dû à des composés naturellement fluorescents chez ces bactéries. La figure 17 nous montrait pourtant une bonne corrélation entre les comptes d'unités viables et les comptes d'événements non fluorescents par cytométrie, pour le *P. aeruginosa* 57RP incubé avec différentes concentrations de gentamicine. L'échantillon «vivant» d'une culture en phase exponentielle de cette espèce n'a atteint, après 2 heures de croissance dans du bouillon MHSC sans antibiotique, qu'une concentration de cellules non-fluorescentes d'environ $2,5 \times 10^7$ /ml (comparativement à 2×10^8 cellules non-fluorescentes/ml pour *E. coli*) et le nombre d'unité viable fut de $5,6 \times 10^7$ UFC/ml. Ces résultats suggèrent que, pour une culture liquide de *P. aeruginosa* en croissance logarithmique, une portion significative de cellules conservent leur capacité de division sur milieu solide, tout en étant perméable au PI.

Le traitement des trois souches avec différents antibiotiques (figures 21 à 23) a généré dans tous les cas la coloration des cellules. Nous pouvons remarquer que les profils de fluorescence sont particuliers, non seulement pour chaque classe d'antibiotique, mais aussi pour chaque combinaison de genre bactérien et d'agent antimicrobien. Pour la plupart des analyses impliquant *P. aeruginosa* et un antibiotique auquel la souche est sensible, tel qu'établi par les méthodes conventionnelles, plus de 85 % des cellules ont affiché une fluorescence significativement supérieure à l'échantillon non traité (figure 21). Les cellules vivantes des souches bactériennes Gram-positives (*S. aureus* et *E. faecalis*) semblent posséder des membranes externes plus perméables à l'iodure de propidium. C'est pourquoi les quadrants définissant les régions des histogrammes ont été modifiés pour l'analyse du *S. aureus* (figure 23). Ainsi, uniquement les régions 2 et 3 ont dû être considérées pour l'évaluation du pourcentage de cellules fluorescentes chez les souches Gram-positives. Lorsque le *S. aureus* ou le *E. faecalis* sont sensibles à un antibiotique, la proportion de cellules fluorescentes variaient de 43 à 95 %, selon le type d'antibiotique utilisé.

Lorsqu'une bactérie a été déterminée par les méthodes conventionnelles comme étant résistante à un antibiotique, alors une incubation de deux heures avec une concentration inférieure à sa CMI pour cet agent ne devrait pas, théoriquement, affecter les cellules. Dans cette situation, aucune différence (ou seulement une légère augmentation) du nombre de cellules perdant leur intégrité et/ou leur potentiel membranaire ne devrait être observée, entre l'échantillon traité et l'échantillon non traité. En accord avec ce principe, *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubé deux heures avec 2/38 µg/ml de TMP/SMX (CMI pour cet antibiotique : entre 8/152 et 64/1216 µg/ml, tableau 10) n'a présenté aucun changement significatif dans son profil de fluorescence (figure 21I). Également, *S. aureus* ATCC 29213 incubé avec 0,125 µg/ml de pénicilline G (CMI : entre 0,5 et 2 µg/ml) n'a affiché que 10 % plus de cellules fluorescentes (dans les régions 2 et 3 des histogrammes) que durant une incubation en absence de pénicilline (figure 23F).

Dans le cas où la CMI d'une souche n'est que légèrement supérieure à la concentration utilisée dans le TSA-CMF, il ne fallait pas s'étonner de voir un effet significatif sur les cellules. Il a été démontré, à la figure 14, qu'une concentration d'ampicilline équivalente à la moitié de la CMI occasionnait un effet important sur les cellules d'*E. coli* LE392. Ainsi, les CMI de tétracycline pour *E. faecalis* ATCC 29212 et d'oxacilline pour *S. aureus* ATCC 43300 furent respectivement quatre et deux fois supérieures aux concentrations testées (figure 22H et 23E). Le nombre de cellules fluorescentes augmentait par rapport à l'échantillon vivant, mais restait faible proportionnellement aux échantillons traités avec une concentration d'antibiotique pour lequel la CMI était très inférieure. Il suffit de comparer le *S. aureus* ATCC 29213 traité avec 2 µg/ml d'oxacilline (CMI : 0.25 µg/ml) ; 86 % des cellules devenaient fluorescentes, alors que pour le *S. aureus* ATCC 43300, un traitement avec 2 µg/ml d'oxacilline (CMI : 4 µg/ml), la proportion de cellules fluorescentes n'a atteint que 46 %.

En tout, cinq discordances ont été observées, dont quatre mineures. Le résultat de fausse-sensibilité du *P. aeruginosa* ATCC 27853 à la tétracycline est une erreur importante, qui relève assurément d'un mécanisme plus complexe que l'effet d'une concentration sous-inhibitrice d'antibiotique. L'analyse de cette erreur est présentée dans la section 3.1 de la discussion.

Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les souches contrôles de l'ATCC, ainsi que pour *E. coli* LE392 et *E. coli* CC118 pUTminiTn5Km.

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> LE392	<i>E. coli</i> CC118pUTminiTn5	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Ampicilline	4	2	>512	-
Carbenicilline	16	-	-	8
Ceftriaxone	0.125	0.03	0.25	8-16
Ceftazidime	0.25	-	-	-
Gentamicine	0.25	0.25	0.5	1-2
Nitrofurantoïne	16	16-32	4	-
Norfloxacin	0.03	0.03-0.06	0.06	0.5-1
Oxacilline	-	-	-	-
Pénicilline G	-	-	-	-
Tétracycline	1	-	-	16
TMP/SMX	0.125/2.38	0.125/2.38	0.125/2.38-0.25/4.75	8/152-64/1216
Vancomycine	-	-	-	-
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 43300
Ampicilline	1	1	-	-
Carbenicilline	-	-	-	-
Ceftriaxone	-	-	2	-
Ceftazidime	-	-	-	-
Gentamicine	8	8	0.25	-
Nitrofurantoïne	16	16	32	16
Norfloxacin	2	2	1	1
Oxacilline	-	-	0.25	4
Pénicilline G	2	2-4	0.5-2	16
Tétracycline	16	-	-	-
TMP/SMX	-	-	0.06/1.14-0.125/2.38	0.06/1.14
Vancomycine	2	8	1	0.5

(- : non testé)

Figure 21 : Analyse du *P. aeruginosa* ATCC 27853 par le TSA-CMF comparée aux résultats des tests de sensibilité conventionnels.

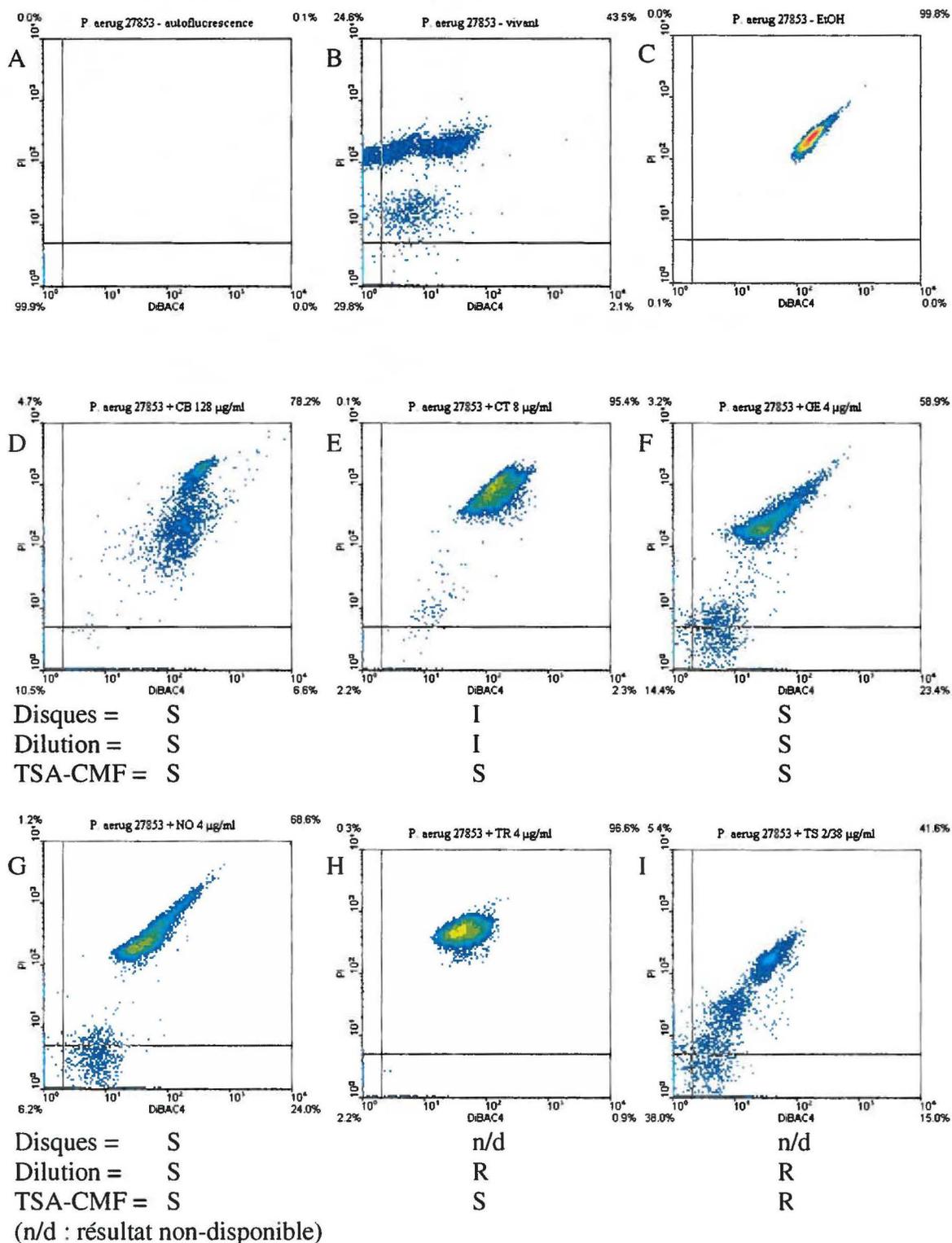
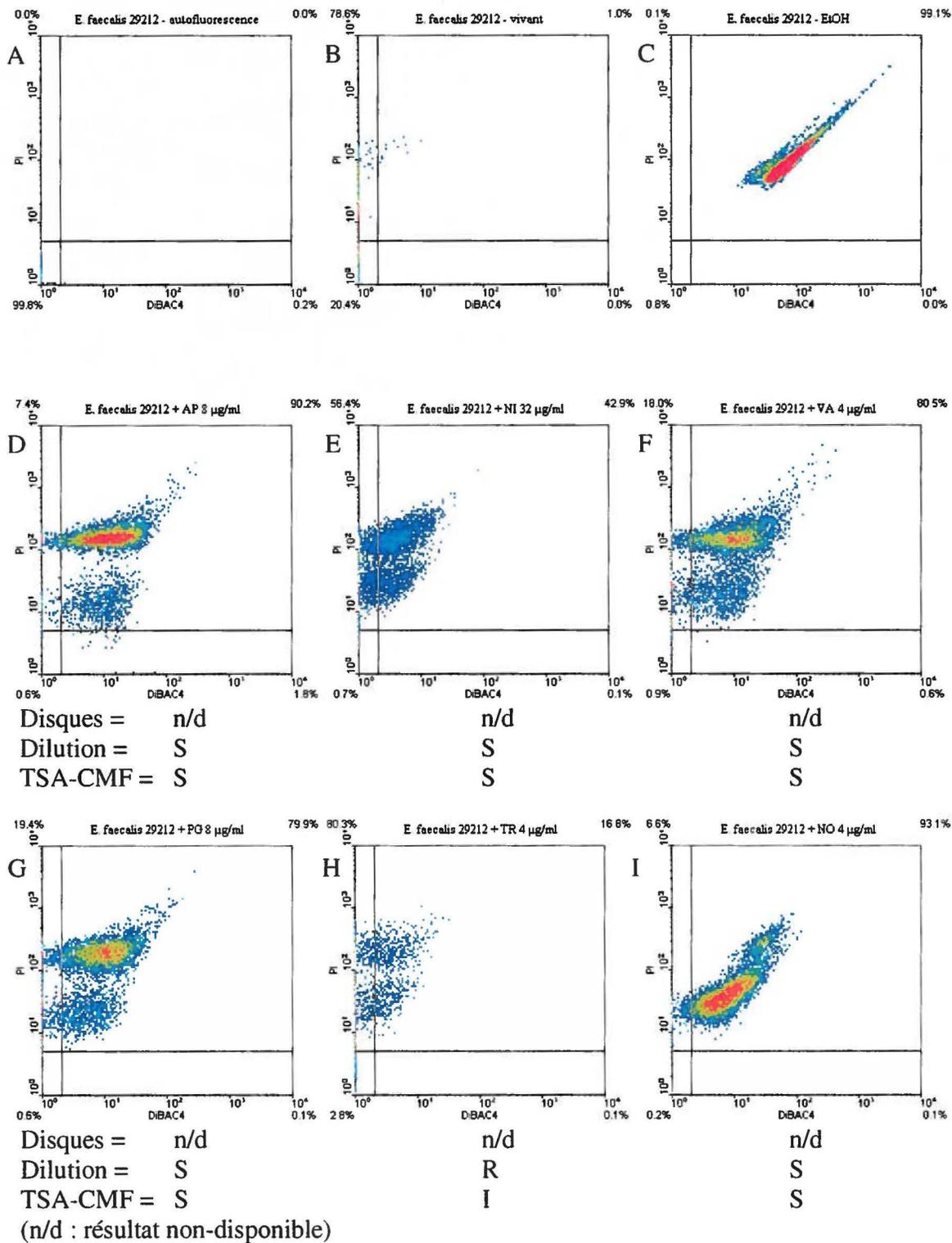
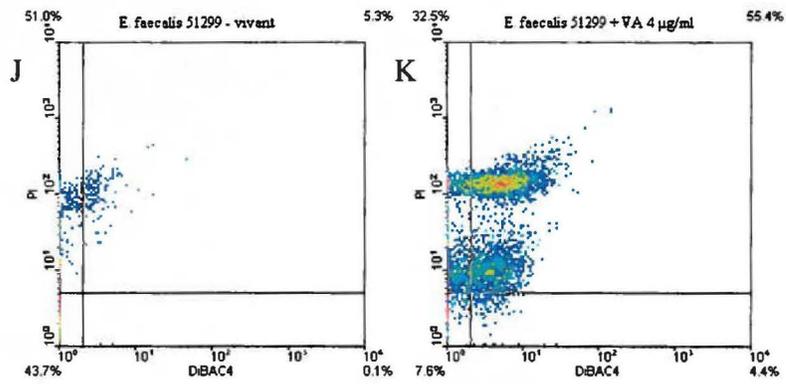


Figure 22 : Analyse du *E. faecalis* ATCC 29212 et ATCC 51299 par le TSA-CMF comparée aux résultats des tests de sensibilité conventionnels.

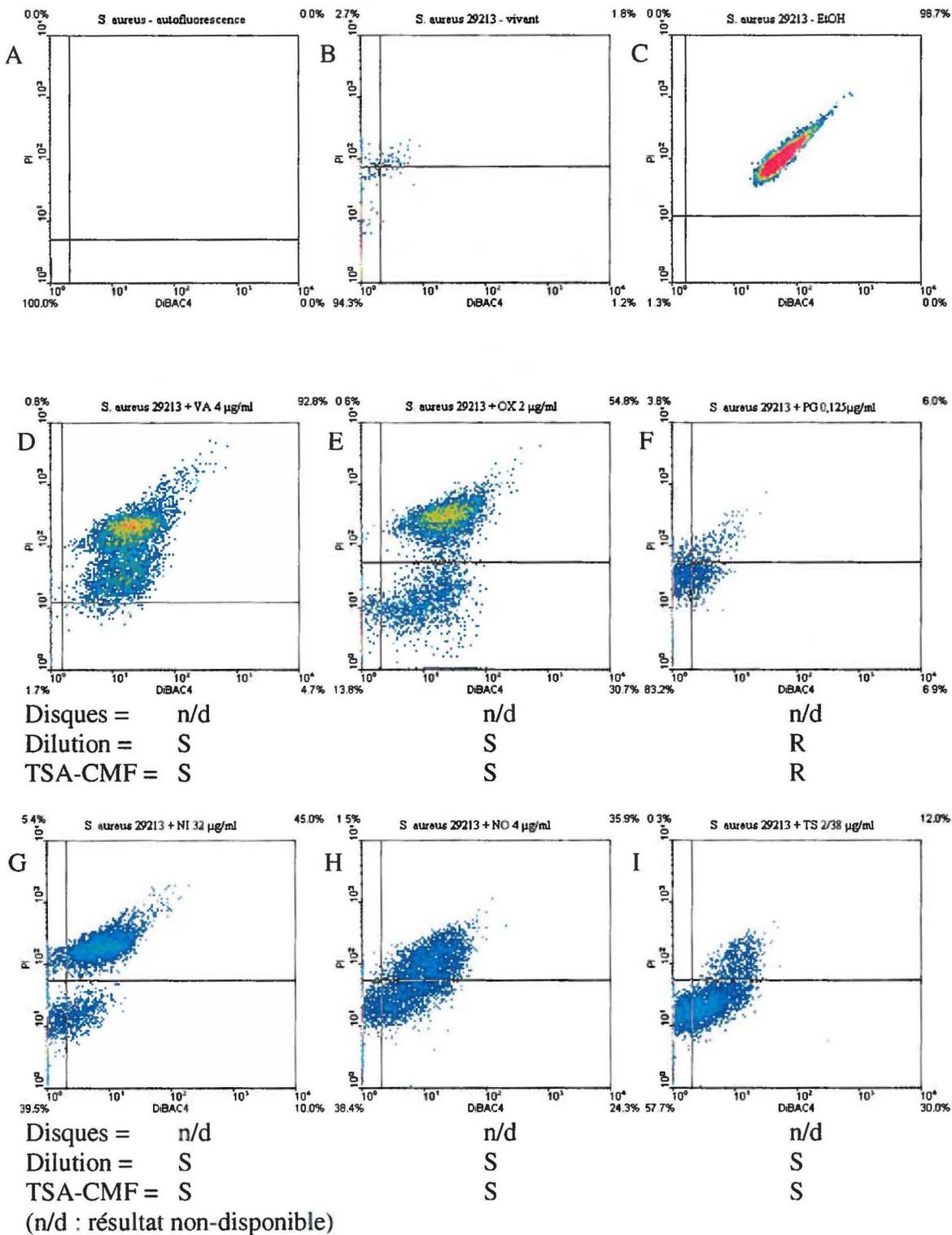


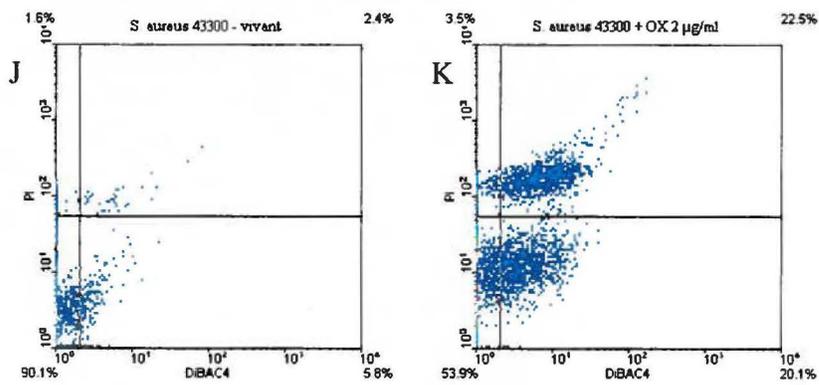


Disques = n/d
 Dilution = I
 TSA-CMF = I

(n/d : résultat non-disponible)

Figure 23 : Analyse du *S. aureus* ATCC 29213 et ATCC 43300 par le TSA-CMF comparée aux résultats des tests de sensibilité conventionnels.





Disques = n/d
Dilution = R
TSA-CMF = I

(n/d : résultat non-disponible)

7. Analyse des isolats cliniques d'urine

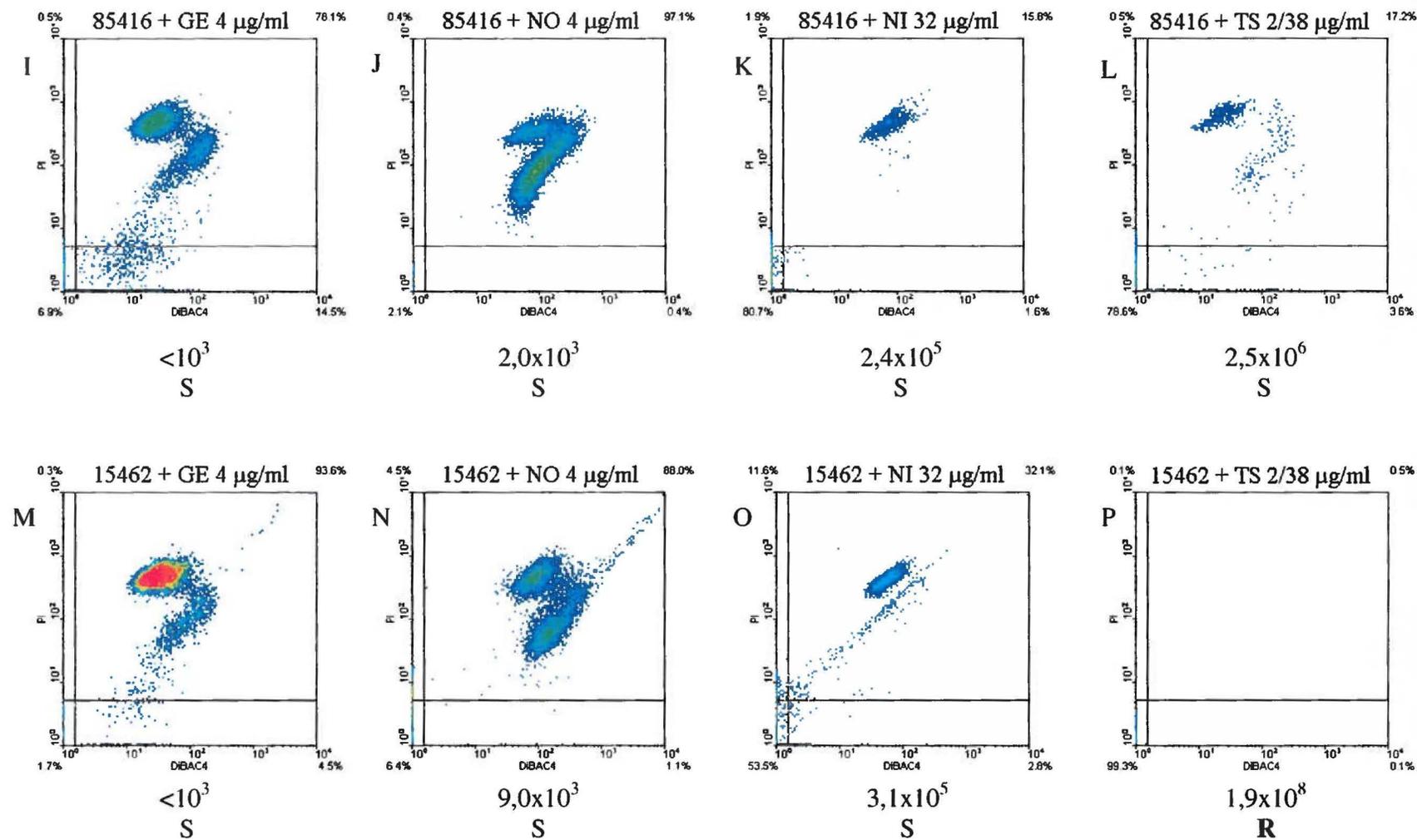
Après le développement du TSA-CMF et son évaluation par l'analyse des souches témoins, nous avons appliqué ce protocole à des échantillons cliniques. La première étape fut la récolte de souches cliniques, isolées à partir d'échantillons d'IVU. Vingt-quatre isolats urinaires furent choisis, afin d'obtenir au moins un représentant de chaque espèce bactérienne non-fastidieuse, qui se retrouvent le plus souvent en cause dans les cas d'IVU. Onze souches de *E. coli*, présentant une ou plusieurs résistances aux antibiotiques dans la liste du TSA-CMF furent sélectionnées, ainsi que deux souches de *P. aeruginosa*, une de *K. pneumoniae*, une de *Proteus mirabilis*, deux *E. faecalis* et sept souches de *Staphylococcus*, comprenant quatre *S. aureus* (tableau 11).

La figure 24 illustre deux résultats représentatifs du TSA-CMF sur les isolats cliniques. L'isolat *E. coli* 85416 a montré une sensibilité aux six antibiotiques, tel que révélé par la méthode d'UFC et les antibiogrammes par disques (figure 24C, D et I-L). Une parfaite corrélation a été obtenue avec la méthode de TSA-CMF. Une parfaite corrélation a aussi été obtenue avec l'isolat *E. coli* 15462, où les résistances à l'ampicilline et au TMP/SMX ont été détectées (figure 24 G, P).

Le TSA-CMF identifia correctement toutes les sensibilités et résistances des isolats urinaires de *E. coli* (tableau 11). Nous avons identifié neuf discordances entre le TSA-CMF et les deux méthodes conventionnelles avec les souches autres que *E. coli*. Deux erreurs «très majeures» (la méthode évaluée donne une interprétation de fausse-sensibilité) furent obtenues, uniquement par l'analyse de l'isolat *P. aeruginosa* 33122. Deux cas particuliers ont été observés avec *S. epidermidis* 85350 et *E. faecalis* 85356. Le TSA-CMF ainsi que le test par microdilution liquide ont interprété ces souches comme étant sensibles, respectivement à l'oxacilline et à la pénicilline G. Par contre, le test d'antibiogramme par disques indiqua une résistance pour les deux bactéries. Bien que ce ne soit pas un résultat de fausse-résistance, cette discordance fut interprétée comme étant une erreur «majeure».

Enfin, cinq erreurs mineures classiques furent interprétées par l'utilisation du TSA-CMF sur les isolats urinaires cliniques. Dans trois cas, le TSA-CMF a donné un résultat de sensibilité intermédiaire, alors que les méthodes conventionnelles ont donné soit des résultats de sensibilité, soit des résultats de résistance. Pour les deux autres cas, le TSA-CMF a fourni un résultat de sensibilité, tout comme l'interprétation fournie par le test de microdilution liquide, tandis que l'antibiogramme par disque a donné un résultat de sensibilité intermédiaire.

• Incubés 2h avec antibiotiques



8. Analyse des échantillons d'urine

La deuxième partie de l'application du TSA-CMF en situation clinique a consisté à analyser directement des échantillons urinaires. Dans les échantillons prélevés, seulement ceux contenant une concentration significative ($>10^5$ bactéries/ml) de bactéries furent conservés pour analyse en cytométrie.

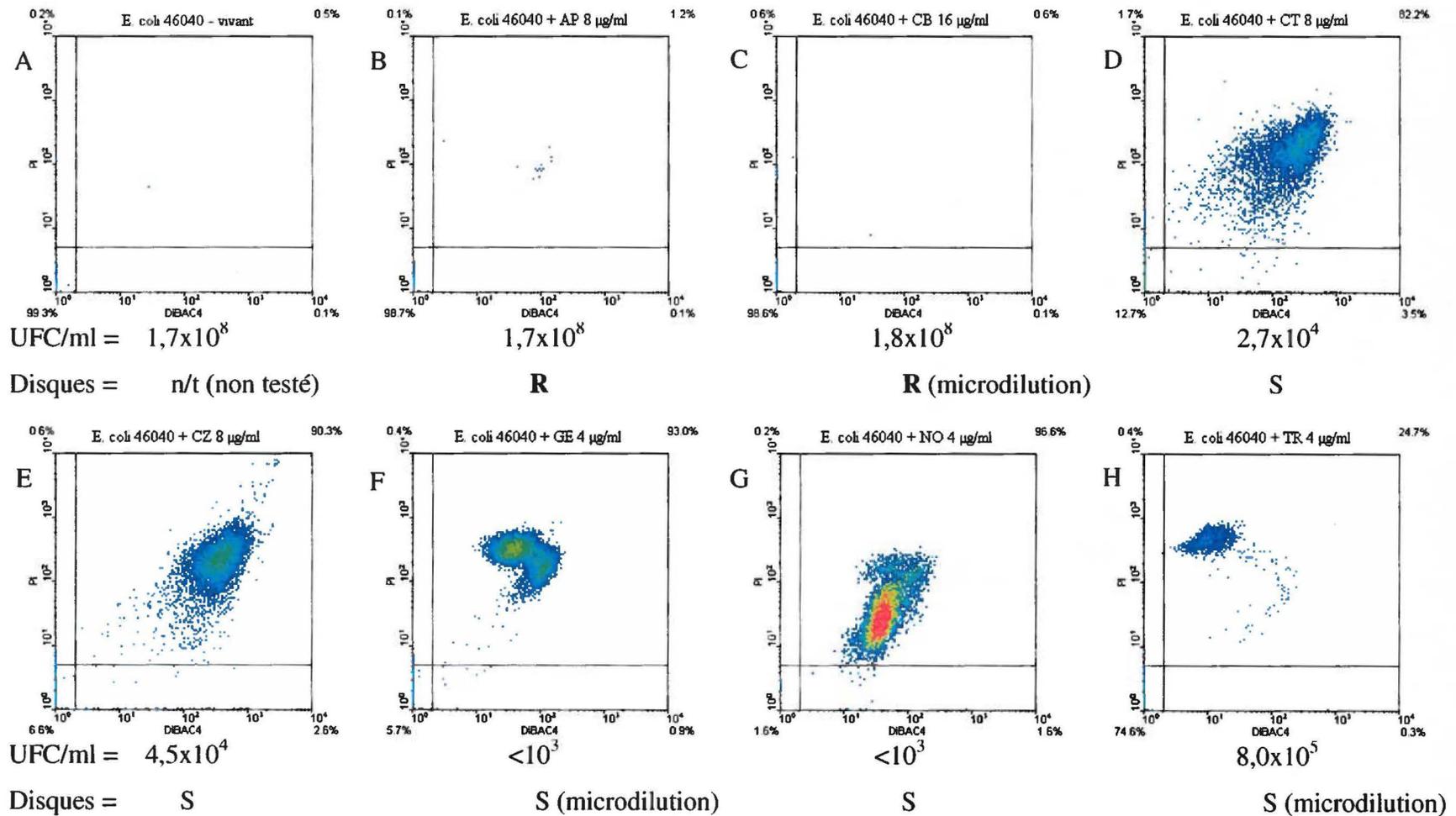
Sur les dix-neuf échantillons analysés, onze étaient constitués des IVU à *E. coli*, quatre avec *K. pneumoniae*, un avec *P. mirabilis* et un avec *Enterococcus* sp. Au total neuf discordances ont été observées. Seulement quatre erreurs mineures furent interprétées suite à l'application du TSA-CMF sur les *E. coli* retrouvés dans les échantillons d'urine. Les quatre souches de *K. pneumoniae* furent responsables de quatre erreurs, dont une mineure et trois interprétations de fausse-sensibilité pour la nitrofurantoïne (erreurs très majeures). Le seul *Proteus mirabilis* testé révéla une fausse-résistance pour la tétracycline (erreur majeure).

Les figures 25 et 26 montrent des résultats représentatifs obtenus avec la souche *E. coli* 46040 et la souche *K. pneumoniae* 43450 ayant causé une erreur de fausse-sensibilité pour la nitrofurantoïne. Les interprétations du TSA-CMF pour le *E. coli* 46040 correspondaient parfaitement avec les tests de sensibilité par microdilution et par disques, où la résistance à l'ampicilline et la carbénicilline ont été correctement observées par cytométrie en flux (figure 25B, C). L'analyse de la sensibilité à l'antibiotique nitrofurantoïne est plus facilement interprétée par l'observation de l'histogramme biparamétrique de l'intensité lumineuse recueillie par le détecteur FS par rapport à l'intensité de fluorescence du PI (figure 25J, M et N), puisque, dans la plupart des cas, peu de cellules ont été colorées au DiBAC₄ et au PI suite à un traitement de deux heures avec cet antibiotique. Par contre, les cellules auront tendance à s'allonger et à s'aggréger, ce qui est facilement observé par la lumière recueillie dans le FS.

Pour la souche *K. pneumoniae* 43450, la résistance à l'ampicilline et la carbénicilline ont également été adéquatement observées par les trois tests (figure 26B,

C). Malgré les résultats de résistance par les tests d'antibiogramme et par microdilution liquide, la souche 43450 s'est tout de même avérée sensible par le TSA-CMF, suite à un traitement de deux heures avec la nitrofurantoïne (figure 26J, M et N). Cet antibiotique a occasionné plusieurs erreurs de la sorte chez *K. pneumoniae* et d'autres espèces. La mauvaise fiabilité du TSA-CMF avec cet antibiotique est discutée plus loin, dans la section discussion.

Figure 25 : Histogrammes biparamétriques (DiBAC₄(3) vs PI) montrés en parallèle avec les comptes UFC et le test d'antibiogramme par disques pour le *E. coli* 46040 retrouvé dans un échantillon clinique d'urine.



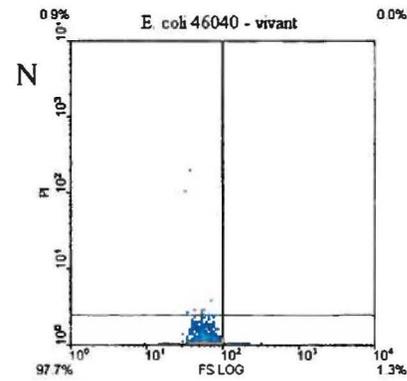
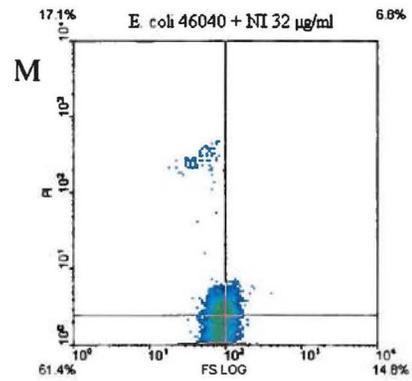
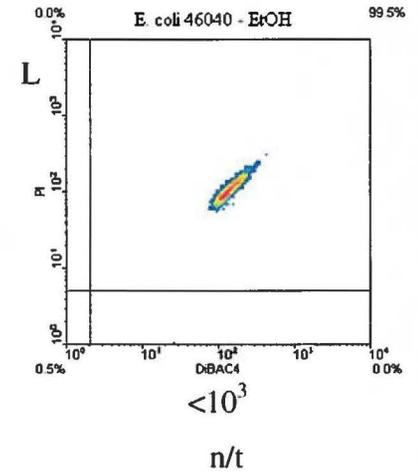
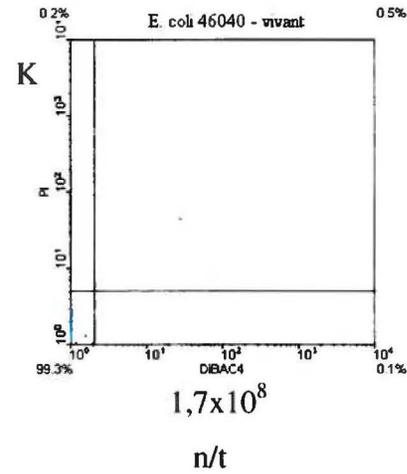
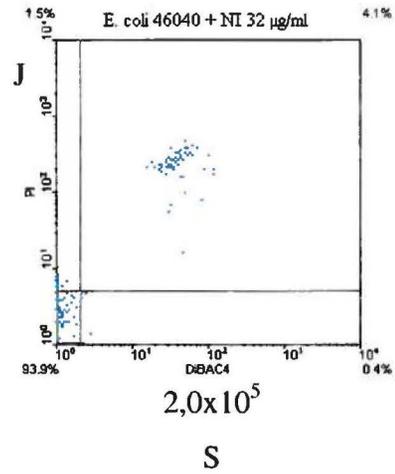
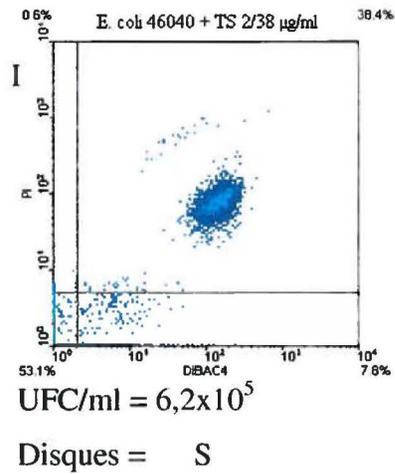
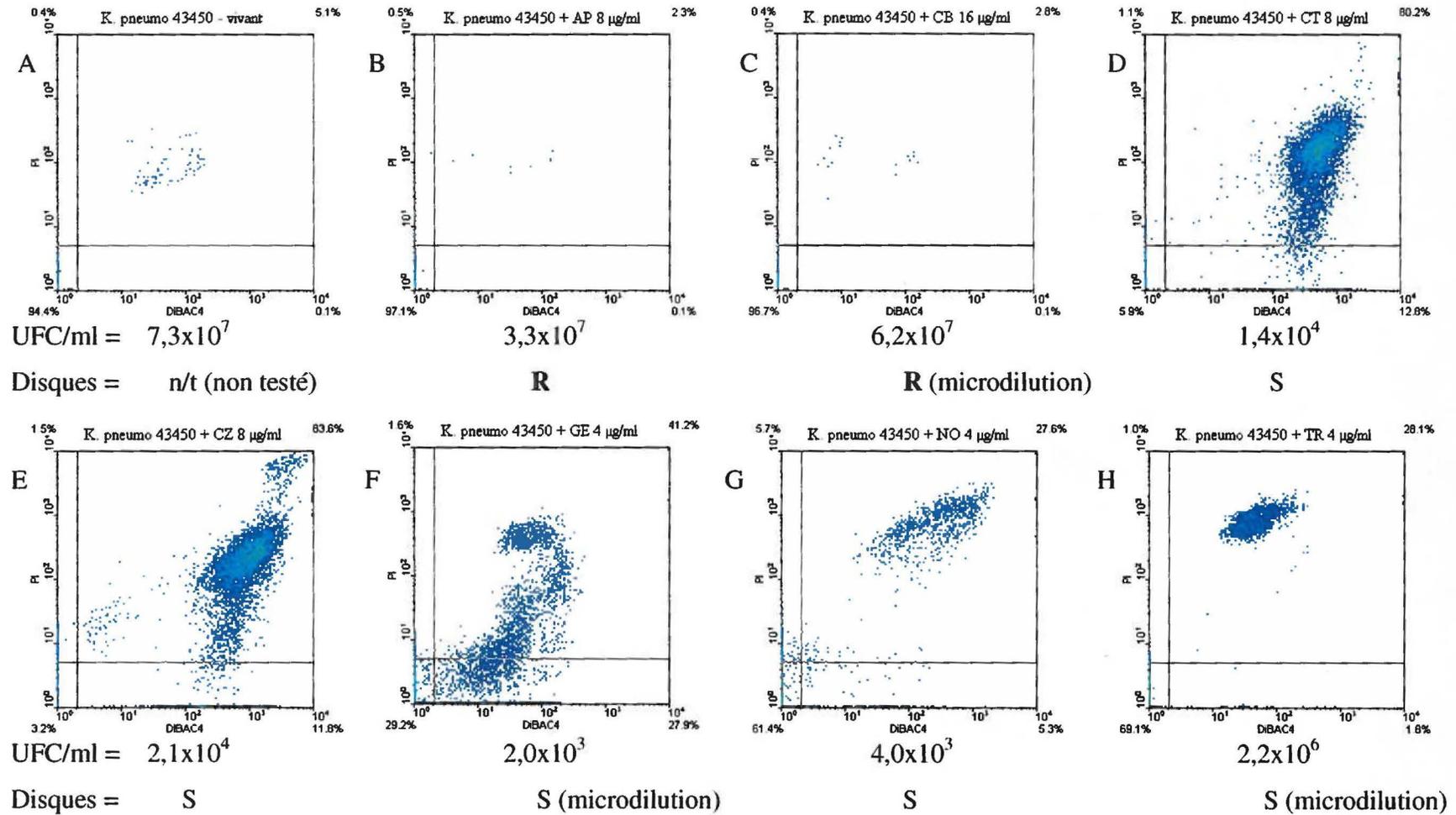
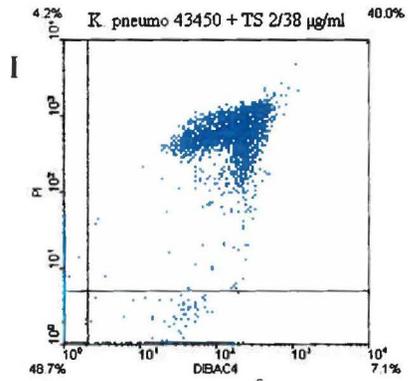


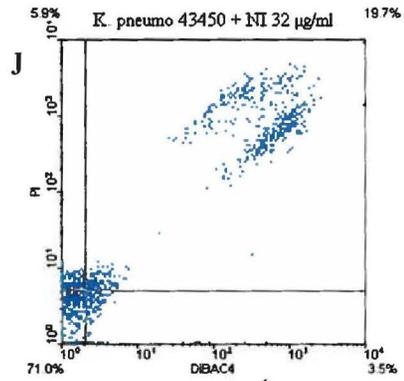
Figure 26 : Histogrammes biparamétriques (DiBAC₄(3) vs PI) montrés en parallèle avec les comptes UFC et le test d'antibiogramme par disques pour le *K. pneumoniae* 43450 retrouvé dans un échantillon clinique d'urine.





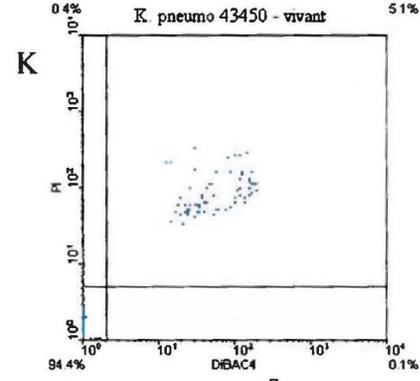
UFC/ml = $3,1 \times 10^5$

Disques = S



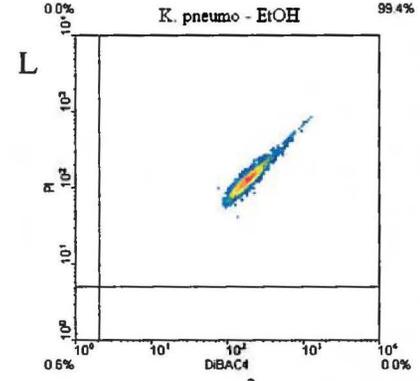
$2,0 \times 10^6$

R (disques et microdilution)



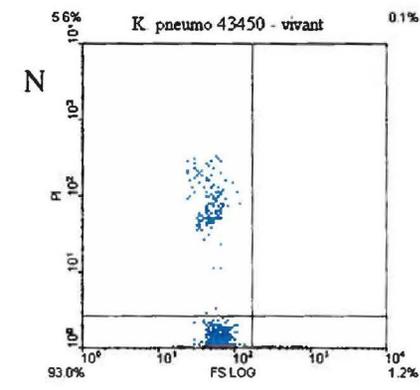
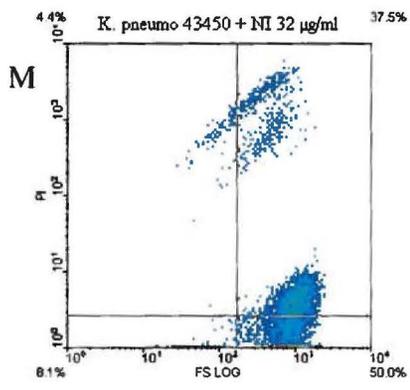
$7,3 \times 10^7$

n/t



$< 10^3$

n/t



9. Comparaison avec les méthodes conventionnelles

La comparaison des résultats de sensibilité fournis par la nouvelle technique avec ceux des deux méthodes conventionnelles est importante pour l'évaluation de la sensibilité globale et spécifique du TSA-CMF. On entend par sensibilité globale, le taux de corrélation entre les trois méthodes sur l'ensemble des analyses effectuées. Il a aussi été possible de calculer spécifiquement la sensibilité du test en cytométrie pour chacun des antibiotiques. Le tableau 11 présente la comparaison des interprétations de sensibilité pour toutes les analyses effectuées ($n = 346$) avec les souches témoins, les isolats cliniques et les souches contenues dans les échantillons d'urine. Le tableau 12 résume les résultats du tableau 11 et présente le calcul de la sensibilité globale et spécifique. Ainsi la sensibilité spécifique à chacun des antibiotiques variait de 70 à 100 %. Dans l'ensemble, la sensibilité globale était de 93,4 %, avec 23 erreurs sur 346 tests, dont 9 étaient majeures ou très majeures.

Tableau 11 : Comparaison des interprétations de sensibilité pour les isolats urinaires, les souches contrôles et les échantillons d'urine, selon les méthodes d'antibiogramme par disques, de microdilution liquide et selon le TSA-CMF.

Antibiotiques Concentrations (µg/ml) Tests de sensibilité	Ampicilline 8				Carbénicilline 16*				Ceftriaxone 8				Ceftazidime 8				Gentamicine 4				Nitrofurantoïne 32							
	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er				
Souches contrôles																												
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	S	S		S	S	S		S	S	S		S	S	S		S	S	S		S	S	S		S	S	S	
<i>P. aerug.</i> ATCC 27853					S	S	S		I	I	S	#1					S	S	S									
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		S	S																						S	S		
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299		S	S																						S	S		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213																									S	S		
<i>S. aureus</i> ATCC 43300																									S	S		
Isolats urinaires																												
<i>P. aerug.</i> 84434					S	S			I	I	I						S	S										
<i>P. aerug.</i> 33122					S	S			R	R	S	#3					S	S										
<i>K. pneumoniae</i> 85299	R	R	R						S	S	S						S	S							R	R	R	
<i>P. mirabilis</i> 85305	S	S	S						S	S	S						S	S							R	R	R	
<i>E. faecalis</i> 85356		S	S																						S	S	S	
<i>E. faecalis</i> 5715		S	S																						S	S	S	
<i>S. aureus</i> 85427																									S	S	S	
<i>S. aureus</i> 31918																									S	I		#1
<i>S. aureus</i> 112950																									S	S	S	
<i>S. aureus</i> 37650																									S	S	S	
<i>S. saprophyticus</i> 85424																									S	S	S	
<i>S. epidermidis</i> 85350																									S	S	S	
<i>Staph. coag.</i> 33880																									S	S	S	
<i>E. coli</i> 85416	S	S	S						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15462	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15475	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15478	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15667	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15755	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15757	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15758	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15760	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 15852	R	R	R						S	S	S						S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 44536	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
Échantillons d'urine																												
<i>E. coli</i> 41839	R	R	R		R	R			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 42278	R		R						S		S		S		S		S								S		S	
<i>E. coli</i> 44566	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 44582	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 44588	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 45147	R	R	R		R	R			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	I	#1
<i>E. coli</i> 45014	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 44071	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 45407	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 45428	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 46040	R	R	R		R	R			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 46069	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>E. coli</i> 46455	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							I	I	S	#1
<i>K. pneumoniae</i> 43449	R	R	R		R	R			S	S	S		S	S	S		S	S							R	I	S	#3
<i>K. pneumoniae</i> 43450	R	R	R		R	R			S	S	S		S	S	S		S	S							R	R	S	#3
<i>K. pneumoniae</i> 44208	R		R						S		S		S		S		S								R		S	#3
<i>K. pneumoniae</i> 45928	R	R	I	#1	R	R			S	S	S		S	S	S		S	S							S	S	S	
<i>P. mirabilis</i> 46479	S	S	S		S	S			S	S	S		S	S	S		S	S							R	R	R	
<i>Enterococcus</i> sp. 46449																									S	S	S	

S : sensible, I : intermédiaire, R : résistant. Tests de sensibilité ; D : antibiogramme par disques, L : microdilution liquide, C : TSA-CMF. Er : erreurs ; #1 : mineure, #2 : majeure, #3 : très majeure. * : Carbénicilline utilisée à 128 µg/ml pour *P. aeruginosa*.

Antibiotiques Concentrations (µg/ml) Tests de sensibilité	Norfloxacine 4				Oxacilline 2				Pénicilline G 0.125**				Tétracycline 4				TMP/SMX 2/38				Vancomycine 4			
	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er	D	L	C	Er
Souches contrôles																								
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	S	S										S	S	S		S	S	S					
<i>P. aerug.</i> ATCC 27853	S	S	S										R	S	#3		R	R						
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		S	S						S	S			R	I	#1								S	S
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299		S	S						S	S													I	I
<i>S. aureus</i> ATCC 29213		S	S		S	S			R	R							S	S					S	S
<i>S. aureus</i> ATCC 43300		S	I	#1	R	I	#1		R	R							S	S					S	S
Isolats urinaires																								
<i>P. aerug.</i> 84434	R	R	R										R	R			R	R	R					
<i>P. aerug.</i> 33122	S	S	S										R	S	#3		R	R	R					
<i>K. pneumoniae</i> 85299	I	S	S	#1													R	R	R					
<i>P. mirabilis</i> 85305	S	S	S														S	S	S					
<i>E. faecalis</i> 85356	I	S	S	#1					R	S	S	#2	S	S							S	S	S	
<i>E. faecalis</i> 5715		R	R						S	S													I	I
<i>S. aureus</i> 85427	R	R	R		S	S	S		R	R	R						S	S	S		S	S	S	
<i>S. aureus</i> 31918		R	R			R	I	#1	R	R							S	S	S				S	S
<i>S. aureus</i> 112950		S	I	#1		R	R		R	R							S	S	S				S	S
<i>S. aureus</i> 37650		R	R			R	R		R	R							S	S					S	S
<i>S. saprophyticus</i> 85424	S	S	S		S	S	S		S	S	S						S	S	S		S	S	S	
<i>S. epidermidis</i> 85350	R	R	R		R	S	S	#2	R	R	R						S	S	S		S	S	S	
<i>Staph. coag.</i> 33880	R	R	R		R	R	R		R	R	R						R	R	R		S	S	S	
<i>E. coli</i> 85416	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15462	S	S	S														R	R	R					
<i>E. coli</i> 15475	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15478	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15667	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15755	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15757	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15758	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15760	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 15852	S	S	S														S	S	S					
<i>E. coli</i> 44536	S	S	S										S	S			S	S	S					
Échantillons d'urine																								
<i>E. coli</i> 41839	S	S	S										R	R			S	S						
<i>E. coli</i> 42278	S	S	S														R	R						
<i>E. coli</i> 44566	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 44582	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 44588	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 45147	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 45014	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 44071	S	S	S										S	I	#1		S	S	S					
<i>E. coli</i> 45407	S	S	S										R	R			R	R	R					
<i>E. coli</i> 45428	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 46040	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>E. coli</i> 46069	S	S	S										S	I	#1		S	S	S					
<i>E. coli</i> 46455	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>K. pneumoniae</i> 43449	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>K. pneumoniae</i> 43450	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>K. pneumoniae</i> 44208	S	S	S														S	S						
<i>K. pneumoniae</i> 45928	S	S	S										S	S			S	S	S					
<i>P. mirabilis</i> 46479	S	S	S										S	R	#2		S	S	S					
<i>Enterococcus</i> sp. 46449	R	R	R		R	R			R	R							S	S			S	S	S	

** : Pénicilline G utilisée à 8 µg/ml pour *Enterococcus* spp. TMP/SMX : Triméthoprim/sulfaméthoxazole (ratio des concentrations : 1/19).

Tableau 12 : Résumé des incompatibilités d'interprétations de sensibilité entre le TSA-CMF et les deux méthodes conventionnelles.

		AP	CB	CT	CZ	GE	NI	NO	OX	PG	TR	TS	VA
Type d'erreur													
Souches ATCC nombre = 6	mineure			1				1	1		1		
	majeure												
	très majeure										1		
Isolats urinaires nombre = 24							1	3	1				
	mineure								1	1			
	majeure												
	très majeure			1							1		
Échantillons d'urine nombre = 19		1					2				2		
	mineure												
	majeure										1		
	très majeure						3						
Total des erreurs		1	0	2	0	0	6	4	3	1	6	0	0
		n = 36	n = 21	n = 35	n = 20	n = 33	n = 46	n = 49	n = 10	n = 14	n = 23	n = 45	n = 14
Sensibilités spécifiques (%)		97,2	100,0	94,3	100,0	100,0	87,0	91,8	70,0	92,9	73,9	100,0	100,0

Erreur mineure : légère contradiction entre les résultats des trois méthodes;
 Erreur majeure : le TSA-CMF donne un résultat de faux-résistant;
 Erreur très majeure : le TSA-CMF donne un résultat de faux-sensible.

	Total
mineure	14
majeure	3
très majeure	6
	23 n = 346
Sensibilité globale (%)	93,4

DISCUSSION

1. Détermination des meilleurs fluorochromes

Le développement du test de sensibilité aux antibiotiques par cytofluorométrie en flux (TSA-CMF) nécessita d'abord plusieurs expériences, autant en microscopie à épifluorescence qu'en cytométrie, afin de déterminer les meilleurs fluorochromes permettant la détection précise et fiable de la viabilité (ou la mortalité) bactérienne.

Une considération majeure pour l'utilisation de sondes fluorescentes, dans un test rapide de sensibilité par cytométrie, a été leur capacité à démontrer les effets des agents antimicrobiens sur les cellules individuelles. Les modes d'action de la plupart des fluorochromes testés dépendaient d'une façon ou d'une autre de la membrane plasmique ; soit la perte d'intégrité de celle-ci ou de sa dépolarisation. Par contre, les antibiotiques n'ont pas tous un effet direct sur la membrane des bactéries (Yao et Moellering Jr., 1995). Même si l'attaque de la plupart des antibiotiques se déroule ailleurs que sur la membrane interne, les effets sur celle-ci apparaissent assez rapidement pour justifier l'emploi de telles sondes fluorescentes (Davey et Kell, 1996).

L'iodure de propidium est une sonde très efficace pour démontrer la perméabilité membranaire, et conséquemment, la perte de viabilité (Nebe-von Caron et coll., 1998). Sa capacité à rendre fluorescentes les cellules bactériennes en rouge a rendu possible la combinaison de cette sonde avec un fluorochrome émettant à une longueur d'onde inférieure. Durant les essais des différents fluorochromes, le DiBAC₄(3) se distingua particulièrement pour sa grande spécificité et ses qualités spectrales. Ces résultats confirment ceux de Mason et coll. (1995a), de Deere et coll. (1995) et de Jepras et coll. (1997). Les cellules non-traitées, en croissance exponentielle (cellules «vivantes»), n'ont affiché aucune fluorescence pour cette sonde spécifique à la dépolarisation membranaire. Lorsque l'échantillon de bactéries fut traité soit avec l'éthanol, la chaleur ou un antibiotique, les cellules sont devenues très fortement fluorescentes (d'une couleur verte). La combinaison (DiBAC₄(3) + PI) fut choisie pour le protocole du TSA-CMF. Plusieurs auteurs ont aussi conclu la supériorité de ces deux fluorochromes pour déterminer la mortalité bactérienne (Comas et Vives-Rego, 1997 et 1998 ; Mason et coll., 1995b et

1997a, Sheppard et coll., 1997 ; Chapple et coll., 1998). Toutefois, ces auteurs ont utilisé le DiBAC₄(3) et le PI séparément. Nous sommes les premiers à démontrer que les deux sondes peuvent être combinées. La coloration s'est effectuée rapidement (5-10 minutes / T°p) et aucun traitement préalable des cellules n'a été nécessaire pour ces fluorochromes. L'interaction entre les molécules fluorescentes et les antibiotiques en solution n'a pas eu à être considérée dans ce protocole, puisque les échantillons ont été lavés au PBS avant d'être colorés.

2. Optimisation du protocole

L'efficacité maximale de cette combinaison de sondes, permettant la visualisation des bactéries ayant perdu leur potentiel électrique et l'intégrité membranaire sous l'effet d'un antibiotique, a été atteinte lorsque ce dernier fut utilisé à quatre fois la CMI pour la souche en question. Jepras et coll. (1997) ont utilisé une concentration équivalente à cinq fois la CMI, lors d'une évaluation des effets de l'azithromycine, le cefuroxime et le ciprofloxacine sur *E. coli*, grâce au DiBAC₄(3). Walberg et coll. (1997a) ont évalué les effets de la ceftazidime, du ciprofloxacine et de la gentamicine. Leurs résultats indiquaient de fortes augmentations de fluorescence pour le bromure d'éthidium combiné à la mithramycine, à des concentrations de 8 fois la CMI. Cependant, les effets de la fluoroquinolone, le ciprofloxacine, étaient moins intenses que ceux causés par la gentamicine ou la ceftazidime. Nos résultats avec le norfloxacine (une autre fluoroquinolone) correspondaient bien avec les observations de Walberg et de Mason et coll. (1995b).

Les effets des antibiotiques sur la morphologie cellulaire et sur les intensités de fluorescences augmentent également en fonction du temps d'incubation. Bien que certains changements morphologiques (ex : la filamentation des cellules après 30 minutes d'incubation avec l'ampicilline) soient observables assez rapidement par la cytométrie en flux (Mason et coll., 1994 ; Walberg et coll., 1996), une incubation d'une à deux heures fut nécessaire pour avoir une bonne idée de la sensibilité de la souche étudiée, peu importe les sondes fluorescentes ou les techniques d'observation. Même si le taux de

division des bactéries d'importance clinique se situe entre 20 et 30 minutes, l'addition d'antibiotiques dans une culture non-synchronisée peut résulter en de nombreuses sous-populations, puisque la tolérance des organismes individuels variera selon l'étape de son cycle cellulaire (Suller et Lloyd, 1999). Notre observation qu'un minimum de 2 h d'incubation, pour les antibiotiques testés, semble ainsi justifiée.

3. Application du protocole

Après l'optimisation des paramètres d'incubation avec les antibiotiques, le protocole final a pu être établi (figure 18). L'utilisation des antibiotiques à leurs concentrations limites définies par le NCCLS pour l'interprétation de sensibilité, s'imposa naturellement compte tenu de la sensibilité inconnue des isolats et des échantillons cliniques. Suller et Lloyd (1999) ont également opté pour ces concentrations, lors de leurs essais sur trois isolats cliniques.

Avant d'entreprendre l'application du protocole sur les souches témoins et cliniques, il fut important de vérifier la validité des comptes d'événements non-fluorescents pour la représentation de cellules individuelles viables, en jugeant leur capacité de reproduction sur géloses nutritives. La filtration à 0.2 μm du tampon phosphate (PBS) et les lavages des échantillons bactériens devenaient ici assez importants. En effet, malgré la filtration simple ou double d'une solution fraîche de PBS, de 5×10^3 à 1×10^4 particules, poussières ou cristaux de même dimension que les bactéries ($\sim 1 \mu\text{m}$) étaient analysés à chaque millilitre, parallèlement avec les cellules procaryotiques. Dans la plupart des cas, ce bruit de fond ne comportait aucune implication sur la corrélation entre les comptes de viabilité par cytométrie et par les unités formatrices de colonies (UFC). D'excellentes corrélations furent obtenues, autant pour une culture pure en phase de croissance, que des aliquotes traitées avec des concentrations ou des temps d'incubation variables d'antibiotiques.

Comme les résultats de Jepras et coll. (1997), les comptes de viabilité par cytométrie en flux, suite au marquage des cellules dépolarisées par le DiBAC₄(3), ont été légèrement plus élevés que les comptes d'UFC. Ainsi, l'existence d'un état physiologique «viable mais non-cultivable» est supporté par plusieurs recherches ayant évalué la corrélation des comptes bactériens par cytométrie et par reproduction sur milieu nutritif (Mason et coll., 1995b ; Suller et Lloyd, 1999). Par contre, Nebe-von Caron et coll. (1998) ont démontré, par l'application de la séparation (par un «FACS» ou «fluorescence-activated cell sorter», le Coulter EPICS Elite) de sous-populations de *Salmonella typhimurium* suite à un marquage triple au BrEt, au PI et au DiBAC₄(3), une récupération sur gélose de 34 % des cellules dépolarisées, mais non perméabilisées. La mortalité des cellules fluorescentes uniquement pour le DiBAC₄(3) doit donc être interprétée avec précaution. Ces chercheurs ont cependant démontré que lorsqu'une population de cellules affiche une fluorescence double pour le DiBAC₄(3) et le PI, le taux de récupération d'unités viables tombe à 0 %.

Un autre phénomène a été observé dans nos résultats ; l'effet «post-antibiotique» (PAE). Cet effet, également observé en cytométrie par de nombreux auteurs (Suller et Lloyd, 1998 et 1999 ; Wickens et coll., 1998 ; Gottfredsson et coll., 1998) implique une grande perte de viabilité pour des bactéries incubées temporairement avec un antibiotique. Ce phénomène de persistance de l'effet antimicrobien après le retrait de l'agent du milieu de culture se présente seulement avec certaines combinaisons bactéries-antibiotiques. Notamment, lorsque le *E. coli* ATCC 25922 a été incubé pendant 1 h avec la gentamicine à 2 fois sa CMI, la destruction des cellules a continué durant les 45 minutes suivant le retrait de l'antibiotique (Gottfredsson et coll., 1998). Dans nos résultats, ceci correspondait à la discordance des comptes de viabilité illustrée à la figure 20. Le compte de cellules non-fluorescentes après 2 h d'incubation avec 4 µg/ml de gentamicine donnait 1.4×10^6 cell./ml, alors qu'une aliquote de cet échantillon présentait un nombre d'UFC inférieur à 10^3 par ml.

3.1 Souches témoins

Le TSA-CMF a été principalement évalué à l'aide de la souche *E. coli* ATCC 25922. La sensibilité de cette souche pour les antibiotiques fut démontrée sans faille par le TSA-CMF. Les profils de dispersion lumineuse et de fluorescence par le marquage double ont été très reproductibles, lorsque nous avons analysé les mêmes combinaisons d'espèces bactériennes et d'antibiotiques pour une bonne portion des antibiotiques testés. Les résultats peuvent difficilement être comparés avec ceux fournis par d'autres cytomètres, mais la tendance générale des profils de dispersion (ex : étalement plus large avec l'ampicilline et les céphalosporines, qu'avec la gentamicine) corrèle avec les observations d'autres laboratoires (Gant et coll., 1993 ; Walberg et coll., 1997). Certains agents bactériostatiques tels la nitrofurantoïne, la tétracycline et le triméthoprim/sulfaméthoxazole n'occasionnaient qu'une faible proportion (5 à 50 %) de cellules fluorescentes dans un échantillon d'une souche sensible, même après 4 h d'incubation. Cependant, le profil de cette faible population était souvent caractéristique et les signaux de lumière dispersée vers le FS et/ou SS générés par l'analyse d'un échantillon bactérien sensible, pouvaient être souvent deux fois plus intenses que les signaux de l'échantillon témoin (sans antibiotique). De plus, nous avons remarqué que les antibiotiques du même type, particulièrement les β -lactames (AP, CB, CT, CZ) procurent des profils de dispersion lumineuse et de fluorescence semblables (figures 20, 24 et 25).

Suite à ces observations, il fallut établir les critères de sensibilité pour les douze antibiotiques, combinés aux six genres microbiens disponibles. Encore une fois, les β -lactames (AP, CB, CT, CZ), classe d'antibiotiques qui inhibent la synthèse du peptidoglycane se démarquèrent lors de leur utilisation sur des bactéries résistantes (particulièrement avec les entérobactéries) par l'absence complète de cellules fluorescentes et très peu de changements significatifs dans les profils FS et SS. Une comparaison entre deux *E. coli*, l'un sensible à l'ampicilline (ATCC 25922) et l'autre contenant un plasmide de résistance pour cet antibiotique (CC118 pUTminiTn5Km) a bien démontré cette affirmation. Bien que la pénicilline G et l'oxacilline soient également des β -lactames, elles furent réservées pour les bactéries Gram-positives (entérocoques et

staphylocoques). Les résultats du TSA-CMF pour ces antibiotiques n'étaient pas aussi évidents que ceux pour les β -lactames contre les entérobactéries. On peut constater ce fait à la figure 23, où nous remarquons une proportion non-négligeable de cellules fluorescentes au PI dans les échantillons de *S. aureus* résistants à la pénicilline G (souche ATCC 29213) et à l'oxacilline (souche ATCC 43300).

Les analyses par le TSA-CMF des espèces autres que *E. coli* sont généralement plus vulnérables aux erreurs. En effet, le *P. aeruginosa* a démontré un caractère unique parmi les espèces étudiées ; de 15 à 60 % des cellules non-traitées, en phase de croissance exponentielle affichaient régulièrement une forte fluorescence pour le PI et/ou la combinaison PI + DiBAC₄(3). Ceci n'était pas dû à l'autofluorescence des composantes cytoplasmiques ou membranaires normales. *P. aeruginosa* possède une paroi externe et une membrane cytoplasmique fort différentes de *E. coli* qui pourraient simplement être un peu plus perméables à l'iodure de propidium. En effet, cette bactérie aérobic stricte perd rapidement son énergie lorsqu'elle est dépourvue d'une source de nutriments. La paroi externe devient alors plus perméable (Hancock, 1999). Cette bactérie est également très sensible aux changements de température, comme par exemple une période d'attente à température de la pièce ou sur glace (Lei et coll., 1991). Les fausses interprétations de sensibilité avec cette espèce peuvent être le résultat de la méthodologie utilisée dans le protocole du TSA-CMF; les échantillons étant lavés au PBS, puis attendent quelques minutes avant l'analyse en cytométrie. *P. aeruginosa* et *E. faecalis* possèdent des systèmes membranaires de transport actif (Lewis et coll., 1997). L'entrée en action de ces pompes à efflux qui expulsent des composés cationiques (comme la tétracycline) pourrait causer un débalancement du gradient ionique, ce qui expliquerait l'entrée de fluorochromes anioniques (Ocaktan et coll., 1997). Des échantillons de *P. aeruginosa* 57RP sans antibiotique n'ont pas montré de différence significative entre les comptes totaux de cellules et les comptes de viabilité par UFC, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'accumulation de cellules mortes (non dégradées) dans les cultures en phase de croissance logarithmique.

3.2 Isolats urinaires

Toutes les sensibilités et résistances pour les isolats d'*E. coli* furent correctement identifiées par le TSA-CMF. Les autres espèces ont été sélectionnées afin de représenter au maximum la biodiversité mise en cause dans les infections des voies urinaires (IVU). Le fait que les erreurs proviennent uniquement des résultats avec les espèces autres que *E. coli* nous pousse à analyser un peu plus en profondeur ce phénomène.

Au total, neuf erreurs se sont introduites dans les interprétations des résultats pour les isolats urinaires autres que *E. coli* (n = 77 analyses), correspondant à un taux de réussite de 88,3 %. Les deux erreurs «très majeures» (fausse-sensibilité par le TSA-CMF) proviennent uniquement de la souche *P. aeruginosa* 33122. Ceci était principalement dû au fait que 43 % des bactéries étaient fluorescentes dans l'aliquote non-traitée (cellules «vivantes»), rendant ainsi plus ardues les interprétations subséquentes. Ainsi, 89 % et 83 % des bactéries traitées respectivement avec la ceftriaxone et la tétracycline (plus une déformation significative du profil de dispersion) étaient fluorescentes, ce qui a corrélié avec la chute des comptes de viabilité (UFC) à ~ 15 % (CT) et 2,5 % (TR) par rapport au nombre d'unités viables dans l'échantillon de cellules vivantes. Ces résultats pour ces deux antibiotiques suggéraient des interprétations de sensibilité. Cependant, la souche s'est révélée résistante dans les tests conventionnels. En considérant qu'aucune souche (témoin ou clinique) de *P. aeruginosa* sensible soit à la ceftriaxone ou soit à la tétracycline n'a pu être analysée, il est impossible de conclure que les critères de sensibilité pour ces deux combinaisons bactéries-antibiotiques, ainsi que certaines autres combinaisons impliquant des souches autres que *E. coli*, ont été mal évalués.

Un autre facteur à considérer fut la stabilité génotypique et phénotypique de la résistance dans les isolats cliniques testés. Dans les neuf erreurs mentionnées plus haut, quatre d'entre elles étaient d'un type particulier. En effet, le test d'antibiogramme par disque donna des résultats de résistance ou de résistance intermédiaire, alors que le test de CMI par microdilution liquide et le TSA-CMF, fournissaient des résultats de sensibilité. Les isolats autres que *E. coli* furent prélevés, repiqués et conservés par le laboratoire

clinique plusieurs mois avant que leurs profils de sensibilité soient évalués par les techniques de microdilution et par cytométrie dans notre laboratoire. Il est donc possible que l'expression et même la présence des gènes de résistance (surtout si ceux-ci sont situés sur des éléments transposables) aient été perdues suite au retrait de la pression sélective qui favorisaient la résistance *in vivo*.

3.3 Échantillons urinaires

Les bactéries résistantes provenant des échantillons urinaires furent analysées directement au TSA-CMF. Leurs profils de sensibilité par microdilution furent obtenus suite à un seul repiquage sur géloses nutritives. Aucune erreur pouvant être attribuée à la perte d'expression de résistance n'a été observée dans cette dernière application.

Deux types d'approches peuvent être soutenus dans la méthodologie des tests de sensibilité aux antibiotiques sur les bactéries retrouvées en infections urinaires. La première préconise d'abord l'isolement de colonies isolées, suite à l'incubation d'une nuit sur géloses sang et MacConkey, puis la sélection d'une ou plusieurs colonies semblables pour l'analyse de sensibilité (Laverdière et Restieri, 1999). La deuxième approche procède par l'identification et la sensibilité effectuées en parallèle à partir d'une certaine quantité d'urine (1 à 100 μ l). La sensibilité de cette technique, permettant l'obtention des profils de sensibilité aux antibiotiques, 24 h avant la méthode conventionnelle, varie de 94,3 à 98,2 % selon les études (Oakes et coll., 1994 ; Johnson et coll., 1995 ; Gillenwater et Clark, 1996). Ces derniers auteurs (Gillenwater et Clark, 1996) ont obtenu un taux de 98,2 %, notamment à cause de rejet des analyses directes sur des cultures mixtes ; 23,1 % des cultures positives d'urines étaient mixtes. Johnson et coll. (1995) ont comparé les résultats de la méthode directe sur les cultures mixtes avec ceux de la méthode standard pour chacune des espèces retrouvées. Dans leur cas, 95,5 % des sensibilités aux antibiotiques étaient en accord.

Les cultures mixtes ne furent pas tenues pour compte dans nos analyses. L'étape de préparation d'inoculum pour le TSA-CMF favorise évidemment les bactéries non-

fastidieuses, ayant la capacité de croître rapidement. Cependant, comme *E. coli* se trouve en cause dans ~ 80 % des IVU, et que le 20 % restant est principalement partagé par les espèces comprises dans les isolats urinaires que nous avons choisis, la vitesse de croissance n'est qu'un problème mineur, la dilution subséquente à la culture initiale pouvant être diminuée. Durant l'application du protocole sur les isolats et échantillons urinaires, seuls les entérocoques et le *Staphylococcus epidermidis* ont nécessité cette modification.

Une autre considération lors d'analyse directe des échantillons d'urine est la possibilité de contamination, pendant la collecte, le transport et la manipulation des urines. Une étude réalisée par le Collège des pathologistes américains rapporte que le taux de contamination des échantillons urinaires varie, selon les établissements, de 5,6 à 36,8 %, se situant en moyenne autour de 18 % (Valenstein et Meier, 1998).

4. Validation du protocole

La validation du TSA-CMF par les techniques conventionnelles fut un objectif important du projet. L'évaluation des différents effets d'agents antimicrobiens a été démontrée efficacement par la cytométrie flux. L'application du protocole sur des isolats et des échantillons urinaires, en tant que méthode rapide offrant une alternative aux tests conventionnels, mérite une validation particulière.

Les deux méthodes standards utilisées (antibiogramme par disques et microdilution liquide) démontrent la croissance bactérienne macroscopique et son inhibition, suite à l'effet d'un ou plusieurs agents microbiens. Lorsque les méthodes suivent les standards établis par le NCCLS, les résultats peuvent être interprétés en utilisant des tables publiées par cet organisme et mises à jour annuellement. Les diamètres des zones d'inhibition, par le test de diffusion, et les concentrations minimales inhibitrices, par le test de microdilution, sont alors corrélés avec les interprétations de sensibilité, de sensibilité intermédiaire, ou de résistance, selon des critères spécifiques à chaque combinaison de genre bactérien et d'agent antimicrobien.

L'analyse des résultats du TSA-CMF s'est effectuée d'une façon similaire à celle des résultats fournis par les antibiogrammes par disques. En effet, les profils d'intensité de fluorescence, c'est-à-dire le pourcentage de cellules affichant l'une ou l'autre des fluorescences (soit pour le DiBAC₄(3), le PI ou les deux), les profils de dispersion lumineuse (vers les détecteurs FS et SS), ainsi que la concentration cellulaire de l'échantillon ont tous été des résultats spécifiques à chaque combinaison bactéries-antibiotiques. Ils ont fait l'objet d'une comparaison avec les critères décrits à la section 5 des résultats, afin de pouvoir interpréter la sensibilité ou la résistance de la bactérie contenue dans un échantillon. Ces critères ne sont pas encore établis officiellement. Chaque groupe de recherche effectuant ce type d'analyse doit établir ses propres normes et critères d'interprétations, puisque ceux-ci vont varier selon de nombreux facteurs qui seraient difficiles à standardiser, comme, par exemple, le type et le modèle du cytomètre utilisé. Le système informatique couplé au cytomètre pourrait facilement être programmé à effectuer la comparaison des résultats avec les critères de sensibilité, simultanément à l'acquisition de données. Cette analyse en temps réel pourrait réduire considérablement le temps, le labeur et l'erreur humaine associés à l'interprétation des résultats.

Les expériences préliminaires de cinétiques, effectuées au début de ce projet, ont servi à établir les critères d'interprétations pour le TSA-CMF. La description complète et la standardisation des trois niveaux de sensibilité (sensible «S», intermédiaire «I», résistant «R») pour les six genres bactériens et la douzaine d'antibiotiques choisis est un travail monumental qui n'a pu être réalisé dans le cadre de ce projet. De plus, aucune bactérie résistante à la ceftazidime, la gentamicine ou la vancomycine n'a pu être observée par cytométrie en flux. L'analyse des isolats urinaires constitués d'espèces bactériennes autres que *E. coli* ont démontré que ces critères sont encore mal définis pour certaines combinaisons bactéries-antibiotiques.

On peut remarquer, dans le tableau 12, une corrélation évidente entre le type d'antibiotique testé et la quantité d'erreurs générée. Les travaux de Johnson et coll. (1995), ainsi que ceux de Gillenwater et Clark (1996) ont également permis de faire une

corrélation entre les agents antimicrobiens et le taux d'erreurs, lors de l'application d'un test de sensibilité appliqué directement sur les spécimens d'urine. Ils ont remarqué que les antibiotiques les moins fiables (céphalothin, nitrofurantoïne, mezlocillin et tétracycline) étaient également ceux dont l'utilisation en clinique date depuis très longtemps. Le ticarcillin-clavulanate, la carbénicilline, le ciprofloxacine et la ceftriaxone seraient des agents très fiables. De la même façon, nos résultats indiquent une fiabilité de 100 % pour notre test avec la carbénicilline, la ceftazidime, la gentamicine, le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la vancomycine, tandis que les agents oxacilline, tétracycline, et nitrofurantoïne montrent une fiabilité de 70 à 87 %, lorsqu'on compare nos résultats avec ceux des méthodes conventionnelles. En tout, 52 % des erreurs (12/23) du TSA-CMF furent occasionnées par la nitrofurantoïne et la tétracycline. Une de ces erreurs, la fausse-sensibilité du *K. pneumoniae* 43450 à la nitrofurantoïne, est démontrée à la figure 26. Pourtant, le nombre d'unités viable chute de 7.3×10^7 à 2×10^6 UFC/ml, après le traitement avec cet agent bactériostatique. Ainsi, le TSA-CMF démontrerait bien l'effet initial de cet antibiotique sur la partie sensible de la population. Toutefois, après une incubation plus longue, la faible population résistante réussirait à coloniser entièrement le milieu de culture, expliquant alors les résultats de résistance par les tests conventionnels.

Le taux élevé d'erreurs pour l'oxacilline s'explique premièrement par un nombre plus faible d'analyses ($n = 10$) et deuxièmement, par un facteur soulevé par Johnson et coll. (1995); la prédominance de résistance. Il existe en effet une corrélation ($r^2 = 0.65$, $P < 0.001$) entre la prédominance de souches résistantes et la quantité d'erreurs occasionnées. Cette corrélation peut être observée dans le tableau 11, et elle explique la faible sensibilité spécifique du TSA-CMF avec l'oxacilline (70 % ; 3 erreurs sur 10 tests).

Lorsqu'on tient compte de ces facteurs, la sensibilité générale du TSA-CMF, évaluée à 93,4 % (23 erreurs/346 tests), doit être décortiquée en différentes catégories. Ainsi, la sensibilité du test pour l'analyse des isolats autres que *E. coli*, choisis pour leurs multiples résistances, fut de 88,3 % (9 erreurs/77 tests), alors que celle pour les souches isolées de *E. coli* fut de 100 %. Si on considère la totalité des résultats par le TSA-CMF ($n = 346$), 19 erreurs sur 23 furent causées par les espèces autres que *E. coli*. Considérant

maintenant une application à grande échelle du TSA-CMF en milieu clinique pour l'analyse des isolats urinaires et la présence élevée du *E. coli* (~ 80 %), on peut prévoir un taux de sensibilité de 97,7 %.

Notre analyse de 19 échantillons urinaires par le TSA-CMF donna un taux de corrélation avec les résultats des méthodes conventionnelles de 94,4 % (9 erreurs sur 162 analyses). *E. coli* s'est retrouvé dans 70 % des spécimens. Huit des neuf erreurs furent causées par la nitrofurantoïne et la tétracycline. Par conséquent, si le protocole est appliqué directement sur des échantillons d'urine, on peut alors extrapoler une sensibilité globale de 99,2 % à condition de ne pas intégrer dans nos analyses ces deux antibiotiques. Évidemment, la sélection que nous avons effectuée, comprenant l'élimination des analyses de cultures mixtes et le dépistage des urines qui contiennent une concentration supérieure ou égale à 10^5 bactéries/ml, contribue à obtenir la meilleure sensibilité.

5. Perspectives

L'analyse qualitative et quantitative de la viabilité bactérienne, suite à un traitement antimicrobien, a été démontrée possible grâce à la cytométrie en flux (CMF). Durant les vingt dernières années, deux obstacles majeurs limitaient l'évolution des tests de viabilité bactérienne. Le premier fut le développement d'instruments de précision, permettant des analyses rapides, reproductibles et dont l'utilisation demande un minimum d'entraînement. Le second constituait la conception et la validation d'indicateurs de viabilité «parfaits», des sondes fluorescentes pouvant marquer universellement les bactéries (Pore, 1994 ; Mason et Gant, 1995).

L'utilisation de diodes laser à faible puissance et de la disponibilité d'équipements informatiques de pointe ont été des facteurs importants pour la baisse des coûts de fabrication des cytofluoromètres de table, ce qui a rendu plus accessible ces équipements de haute technologie. Le cytomètre Bryte[®] HS de Bio-Rad (Hemel Hempstead, UK) a été commercialisé spécialement pour l'analyse des bactéries. Il utilise une lampe à arc électrique au Hg-Xe et jouit d'une grande popularité auprès des microbiologistes en

Europe (Durodie et coll., 1995a). Bio-Rad a développé une combinaison de deux fluorochromes, la trousse FAST™ (Flow Antimicrobial Susceptibility Test), équivalent à la trousse *BacLight*, mais ajustée aux propriétés optiques du Bryce HS (Chiu et coll., 1997).

Le deuxième problème, la recherche de sondes fluorescentes efficaces, fiables et universelles, est plus difficile à résoudre que le premier. D'après plusieurs études et nos propres résultats, le DiBAC₄(3) et le PI semblent, du moins pour le moment de bons candidats. La trousse LIVE/DEAD *BacLight* (SYTO 9 et PI), développée spécifiquement par Molecular Probes (Eugene, OR) pour évaluer la viabilité et la mortalité des bactéries, nous a fourni de très bon résultats et ne devrait pas être négligée dans les applications éventuelles du TSA-CMF ou d'autres tests de viabilité, même si son principe de fonctionnement ne se base que sur l'intégrité membranaire.

Les résultats du TSA-CMF développé au cours de ce projet sont encourageants. Le déroulement complet du protocole nécessite environ 5 heures. L'obtention de résultats de sensibilité aux antibiotiques en moins d'une journée aurait non seulement des effets bénéfiques sur la qualité des soins apportés en milieu clinique, mais contribuerait également à des économies substantielles pour l'établissement de santé (Barenfanger et coll., 1999). Plus important encore, le traitement des infections avec les agents antimicrobiens appropriés, rendu possible grâce au délai raisonnable que nécessite une méthode de détection rapide, permettrait de prévenir efficacement l'apparition et la dissémination de souches résistantes (Bergeron et Ouellette, 1998). Évidemment, avant de voir cette technique appliquée en microbiologie clinique, d'autres améliorations sont nécessaires, ainsi que l'analyse de plusieurs combinaisons d'espèces et d'agents antimicrobiens pour raffiner les critères d'interprétations de sensibilité. Les améliorations à étudier dans de futures expériences s'appliquent à plusieurs niveaux. Dans le cas de notre projet, c'est-à-dire l'application sur des isolats et des échantillons urinaires, un premier test de dépistage, permettant de déterminer les cultures positives, est absolument nécessaire afin de diminuer le nombre (conséquemment le temps et le coût) des analyses

à effectuer. Une revue des méthodes rapides pouvant effectuer ce type de dépistage est présentée dans la première partie de cet ouvrage.

Récemment, un cytomètre spécialisé dans l'analyse du contenu cellulaire dans les spécimens d'urine, le Sysmex UF-100 (Sysmex, Long Grove, IL), a été commercialisé. Cependant, cet appareil est un compteur de cellules qui permet uniquement l'analyse des types cellulaires présent dans l'urine, n'ayant pas les capacités d'identifier ou de tester la sensibilité des bactéries présentes (Ben-Ezra et coll., 1998 ; Fenili et Pirovano, 1998 ; Langlois et coll., 1999). Selon les études, cet appareil peut détecter les bactériuries avec une précision de 88 à 98 %. La technologie du UF-100 pourrait être incorporée à l'intérieur d'un système plus complet, permettant l'identification et un test de sensibilité aux antibiotiques.

Molecular Probes a également commercialisé une combinaison de fluorochromes (SYTO 9 + HI), le LIVE *BacLight*[®] Bacterial Gram Stain Kit. Ces fluorochromes permettent une distinction très efficace entre les bactéries Gram + et Gram - (Mason et coll., 1998b). Ce test pourrait être intégré dans une étape antérieure à la détermination de sensibilité des bactéries par CMF, permettant ainsi de réduire le nombre d'antibiotiques à tester. Les techniques d'immunofluorescence (Clarke et Pinder, 1998 ; Pyle et coll., 1995 ; Tyndall et coll., 1985) et d'hybridation *in situ* fluorescente (Wallner et coll., 1993 ; Thomas et coll., 1997 ; Fuchs et coll., 1998) pourraient également être ajoutées, afin d'identifier des microorganismes par cytométrie.

Dans un laboratoire clinique, plusieurs types d'analyses bénéficieraient de l'application de la cytométrie, notamment pour les mycobactéries (Kirk et coll., 1998 ; Moore et coll., 1999), les levures (Ramani et coll., 1997 ; Green et coll., 1994 ; Peyron et coll., 1997), en parasitologie (Humphreys et coll., 1994), en dermatologie (Arrese et coll., 1998), ainsi que pour les cultures de sang et de liquide céphalo-rachidien (Laverdière et Restieri, 1999). Pour diminuer le temps d'analyse occasionné par le passage séquentiel des échantillons dans un cytomètre, un futur système commercial devrait plutôt miser sur l'injection et l'analyse de plusieurs échantillons en parallèle (Shapiro, 1990b).

CONCLUSION

La découverte des antibiotiques a eu un effet extraordinaire sur la médecine, l'industrie pharmaceutique et la microbiologie. Cependant, l'apparition sans cesse grandissante de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques est extrêmement menaçante.

De nouvelles technologies, notamment la cytométrie en flux, permettent la détection rapide des microorganismes et la détermination de leur sensibilité aux agents antimicrobiens. Notre étude a déterminé la faisabilité d'un protocole basé sur la cytofluorométrie en flux pour évaluer les effets des antibiotiques sur des bactéries. L'optimisation du protocole s'est déroulée en vue d'une application éventuelle en milieu clinique, notamment dans les cas d'infections urinaires.

Dans un premier temps, l'efficacité de plusieurs fluorochromes fut évaluée. Après avoir opté pour une combinaison de deux sondes fluorescentes spécifiques pour la mortalité; le bis-(1,3-acide dibutylbarbiturique) triméthine oxonol (DiBAC₄(3)), indiquant la perte de potentiel de membrane, et l'iodure de propidium (PI), indiquant la perte d'intégrité membranaire, le protocole fut optimisé pour être éventuellement appliqué sur des isolats cliniques et des spécimens d'urine, provenant de patients souffrant d'infections des voies urinaires.

La viabilité bactérienne évaluée par ce test fut corrélée avec les comptes d'unités formatrices de colonies. Le protocole fut également validé à l'aide de deux méthodes standards pour la détermination de sensibilité aux antibiotiques, soit l'antibiogramme par disques et la microdilution liquide. Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux (TSA-CMF) démontrèrent globalement une corrélation de 93,4 % avec les méthodes conventionnelles.

La plupart des erreurs observées par le TSA-CMF provenaient de l'analyse d'espèces autres que *E. coli* et par deux agents bactériostatiques, la nitrofurantoïne et la tétracycline.

Le test de sensibilité aux antibiotiques par cytométrie en flux apporte non seulement des informations sur le nombre de cellules d'une façon beaucoup plus précise que les tests de sensibilité conventionnels, mais aussi des informations sur la morphologie des cellules, le contenu cellulaire, l'intégrité membranaire et le potentiel électrique.

La vitesse et la précision de la cytométrie en flux dépassent toutes les technologies actuelles. Il est vraisemblable que la cytométrie ne remplacera pas toutes les méthodes établies de la microbiologie, mais deviendra une technique alternative inestimable.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de maîtrise, Dr Richard Villemur, qui m'a offert sa confiance pour ce projet stimulant et qui m'a donné goût à la recherche scientifique. Le projet s'est déroulé en collaboration avec le Dr Yves St-Pierre, professeur-chercheur au Centre de recherche en santé humaine de l'INRS-Institut Armand-Frappier. L'enthousiasme et la disponibilité des Drs. Villemur et St-Pierre furent sources d'inspiration et d'admiration.

Le succès de ce projet fut tributaire à l'excellente coopération établie avec Michel Laverdière M.D. et Christiane Restieri, du Département de Microbiologie et Infectiologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

J'aimerais également souligner la contribution financière de la Fondation Armand-Frappier et du Ministère de la Santé et des Services Sociaux.

Finalement, merci à tout le monde au laboratoire de Richard Villemur, à tout le personnel technique et administratif, à tous les étudiants et professeurs, qui contribuent à faire de l'INRS-Institut Armand-Frappier, un des joyaux de la recherche scientifique au Canada.

BIBLIOGRAPHIE

- Agace, W., H. Connell, et C. Svanborg. 1996. Host resistance to urinary tract infections. Dans : Urinary tract infections : molecular pathogenesis and clinical management. Ed : Mobley, H.L.T., et J.W. Warren. ASM Press, Washington, D .C . p. 221-243.
- Alexander, M.K., M.S. Khan, et C.S. Dow. 1981. Rapid screening for bacteriuria using a particle counter, pulse-height analyser, and computer. *J. Clin. Pathol.* **34**:194-198.
- Allman, R., R. Manchee, et D. Lloyd. 1993. Flow cytometric analysis of heterogenous bacterial populations. Dans : Flow Cytometry in Microbiology. Ed : Lloyd, D. Springer-Verlag, London. p.27-47.
- Amann, R.I., W. Ludwig, et K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Arao, S., S. Matsuura, M. Nonomura, K. Miki, K. Kabasawa, et H. Nakanishi. 1999. Measurement of urinary lactoferrin as a marker of urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **37**:553-557.
- Arrese, J.E., V. Goffin, M. Avila-Camacho, R. Greimers, et G.E. Pierard. 1998. A pilot study on bacterial viability in acne. Assessment using dual flow cytometry on microbials present in follicular casts and comedones. *Int. J. Dermatol.* **37**:461-464.
- Barenfanger, J., C. Drake, et G. Kacich. 1999. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1415-1418.
- Ben-Ezra, J., L. Bork, et R.A. McPherson. 1998. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin. Chem.* **45**:118-122.
- Bercovier, H., M. Resnick, D. Kornitzer, et L. Levy. 1987. Rapid method for testing drug-susceptibility of *Mycobacteria* spp. and Gram-positive bacteria using rhodamine 123 and fluorescein diacetate. *J. Microbiol. Methods* **7**:139-142.
- Berger, S.A., B. Bogokowsky, et C. Block. 1990. Rapid screening of urine for bacteria and cells by using a catalase reagent. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1066-1067.
- Bergeron, M.G. 1997. Effective treatment of pyelonephritis. *The Canadian Journal of CME.* **June**:57-74.
- Bergeron, M.G., et M. Ouellette. 1998. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2169-2172.

- Boye, E., et H.B. Steen. 1993. The physical and biological basis for flow cytometry of *Escherichia coli*. Dans : Flow Cytometry in Microbiology. Ed : Lloyd, D. Springer-Verlag, London. p.11-25.
- Boye, E., H.B. Steen, et K. Skarstad. 1983. Flow cytometry of bacteria : a promising tool in experimental and clinical microbiology. J. Gen. Microbiol. **129**:973-980.
- Breeuwer, P., J.-L. Drocourt, F.M. Rombouts, et T. Abee. 1994. Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. **60**:1467-1472.
- Brown, D.F.J., et M. Warner. 1981. Impedance and conductivity methods for detecting bacteriuria. Dans : Rapid Methods and Automation in Microbiology. Ed : Tilton, R.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 171-175.
- Cardoso, C.L., C.B. Muraro, V.L. Dias Siqueira, et M. Guilhermetti. 1998. Simplified technique for detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine. J. Clin. Microbiol. **36**:820-823.
- Carter, E.A., F.E. Paul, et P.A. Hunter. 1993. Cytometric evaluation of antifungal agents. Dans : Flow Cytometry in Microbiology. Ed : Lloyd, D. Springer-Verlag, London. p.111-120.
- Chapple, D.S., D.J. Mason, C.L. Joannou, E.W. Odell, V. Gant, et R.W. Evans. 1998. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. Infect. Immun. **66**:2434-2440.
- Chiu, K.-P., D. Davis, R. Dudek, et C. Hixson. 1997. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry using UV and visible wavelength DNA viability dyes. Abstract D-57. Dans : Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 93.
- Clarke, R.G., et A.C. Pinder. 1998. Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. J. Appl. Bacteriol. **84**:577-584.
- Cohen, C.Y., et E. Sahar. 1989. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. J. Clin. Microbiol. **27**:1250-1256.
- Comas, J., et J. Vives-Rego. 1997. Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde, and surfactants on *Escherichia coli* by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes. Cytometry **29**:58-64.

- Comas, J., et J. Vives-Rego. 1998. Enumeration, viability and heterogeneity in *Staphylococcus aureus* by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* **32**:45-53.
- Coulter Corporation. 1993. Reference guide. Coulter Corporation, Hialeah, FL.
- Crissman, H.A., et R.A. Tobey. 1990. Specific staining of DNA with the fluorescent antibiotics mithramycin, chromomycin, and olivomycin. *Methods Cell Biol.* **33**:97-103.
- Davies, J. 1998. The origin of antibiotic resistance genes. Abstract S-95. Dans : Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 631.
- Davies, J. 1999. In praise of antibiotics. *ASM News* **65**:304-310.
- Davies, J., H. Nikaido, et B.G. Spratt. 1994. Resistance to antibiotics. *Science* **264**:375-393.
- Davey, H., et D.B. Kell. 1993. Flow cytometric analysis, using rhodamine 123, of *Micrococcus luteus* at low growth rate in chemostat culture. Dans : *Flow Cytometry in Microbiology*. Ed : Lloyd, D. Springer-Verlag, London. p.83-93.
- Davey, H., et D.B. Kell. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogenous microbial populations : the importance of single cell analyses. *Microbiol. Rev.* **60**:641-696.
- Davey, H., et D.B. Kell. 1997. Fluorescent brighteners : novel stains for the flow cytometric analysis of microorganisms. *Cytometry* **28**:311-315.
- Deere, D., J. Porter, C. Edwards, et R. Pickup. 1995. Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, (DiBAC₄(3)), for the flow cytometric assessment of bacterial viability. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**:165-170.
- Demers, N., J. Cusson, N. Hamel, et M. Poisson. 1997. Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Guide thérapeutique; Utilisation des antimicrobiens. Hôtel-Dieu de Montréal. p. 93-94.
- Diaper, J.P., et C. Edwards. 1994. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:221-228.
- Diaper, J.P., K. Tither, et C. Edwards. 1992. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:268-272.
- Doern, G.V., R. Vautour, M. Gaudet, et B. Levy. 1994. Clinical impact of rapid in vitro testing and bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1757-1762.

- Donnelly, C.W., et G.J. Baigent. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:689-695.
- Donnenberg, M.S., et R.A. Welch. 1996. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. Dans : *Urinary tract infections : molecular pathogenesis and clinical management*. Ed : Mobley, H.L.T., et J.W. Warren. ASM Press, Washington, D .C . p. 135-174.
- Durodie, J., K. Coleman, et I. Simpson. 1995a. The application of flow cytometry to the estimation of bacterial antibiotic susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:443-444.
- Durodie, J., K. Coleman, I.N. Simpson, S.H. Loughborough, et D.W. Winstanley. 1995b. Rapid detection of antimicrobial activity using flow cytometry. *Cytometry* **21**:374-377.
- Eisenstadt, J., et J.A. Washington. 1996. Diagnostic microbiology for bacteria and yeasts causing urinary tract infections. Dans : *Urinary tract infections : molecular pathogenesis and clinical management*. Ed : Mobley, H.L.T., et J.W. Warren. ASM Press, Washington, D .C . p. 29-66.
- Edwards, C., J. Porter, J.R. Saunders, J. Diaper, J.A.W. Morgan, et R.W. Pickup. 1992. Flow cytometry and microbiology. *SGM Quarterly Nov.*:105-108.
- Fenili, D., et B. Pirovano. 1998. The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100). *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**:909-917.
- Fuchs, B.M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig, et R. Amann. 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4973-4982.
- Gant, V.A., G. Warnes, I. Phillips, et G.F. Savidge. 1993. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol.* **39**:147-154.
- Gillenwater, J.Y., et M.M. Clark. 1996. Tentative direct antimicrobial susceptibility testing in urine. *J. Urology* **156**:149-153.
- Gomez Jorge, J.T., C. Estrada, Z.A. Gonzalez, L.A. Morales-Otero, J. Lavergne, et E.A. Santiago-Delpin. 1991. Flow cytometric analysis of urine sediment after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **23**:1764-1765.
- Gorbach, S.L., J. Mensa, et J.M. Gatell. 1997. Pocket book of antimicrobial therapy and prevention (1997). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. 315 p.

- Gottfredsson, M., H. Erlendsdottir, A. Sigfusson, et S. Gudmundsson. 1998. Characteristics and dynamics of bacterial populations during postantibiotic effect determined by flow cytometry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1005-1011.
- Green, L., B. Petersen, L. Steimel, P. Haeber, et W. Current. 1994. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1088-1091.
- Guindulain, T., J. Comas, et J. Vives-Rego. 1997. Use of nucleic acid dyes SYTO-13, TOTO-1, and YOYO-1 in the study of *Escherichia coli* and marine prokaryotic populations by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4608-4611.
- Hancock, R.E.W. 1999. University of British Columbia. Communications personnelles.
- Harington, C. 1957. Opening remarks. Dans : Ciba Foundation Symposium on Drug Resistance in Micro-organisms. Mechanisms of Development. Ed : Wolstenholme, G.E.W., et C.M. O'Connor. J. & A. Churchill, London. 352 p.
- Hattori, N., M.-O. Nakajima, K. O'Hara, et T. Sawai. 1998. Novel antibiotic susceptibility test by the ATP-bioluminescence method using filamentous cell treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1406-1411.
- Haugland, R.P. 1996. Molecular Probes - handbook of fluorescent probes and research chemicals, sixth edition. Molecular Probes, Inc. Eugene, OR.
- Hopkin, K. 1999. The ins and outs of urinary tract infections. Report from ASM 99th General Meeting. Internet http://www.biomednet.com/biomednews/1999/ASM/day4/story_4.html
- Humphreys, M.J., R. Allman, et D. Lloyd. 1994. Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry* **15**:343-348.
- Hutter, K.-J., et H.E. Eipel. 1978. Flow cytometric determination of cellular substances in algae, bacteria, moulds and yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **44**:269-282.
- Hyatt, J.M., et J.J. Schentag. 1998. Flow cytometric evaluation of *P. aeruginosa* exposed to ciprofloxacin and ofloxacin. Abstract E-159. Dans : Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 214.
- Hyodo, T., K. Kumano, M. Haga, T. Sakai, M. Fukuda, Y. Isami, et T. Okada. 1997. Analysis of urinary red blood cells of healthy individuals by an automated urinary flow cytometer. *Nephron* **75**:451-457.
- Isenberg, H.D. 1981. Clinical significance of automation in microbiology. Dans : Rapid Methods and Automation in Microbiology. Ed : Tilton, R.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 96-97.

- Jepras, R.I., J. Carter, S.C. Pearson, F.E. Paul, et M.J. Wilkinson. 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2696-2701.
- Jepras, R.I., F.E. Paul, S.C. Pearson et M.J. Wilkinson. 1997. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2001-2005.
- Jernaes, M., et H.B. Steen. 1994. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry : influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry* **17**:302-309.
- Johnson, I.D. 1996a. Introduction to fluorescence techniques. Dans : *Molecular Probes - handbook of fluorescent probes and research chemicals*, sixth edition. Ed : Haugland, R.P. Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. p. 1-6.
- Johnson, J.R. 1996b. Treatment and prevention of urinary tract infections. Dans : *Urinary tract infections : molecular pathogenesis and clinical management*. Ed : Mobley, H.L.T., et J.W. Warren. ASM Press, Washington, D.C . p. 95-118.
- Johnson, J.R., F.S. Tiu, et W.E. Stamm. 1995. Direct antimicrobial susceptibility testing for acute urinary tract infections in women. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2316-2323.
- Kaprelyants, A.S., et D.B. Kell. 1992. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **72**:410-422.
- Kelly, D.J., K.F. Salata, D. Strickman, et J.N. Hershey. 1995. *Rickettsia tsutsugamushi* infection in cell culture : antibiotic susceptibility determined by flow cytometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**:602-606.
- Kelly, M.T., J.M. Latimer, et L.C. Balfour. 1982. Comparison of three automated systems for antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **15**:902-905.
- Kirk, S.M., S.M. Callister, L.C.L. Lim, et R.F. Schell. 1997. Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* **35**:358-363.
- Kirk, S.M., R.F. Schell, A.V. Moore, S.M. Callister, et G.H. Mazurek. 1998. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid and rifampin in 24 hours. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1568-1573.
- Koneman, E. W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, et W.C. Winn Jr. 1997. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Fifth edition. Lippincott, Philadelphia, PA. 1395 p.

- Koontz, F. 1981. Rapid identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae*. Dans : Rapid Methods and Automation in Microbiology. Ed : Tilton, R.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 103-105.
- Langlois, M.R., J.R. Delanghe, S.R. Steyaert, K.C. Everaert, et M.L. De Buyzere. 1999. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. Clin. Chem. **45**:118-122.
- Langsrud, S., et G. Sundheim. 1996. Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. J. Appl. Bacteriol. **81**:411-418.
- Laverdière, M., et C. Restieri. 1999. Département de Microbiologie et d'Infectiologie : Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Montréal, QC. Communications personnelles.
- Lebaron, P., N. Parthuisot, et P. Catala. 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1725-1730.
- Lebaron, P., M. Troussellier, et P. Got. 1994. Accuracy of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers. J. Microbiol. Methods **19**:89-94.
- Lei, Y., S. Satake, J. Ishii, et T. Nakae. 1991. Factors that influence the permeability assay of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. **64**:337-340.
- Le Neel, T., M. Cazaubiel, E. Espaze, C. Merle, et A. Truchaud. 1996. Image analysis in the clinical laboratory : application of filtration cytometry to bacteriological screening of urine samples. Clin. Biochem. **29**:171-173.
- Levy, S.B. 1998. Multi-drug resistance : a sign of the times. N. Engl. J. Med. **338**:1376-1378.
- Lewis, K., D.C. Hooper, et M. Ouellette. 1997. Multidrug resistance pumps provide broad defense. ASM News **63**:605-610.
- Liao, R.S., R.P. Rennie, et J.A. Talbot. 1999. Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:1034-1041.
- Lindmo, T., et H.B. Steen. 1979. Characteristics of a simple, high resolution flow cytometer based on a new flow configuration. Biophys. J. **28**:33-44.

- Liu, Y.F., L.C. Lim, K. Schell, S.D. Lovrich, S.M. Callister, et R.F. Schell. 1994. Differentiation of borreliacidal activity caused by immune serum or antimicrobial agents by flow cytometry. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **1**:145-149.
- Lopez-Amoros, R., J. Comas, et J. Vives-Rego. 1995. Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2521-2526.
- Lopez-Amoros, R., S. Castel, J. Comas-Riu, et J. Vives-Rego. 1997. Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC₄(3), propidium iodide, and CTC. *Cytometry.* **29**:298-305.
- Marie, D., D. Vaultot, et F. Partensky. 1996. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1 and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1649-1655.
- Mason, D.J. 1998a. Rapid analysis of bacteria using flow cytometry. International Scientific Communications. Technical articles. Internet: <http://www.isc-uk.demon.co.uk/aprwbior.html>
- Mason, D.J., R. Allman, et D. Lloyd. 1993a. Uses of membrane potential sensitive dyes with bacteria. Dans : *Flow Cytometry in Microbiology*. Ed : Lloyd, D. Springer-Verlag, London. p.67-81.
- Mason, D.J., R. Allman, J.M. Stark, et D. Lloyd. 1994. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* **176**:8-16.
- Mason, D.J., R. Dybowski, J.W. Larrick, et V.A. Gant. 1997a. Antibacterial action of rabbit leukocyte CAP18₁₀₆₋₁₃₇. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:624-629.
- Mason, D.J., et V.A. Gant. 1995. The application of flow cytometry to the estimation of bacterial antibiotic susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:441-443.
- Mason, D.J., R. Lopez-Amoros, R. Allman, J.M. Stark, et D. Lloyd. 1995a. The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:309-315.
- Mason, D.J., et D. Lloyd. 1997b. Acridine orange as an indicator of bacterial susceptibility to gentamicin. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**:119-204.
- Mason, D.J., E.G.M. Power, H. Talsania, I. Phillips et V.A. Gant. 1995b. Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2752-2758.

- Mason, D.J., S. Shanmuganathan, F.C. Mortimer, et V. Gant. 1998b. A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescent microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2681-2685.
- Matsen, J.M. 1981. Rapid reporting of results – impact on patient, physician, and laboratory. Dans : *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Ed : Tilton, R.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 98-102.
- McFeters, G.A., F.P. Yu, B.H. Pyle, et P.S. Stewart. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Methods* **21**:1-13.
- Molecular Probes. 1999. Bacteria stains. Gallery. Molecular Probes, Inc. Internet : <http://www.probes.com/servlets/gallery?id=17>
- Monnet, D.L. 1999. European recommendations to respond to the threat of antimicrobial-resistant microorganisms. *ASM News* **65**:390-391.
- Moore, A.V., S.M. Kirk, S.M. Callister, G.H. Mazurek, et R.F. Schell. 1999. Safe determination of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antimycobacterial agents by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* **37**:479-483.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational supplement. M100-S9 (regroupant les documents M2-A6 et M7-A4). National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Villanova, PA.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). 1991. Urinary tract infection in adults. National Institutes of Health (NIH) Publication no. 91-2097. Internet <http://www.niddk.nih.gov/health/urolog/pubs/utiadult/utiadult.htm#causes>
- Nebe-von Caron, G., P. Stephens, et R.A. Badley. 1998. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J. Appl. Microbiol.* **84**:988-998.
- Nexmann Jacobsen, C., J. Rasmussen, et M. Jakobsen. 1997. Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods* **28**:35-43.
- Novo, D., N.G. Perlmutter, R.H. Hunt et H.M. Shapiro. 1999. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a radiometric technique. *Cytometry* **35**:55-63.
- Oakes, A.R., R. Badger, et D.I. Grove. 1994. Comparison of direct and standardized testing of infected urine for antimicrobial susceptibilities by disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* **32**:40-45.

- Obernesser, M.S., S.S. Socransky, et P. Stashenko. 1990. Limit of resolution of flow cytometry for the detection of selected bacterial species. *J. Dent. Res.* **69**:1592-1598.
- Ocaktan, A., H. Yoneyama, et T. Nakae. 1997. Use of fluorescent probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **272**:21964-21969.
- Ordenez, J.V., et N.M. Wehman. 1993. Rapid flow cytometric antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* **14**:811-818.
- Patton, J.P., D.B. Nash, et E. Abrutyn. 1991. Urinary tract infection : economic considerations. *Med. Clin. North Am.* **75**:495-513.
- Peyron, F., A. Favel, H. Guiraud-Dauriac, M. El Mzibri, C. Chastin, G. Dumenil, et P. Regli. 1997. Evaluation of a flow cytofluorometric method for rapid determination of amphotericin B susceptibility of yeast isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1537-1540.
- Pezzlo, M.T., V. Ige, A.P. Woolard, E.M. Peterson, et L.M. de la Maza. 1989. Rapid bioluminescence method for bacteriuria screening. *J. Clin. Microbiol.* **27**:716-720.
- Phillips, A.P., et K.L. Martin. 1988. Limitations of flow cytometry for the specific detection of bacteria in mixed populations. *J. Immunol. Methods* **106**:109-117.
- Phillips, A.P., K.L. Martin, et A.J. Capey. 1987. Direct and indirect immunofluorescence analysis of bacterial populations by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **101**:219-228.
- Pinder, A.C., P.W. Purdy, S.A.G. Poulter, et D.C. Clark. 1990. Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentrations in pure cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:92-100.
- Pore, R.S. 1994. Antimicrobial susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**:613-627.
- Pore, R., et J. Thomas. 1998. Rapid characterization of bacteria by new, multi-parameter flow cytometry. Abstract C-171. Dans : Abstracts of ASM 98th General Meeting. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 159.
- Porter, J., J. Diaper, C. Edwards, et R.W. Pickup. 1995a. Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2783-2786.

- Porter, J., C. Edwards, J.A. Morgan et R.W. Pickup. 1993. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3327-3333.
- Porter, J., C. Edwards, et R.W. Pickup. 1995b. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J. Appl. Bacteriol.* **79**:399-408.
- Porter, J., R.W. Pickup, et C. Edwards. 1995c. Membrane hyperpolarisation by valinomycin and its limitations for bacterial viability assessment using rhodamine 123 and flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:259-262.
- Power, D.A., et P.J. McCuen. 1988. Manual of BBL® products and laboratory procedures; Sixth edition. Becton Dickinson Microbiology Systems. Cockeysville, Maryland. pp. 48-49; 67-74; 205-207.
- Pyle, B.H., S.C. Broadaway, et G.A. McFeters. 1995. A rapid, direct method for enumerating respiring enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2614-2619.
- Quintiliani Jr., R., et P. Courvalin. 1995. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. Dans : Manual of clinical microbiology, 6th edition. Ed : Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Tenover, F.C. Tenover, et R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. p. 1308-1326.
- Ramani, R., A. Ramani, et S.J. Wong. 1997. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2320-2324.
- Randall, E. 1981. First day results - what is feasible ? Dans : Rapid Methods and Automation in Microbiology. Ed : Tilton, R.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 112-117.
- Reddy, V.N. 1999. Urinary tract (kidney and bladder) infections. Dr. Reddy's Pediatric Office on the Web. Internet : <http://www.drreddy.com/uti.html>
- Rodriguez, G.G., D. Phipps, K. Ishiguro, et H.F. Ridgway. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1801-1808.
- Roth, B.L., M. Poot, S.T. Yue, et P.J. Millard. 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2421-2431.
- Santé Canada. 1997. Contrôle de la résistance aux antimicrobiens : Plan d'action intégré pour la population canadienne. Direction générale de la protection de la santé, Laboratoire de Lutte Contre la Maladie et la Société canadienne des maladies infectieuses. Internet : http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/bid/nosocom/fact1_f.html

- Schaule, G., H.-C. Flemming, et H.F. Ridgway. 1993. Use of 5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3850-3857.
- Schifman, R.B., M. Wieden, J. Brooker, M. Chery, M. Delduca, K. Norgard, C. Palen, N. Reis, J. Swanson, et J. White. 1984. Bacteria screening by direct bioluminescence assay of ATP. *J. Clin. Microbiol.* **20**:644-648.
- Scholefield, J., R. Manson, R.J. Johnston, R. Scott, et M. Spinell. 1981. Bacteriuria screening by use of automated fluorescence microscopy. Dans : *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Ed : Tilton, R.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 179-183.
- Shapiro, H.M. 1985. *Practical flow cytometry*. Alan R. Liss, New York.
- Shapiro, H.M. 1990a. Cell membrane potential analysis. *Methods Cell Biol.* **33**:25-35.
- Shapiro, H.M. 1990b. Flow cytometry in laboratory microbiology : new directions. *ASM News* **56**:584-588.
- Sheppard, F.C., Mason, D.J., S.F. Bloomfield, et V.A. Gant. 1997. Flow cytometric analysis of chlorhexidine action. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**:283-288.
- Shlaes, D.M., D.N. Gerding, J.F. John Jr., W.A. Craig, D.L. Bornstein, R.A. Duncan, M.R. Eckman, W.E. Farrer, W.H. Greene, V. Lorian, S. Levy, J.E. McGowan Jr., S.M. Paul, J. Ruskin, F.C. Tenover, et C. Watanakunakorn. 1997. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance : guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin. Infect. Dis.* **25**:584-599.
- Smaill, F.M., H. Richardson, J. Gun-Munro, P. Lyn, C. Gittens, P. Drummond, V. Tirilis, et M.C. Orvidas. 1998. Screening for bacteriuria in the emergency room and the microbiology laboratory using the Clintek 50™/Bayer 8SG Dipstick. Abstract C-162. Dans : *Abstracts of ASM 98th General Meeting*. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 158.
- Smibert, R.M., et N.R. Krieg. 1994. Chapter 25 Phenotypic characterization. Dans : *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Ed : Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, et N.R. Krieg. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 648-649.
- Smither, R. 1977. Rapid screening for significant bacteriuria using a Coulter Counter. *J. Clin. Pathol.* **30**:1158-1162.

- Soren, L., M. Nilsson, et L.E. Nilsson. 1995. Quantification of antibiotic effects on bacteria by bioluminescence, viable counting and quantal analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:669-674.
- Steen, H.B., et E. Boye. 1980a. Bacterial growth studied by flow cytometry. *Cytometry* **1**:32-36.
- Steen, H.B., et E. Boye. 1980b. *Escherichia coli* growth studied by dual-parameter flow cytophotometry. *J. Bacteriol.* **145**:1091-1094.
- Steen, H.B., E. Boye, K. Skarstad, B. Bloom, T. Godal, et S. Mustafa. 1982. Applications of flow cytometry on bacteria : cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry* **2**:249-257.
- Steen, H.B., K. Skarstad, et E. Boye. 1986. Flow cytometry of bacteria : cell cycle kinetics and effects of antibiotics. Dans : *Clinical cytometry : Annals of the NY Acad. Sci.* **468**. Ed : Andreeff, M. New York Academy of Science, New York. p. 329-338.
- Steen, H.B., K. Skarstad, et E. Boye. 1990. DNA measurements of bacteria. *Methods Cell Biol.* **33**:519-526.
- Steward, C.D., S.A. Stocker, J.A. Swenson, C.M. O'Hara, J.R. Edwards, R.P. Gaynes, J.E. McGowan Jr., et F.C. Tenover. 1999. Comparison of agar dilution, disk diffusion, MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:544-547.
- Suller, M.T.E., et D. Lloyd. 1998. Flow cytometric assessment of the postantibiotic effect of methicillin on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1195-1199.
- Suller, M.T.E., et D. Lloyd. 1999. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced damage using flow cytometry. *Cytometry* **35**:235-241.
- Swarts, A.J., J.W. Hastings, R.F. Roberts, et A. von Holy. 1998. Flow cytometry demonstrates bacteriocin-induced injury to *Listeria monocytogenes*. *Curr. Microbiol.* **36**:266-270.
- Tenover, F.C. 1995. The best of times, the worst of times. The global challenge of antimicrobial resistance. *Pharm. World Sci.* **17**:149-151.
- Tenover, F.C., et J.M. Hughes. 1996. The challenges of emerging infectious diseases : development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA* **275**:300-304.

- Tenover, F.C., et J.E. McGowan Jr. 1996. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am. J. Med. Sci.* **311**:9-16.
- Thomas, J.-C., M. Desrosiers, Y. St-Pierre, P. Lirette, J.-G. Bisailon, R. Beaudet, et R. Villemur. 1997. Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA-targeted fluorescent probes and ethidium bromide. *Cytometry* **27**:224-232.
- Tyndall, R.L., R.E. Hand Jr., R.C. Mann, C. Evans, et R. Jernigan. 1985. Application of flow cytometry to detection and characterization of *Legionella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:852-857.
- Valenstein, P., et F. Meier. 1998. Urine culture contamination : a College of American Pathologists Q-Probe study of contaminated urine cultures in 906 institutions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **122**:123-129.
- Valdez, L.M., H. Dang, P.C. Okhuysen, et C.L. Chappell. 1997. Flow cytometric detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool samples. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2013-2017.
- Van der Waaij, L.A., G. Mesander, P.C. Limburg, et D. Van der Waaij. 1994. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry* **16**:270-279.
- Van Dilla, M.A., R.G. Langlois, D. Pinkel, D. Yajko, et W.K. Hadley. 1983. Bacterial characterization by flow cytometry. *Science* **220**:620-621.
- Vaneechoutte, M., et J. Van Eldere. 1997. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J. Med. Microbiol.* **46**:188-194.
- Vern Juchau, S., et W.F. Nauschuetz. 1984. Evaluation of a leukocyte esterase and nitrite test strip for detection of bacteriuria. *Curr. Microbiol.* **11**:119-122.
- Virta, M., S. Lineri, P. Kankaanpaa, M. Karp, K. Peltonen, J. Nuutila, et E.-M. Lilius. 1998. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:515-519.
- Walberg, M., P. Gaustad, et H.B. Steen. 1996. Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:1063-1075.
- Walberg, M., P. Gaustad, et H.B. Steen. 1997a. Rapid assessment of ceftazidime, ciprofloxacin, and gentamicin susceptibility in exponentially-growing *E. coli* cells by means of flow cytometry. *Cytometry* **27**:169-178.

- Walberg, M., P. Gaustad, et H.B. Steen. 1997b. Rapid discrimination of bacterial species with different ampicillin susceptibility levels by means of flow cytometry. *Cytometry* **29**:267-272.
- Walberg, M., P. Gaustad, et H.B. Steen. 1999. Uptake kinetics of nucleic acid targeting dyes in *S. aureus*, *E. faecalis* and *B. cereus* : a flow cytometric study. *J. Microbiol. Methods* **35**:167-176.
- Wallner, G., R. Amann, et W. Beisker. 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**:136-143.
- Wallner, G., B. Fuchs, S. Spring, W. Beisker, et R. Amann. 1997. Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4223-4231.
- Walsh, S., H.M. Lappin-Scott, H. Stockdale, et B.N. Herbert. 1995. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes. *J. Microbiol. Methods* **24**:1-9.
- Warren, J.W. 1996. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. Dans : *Urinary tract infections : molecular pathogenesis and clinical management*. Ed : Mobley, H.L.T., et J.W. Warren. ASM Press, Washington, D .C . p. 3-27.
- Watson, S.P., M.O. Clements, et S.J. Foster. 1998. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **180**:1750-1758.
- Wenisch, C., K.F. Linnau, B. Parschalk, K. Zedtwitz-Liebenstein, et A. Georgopoulos. 1997. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. *J. Clin. Microbiol.* **35**:5-10.
- Wheat, P.F., J.G.M. Hastings, et R.C. Spencer. 1988. Rapid antibiotic susceptibility tests on *Enterobacteriaceæ* by ATP bioluminescence. *J. Med. Microbiol.* **25**:95-99.
- Wickens, H.J., R.J. Pinney, D.J. Mason, et V.A. Gant. 1998. Flow cytometric examination of *Escherichia coli* during PAE of ciprofloxacin. Abstract A-111. Dans : *Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 34.
- Woods, G.L., et J.A. Washington. 1995. Antibacterial susceptibility tests : Dilution and disk diffusion methods. Dans : *Manual of clinical microbiology*, 6th edition. Ed : Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Tenover, et R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. p. 1327-1341.
- Yasui, Y., N. Tatsumi, K. Park, et T. Koezuka. 1995. Urinary sediment analysed by flow cytometry. *Cytometry* **22**:75-79.

Yao, J.D., et R.C. Moellering Jr. 1995. Antibacterial agents. Dans : Manual of clinical microbiology, 6th edition. Ed : Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, et R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. p. 1281-1307.

Yu, F.P., et G.A. McFeters. 1994. Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. *J. Microbiol. Methods* **20**:1-10.