

## RESEARCH ARTICLE

### EFFET DE L'ACTION DE DEUX ANTIBIOTIQUES EN PRESENCE DU GLUCOSE-6-PHOSPHATE SUR DEUX SOUCHES DE ESCHERICHIA COLI

<sup>1</sup>\*ANGAMAN Djédoux Maxime, <sup>1</sup>ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan, <sup>1</sup>OKOU Obou Constantin and <sup>2</sup>DJAMAN Allico Joseph

<sup>1</sup>UFR Agroforesterie, Filière Biochimie-Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>UFR-Biosciences, Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, Université Félix Houphouët-Boigny Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Accepted 14<sup>th</sup> October, 2017; Published Online 30<sup>th</sup> November, 2017

#### ABSTRACT

Since the advent of antibiotics, pathogenic microorganisms have constantly developed mechanisms to escape the lethal action of these inhibitors. Some of these microorganisms have the methylerythritolphosphate (MEP) pathway, a metabolic pathway for isoprenoid biosynthesis, essential for their survival but absent in humans. In this study, we evaluated the behavior of two commercial strains of *Escherichia coli* (JM109 and MG1655) during their growth phase in the presence of two inhibitors, fosfomycin (FFM) and fosmidomycin (FSM). *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with kanamycin (25 µg/ml) and ampicillin (100 µg/ml). The optical density at 600 nm of each bacterial culture was determined before and after addition of FFM (100 µM) and FSM (100 µM) in presence or not of glucose-6-phosphate (70 µM). Statistical tests were conducted to further explain the effect of inhibitors. The minimum inhibitory concentration of the two antibiotics on the two strains is 20 µM. In LB medium, the response time to growth inhibition of *E. coli* JM109 and *E. coli* MG1655 induced by FSM is greater than that of FFM. At advanced stages of bacterial growth, FFM inhibited bacterial growth, which is not the case with FSM. From a general point of view, there is no significant difference between the action of the two antibiotics ( $p > 0.05$ ).

**Key words:** Antibiotics, *Escherichia coli* JM109 and MG1655, Fosfomycin, Fosmidomycin, Inhibition.

#### INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, l'Homme est confronté aux problèmes liés aux microorganismes qui sont capables de créer des maladies graves voire mortelles (Alyssa *et al.*, 2013). Cette situation alarmante a emmené les scientifiques à trouver une solution. C'est ainsi qu'au XX<sup>e</sup> siècle les antibiotiques furent découverts. Et depuis lors, leur nombre a augmenté de manière fulgurante grâce aux nouvelles méthodes de recherche et aux industries pharmaceutiques qui ont procédé à leur synthèse. Ils ont suscité un grand espoir dans le monde de l'infectiologie et la fin des maladies infectieuses était annoncée. Mais, le monde bactérien a su s'adapter à l'utilisation souvent excessive et quelquefois irraisonnée des antibiotiques, phénomène décrit par «pression de sélection des antibiotiques». L'apparition de bactéries multi-résistantes, entraînant des échecs thérapeutiques, menace d'inefficacité les antibiotiques, d'autant plus que l'industrie pharmaceutique peine à commercialiser de nouvelles classes d'antibiotiques.

Cette situation rend difficile la prise en charge des personnes atteintes de maladies infectieuses (Eddayab, 2012). Les phénomènes de résistance aux antibiotiques ont pris une ampleur considérable dans les pays en voie de développement (Goossens *et al.*, 2006 ; Acar et Davies, 2009). De même, une étude réalisée en Côte d'Ivoire entre 1998 et 2001 par le réseau de surveillance des résistances microbiennes a montré que de nombreuses bactéries telles que *Escherichia coli* (*E. coli*) ont développé une multirésistance aux antibiotiques (Perrier-Gros-Claude, 2013). Par ailleurs, *Mycobacterium ulcerans*, agent pathogène de l'ulcère de Buruli, est responsable de nombreux dommages en Côte d'Ivoire (Institut Pasteur, 2009). Aussi, plusieurs souches de *Plasmodium* ont perdu leur sensibilité aux molécules antipaludiques récentes comme l'artémisinine et ses dérivés (Pradines *et al.*, 2010). Les maladies diarrhéiques quant à elles constituent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique dans les pays en développement. Des chiffres permettent de réaliser l'étendue du problème. Quatre cent (400) millions de cas par jour dans le monde, 20 % de décès d'enfants de 0 à 4 ans liés à la diarrhée dans certains pays, 22 pour 1000 enfants de moins de 1 an meurent de diarrhée avec 14 à 16 épisodes par an et par enfant (Dosso *et al.*, 1998). La plupart de ces agents pathogènes utilisent divers mécanismes pour contourner l'efficacité de ces médicaments (action sur la paroi et le cytoplasme).

\*Corresponding author: ANGAMAN Djédoux Maxime,

<sup>1</sup>UFR Agroforesterie, Filière Biochimie-Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire.

La résistance survient suite à l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antibiotique, la surexpression de la cible, la diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne et la mise en place ou la multiplication de systèmes d'efflux (Levy et Marshall, 2004 ; Singh et Barrett, 2006 ; Guinoiseau, 2010). La fosfomycine (FFM) et la fosmidomycine (FSM) sont deux antibiotiques qui dérivent de l'acide fosfonique mais possèdent différents modes d'action dans la cellule bactérienne. La fosfomycine produite par les bactéries du genre *Streptomyces* (*Streptomyces fradiae*) ou par *Pseudomonas syringae*, agit en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Sa cible est l'enzyme UDP-N-acétylglucosamine-énolpyruvate transférase (pyruvyl transférase) formant l'UDP-N-acétylmuramique à partir l'UDP-N-acétylglucosamine, l'une des premières étapes de la formation du peptidoglycane (Kahan *et al.*, 1974). La FFM inhibe la biosynthèse des isoprénoides bactériens (Shigi, 1989). Sa cible est l'enzyme 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase (Kuzuyama *et al.*, 1998 ; Zeidler *et al.*, 1998), qui catalyse la formation de 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) à partir de 1-désoxy-D-xylulose-5-P (DXP). Par conséquent, la FSM est un inhibiteur de la voie du méthylérythritolphosphate (MEP) pour synthétiser leurs composants vitaux (les isoprénoides). Cette voie du MEP essentielle pour la survie de la plupart des microorganismes pathogènes ou non (*Bacillus subtilis*) et absente chez l'Homme, serait une cible efficace pour le développement de nouveaux agents anti-infectieux (Wiemer *et al.*, 2010 ; Davey *et al.*, 2011).

Cet antibiotique montre une efficacité relative contre le parasite du paludisme (Jomaa *et al.*, 1999 ; Rodriguez-concepción, 2004). Aussi une étude préalable a-t-elle montré que certaines souches d'*Escherichia coli* résistent mieux à la fosfomycine (antibiotique) sur milieu gélosé que sur milieu liquide. Ainsi, la détermination de la sensibilité/résistance des souches d'*E. coli* sur milieu liquide en présence de la fosfomycine et de la fosmidomycine s'avère importante. Elle permettrait de savoir si ces deux inhibiteurs utilisent le même transporteur pour leur incorporation dans la cellule bactérienne de *Escherichia coli*. L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'action de deux inhibiteurs (fosfomycine et fosmidomycine) en absence et en présence de glucose-6-phosphate sur deux souches d'*Escherichia coli* (JM109 et MG1655) durant leur phase de croissance en milieu liquide.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées sont des souches commerciales d'*Escherichia coli*

- La première souche est *Escherichia coli* JM109 avec les caractéristiques suivantes : Génotype e14<sup>-</sup> (McrA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (R<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 Δ (lac-proAB, F'<sup>+</sup>[traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15] (Stratagene). les cellules JM109 contiennent le gène lacI<sup>q</sup>ZΔM15 dans l'épissome F', ce qui permet le dosage de X-Gal et les plasmides recombinants produisant une meilleure quantité de répresseur lac (produit du gène lacI).
- La deuxième souche est *Escherichia coli* MG1655 : Génotype F, λ<sup>-</sup>, ilvG<sup>-</sup>, rfb-50 RPH-1.

## MÉTHODES

### Test de résistance/sensibilité d'*E. coli* aux antibiotiques

L'étude de l'effet des deux antibiotiques (fosfomycine et fosmidomycine) sur la croissance des deux souches commerciales d'*E. coli* a été réalisée sur le milieu Luria-Bertani (LB) liquide. En plus de l'ampicilline (100 ug/ml) et de la kanamycine (25 ug/ml), ces deux antibiotiques ont été additionnés dans le milieu à des concentrations différentes (tableau V). Le milieu a été préalablement autoclavé à 121 °C pour une durée de 15 minutes.

### Effet du glucose-6-phosphate sur la sensibilité des souches en présence des deux antibiotiques

Le supplément, D-glucose-6-phosphate (Fluka) à une concentration finale de 0,07 mM a été ajouté au milieu LB liquide contenant séparément les deux antibiotiques. Le milieu LB a été préalablement stérilisé à 121 °C pendant 15 minutes.

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est l'un des paramètres utilisés pour l'évaluation de l'activité d'un antibiotique. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24 h. C'est donc la plus faible concentration d'une gamme de double dilution d'antibiotique qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible (Burnichon et Texier, 2003). Cette méthode a été effectuée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la fosmidomycine et de la fosfomycine sur les souches *E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655 dans le milieu LB liquide.

### La détermination de la CMI s'est faite en deux étapes

Dans un premier temps, une colonie jeune de 18 à 24 h de chaque souche bactérienne a été introduite dans 10 ml de bouillon LB stérile puis incubée pendant 3 h à 37 °C et à 180 rpm. De plus, un volume de 0,1 ml de cette pré-culture a été introduit à nouveau dans 10 ml de bouillon LB stérile. Cette opération a été effectuée deux fois pour la suite des tests (Toty *et al.*, 2013). Ensuite, une série de double dilution de chaque antibiotique à tester a été réalisée dans 13 tubes à hémolyse afin d'obtenir un volume final de 1 ml dans chaque tube à partir d'une solution mère de 0,1 M. Un volume de 1 ml des cultures préalablement préparées a été additionné à 1 ml des différentes gammes de concentrations puis incubés pendant 24 h. Par contre, un tube à hémolyse n'a pas reçu d'antibiotique mais plutôt un volume de 1 ml de milieu LB (témoin de croissance). Enfin, après ce temps d'incubation, la CMI a été déterminée à l'œil nu et à la lumière du jour.

### Culture des microorganismes et détermination des densités optiques

Les germes ont été ensemencés sur le milieu de pré-culture pendant 24 h à 37 °C. D'abord, une colonie de la souche *E. coli* JM109 ou MG1655 a été ensemencée dans 2 ml de milieu LB et incubée à 37 °C sous agitation (180 rpm) pendant 24 h. Ensuite, 250 µl de la pré-culture ont été introduits dans six tubes contenant chacun 25 ml de LB puis incubés à 37 °C sous agitation (180 rpm).

Parmi les six tubes utilisés, un a servi de témoin de contrôle de croissance et les cinq autres ont été utilisés pour les tests expérimentaux. Cependant, les tubes témoins n'ont pas reçu d'antibiotiques alors que les autres ont reçu les différentes gammes de concentrations. Pour chaque souche étudiée, les tests ont été réalisés en deux lots dont l'un a été réalisé avec la fosfomycine et l'autre avec la fosmidomycine. A des intervalles de 1 h après le début de la culture, les tubes du premier lot (250 µl de la pré-culture + 25 ml de LB) ont reçu chacun 25 µl de fosfomycine à 100 µM. De même, les tubes du second lot ont reçu eux aussi 25 µl de fosmidomycine (100 µM) dans les mêmes conditions que précédemment. L'ajout des antibiotiques s'est fait dans les intervalles de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h après la culture bactérienne pour chaque lot d'antibiotiques et cela après la constitution des différents lots. Chaque souche (*E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655) avait deux lots et l'expérience s'est déroulée 3 fois pour avoir une moyenne des densités optiques. Le même procédé a été appliqué en présence du glucose-6-phosphate dans le milieu LB liquide. La mesure des densités optiques (DO) s'est faite avant et après chaque ajout d'antibiotiques. Elle s'est faite à l'aide d'un spectrophotomètre à 600 nm. Le spectrophotomètre a été calibré avec 1 ml de milieu de culture. Enfin, 1 ml de chaque échantillon a permis de mesurer toutes les DO.

### Analyses statistiques des données

Les données obtenues et saisies dans le tableur du logiciel Microsoft Excel (version 2010) ont été analysées en utilisant des tests statistiques adéquats avec le logiciel R (version 3.2.2., 2016). Le test *t* de student a été utilisé pour comprendre les interactions entre les souches et les antibiotiques et pour étudier l'efficacité de chaque antibiotique. Pour cela, nous avons calculé la moyenne générale des densités optiques de tous les stades de culture en présence de chaque antibiotique. Ce même calcul a été effectué pour le témoin. Tous ces calculs et analyses des résultats ont pris en compte les deux grandes parties de l'expérimentation c'est-à-dire l'ajout ou non du glucose-6-phosphate. La différence est considérée comme statistiquement significative pour une valeur de *p* inférieure à 0,05. Ainsi, nous avons constitué des tableaux (pour savoir si l'antibiotique inhibe ou pas la croissance de la souche), des histogrammes (pour savoir lequel des antibiotiques est plus efficace que l'autre sur chaque souche) et des diagrammes des moyennes (dans le but de savoir laquelle des souches est plus sensible à un antibiotique donné).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la fosfomycine et de la fosmidomycine

Après cette incubation de 24 h à 37 °C et une observation à l'œil nu, à la lumière du jour, nous avons constaté une absence de turbidité à partir de 3,9 µg/ml pour la FFM et 4,3 µg/ml pour la FSM. Et cela pour chaque souche étudiée (Tableau 1).

### Action des antibiotiques en l'absence du Glucose-6-phosphate (G6P)

En absence du Glucose-6-phosphate, les résultats obtenus révèlent des différences entre la moyenne de la densité optique de chaque souche et celle du témoin (Tableau II). Dans le cas de l'ajout de la FFM, la DO moyenne de JM109 est de 0,395 (± 0,030) contre 0,829 (± 0,081) pour le témoin avec *p* = 0,083.

**Tableau I . Concentration minimale inhibitrice de la fosfomycine et de la fosmidomycine**

N° tube	Concentration FFM (µg/ml)	Concentration FSM (µg/ml)	Croissance bactérienne
Témoin	0	0	++++
1	0,06	0,06	+++
2	0,12	0,13	+++
3	0,24	0,27	++
4	0,48	0,54	++
5	0,97	1,08	++
6	1,95	2,16	+
7	3,9	4,32	-
8	7,81	8,65	-
9	15,62	17,3	-
10	31,25	34,6	-
11	62,5	69,21	-
12	125	138,42	-
13	250	276,85	-

Cette différence non significative se remarque aussi avec l'ajout de la FSM où la moyenne est de 0,664 (± 0,057) contre 0,909 (± 0,087) pour le témoin avec *p* = 0,081. Dans tous les cas, les DO sont inférieures aux DO des témoins et il n'y a pas de variation significative entre les DO car *p* > 0,05. Au niveau de la souche MG1655 (Tableau III), les DO en présence des antibiotiques dans le milieu sont inférieures également à celles des témoins. Mais dans le cas de l'ajout de la FFM la valeur de *p* (0,039) est faible par rapport aux autres valeurs obtenues. Il y a donc une différence significative dans ce cas de figure (*p* = 0,039 < 0,05).

Par ailleurs, la figure 1 met en exergue les effets de la fosfomycine et de la fosmidomycine sur les deux souches étudiées. La DO moyenne de la souche JM109 en présence de la FFM est plus élevée qu'en présence de la FSM (0,664 contre 0,395). Par contre chez la souche MG1655 les valeurs des DO sont approximativement identiques ; 0,735 en présence de FFM et 0,723 en présence de FSM. Aussi nous constatons que, d'un point de vue général (en considérant tous les stades de culture), les deux antibiotiques ne diffèrent pas l'un de l'autre en terme d'efficacité sur chaque souche (*p* = 0,2944 > 0,05 pour *E. coli* JM109 et *p* = 0,958 > 0,05 pour *E. coli* MG1655).

### Action des antibiotiques en présence du Glucose-6-phosphate (G6P)

En présence du glucose-6-phosphate, les résultats obtenus révèlent des différences entre la moyenne de la densité optique de chaque souche et celle du témoin (Tableau IV). Dans le cas de l'ajout de la FFM, la DO moyenne de JM109 est de 0,277 (± 0,189) contre 1,109 (± 0,0894) pour le témoin avec *p* = 0,013 < 0,05. Cette différence significative se remarque aussi avec l'ajout de la FSM où la moyenne est de 0,252 (± 0,018) contre 1,109 (± 0,089) pour le témoin avec *p* = 0,01297 < 0,05. Dans tous les cas, les DO sont inférieures aux DO des témoins. Les deux valeurs de *p* sont très faibles ; cela n'avait pas été constaté avec le milieu non supplémenté en glucose-6-phosphate. Au niveau de la souche MG1655 (tableau XI), les DO en présence des antibiotiques dans les milieux sont inférieures également à celles des témoins. En outre, dans le cas de l'ajout de la FFM et de la FSM les valeurs de *p* sont également faibles ; 0,0192 avec la FFM et 0,037 en présence de la FSM. Nous notons également une différence statistiquement significative entre les DO des témoins et celles des souches en présence d'antibiotiques.

**Tableau 2. Analyse comparative de la DO du témoin avec celle d'E. coli JM109 en présence de la FFM ou de la FSM**

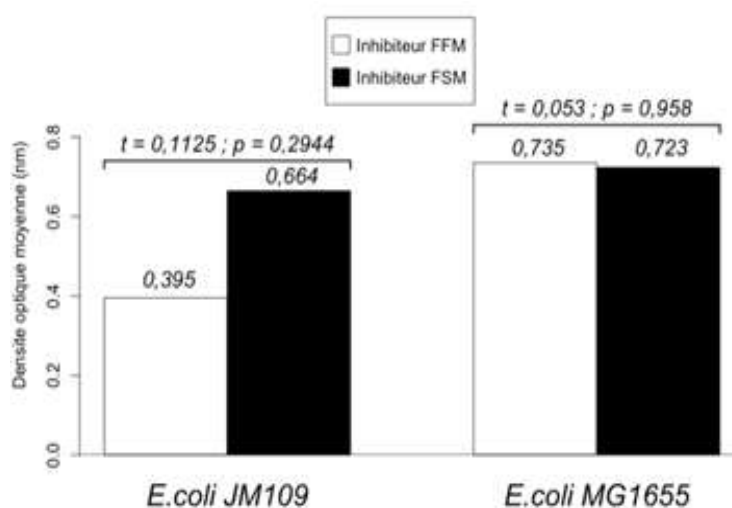
	Souche JM109				Souche JM109			
	FFM	Te	t	p	FSM	Te	t	p
DO moy	0,395	0,829	2,08	0,083	0,664	0,909	2,09	0,081
Sd	0,030	0,081			0,057	0,087		
Effectif	7	7			7	7		

FFM: Fosfomycine; FSM: Fosmidomycine; Te: Témoin; t: Valeur du test de student; p: P-value  
DO moy: Densité Optique moyenne; Sd: Ecart-type

**Tableau 3. Analyse comparative de la DO du témoin avec celle d'E. coli MG1655 en présence de la FFM et de la FSM**

	Souche MG1655				Souche MG1655			
	FFM	Te	t	p	FSM	Te	t	p
DO moyenne	0,735	1,341	2,618	0,039	0,723	1,086	2,249	0,059
Sd	0,042	0,099			0,050	0,087		
Effectif	7	7			8	8		

FFM: Fosfomycine; FSM: Fosmidomycine; Te: Témoin; t: Valeur du test de student; p: P-value  
DO moy: Densité Optique moyenne; Sd: Ecart-type

**Figure 1. Analyse comparative de l'efficacité des deux antibiotiques sur chaque souche en absence de Glucose-6-phosphate****Tableau 4. Analyse comparative de la DO du témoin avec celle d'E. coli JM109 en présence de la FFM ou de la FSM**

	Souche JM109				Souche JM109			
	FFM	Te	t	p	FSM	Te	t	p
DO moyen	0,277	1,109	3,28	0,013	0,252	1,109	3,18	0,01297
Sd	0,0189	0,0894			0,018	0,089		
Effectif	8	8			9	9		

FFM: Fosfomycine; FSM: Fosmidomycine; Te: Témoin; t: Valeur du test de student; p: P-value;  
DO moy: Densité Optique moyenne; Sd: Ecart-type

**Tableau 5. Analyse comparative de la DO du témoin avec celle d'E. coli MG1655 en présence de la FFM et de la FSM**

	Souche MG1655				Souche MG1655			
	FFM	Te	t	p	FSM	Te	t	p
DO moyen	0,69	1,31	3,02	0,0192	0,760	1,026	2,58	0,037
Sd	0,38	0,93			0,58	0,86		
Effectif	8	8			8	8		

FFM: Fosfomycine; FSM: Fosmidomycine; Te: Témoin; t: Valeur du test de student; p: P-value;  
DO moy: Densité Optique moyenne; Sd: Ecart-type

Par ailleurs, la figure 2 met en exergue les actions de la fosfomycine et de la fosmidomycine sur les deux souches étudiées. Les DO moyennes de la souche JM109 en présence de la FFM ou de la FSM sont proches (0,277 et 0,252).

Par contre cette proximité des DO ne s'observe pas chez la souche MG1655 (0,690 est la valeur de la DO en présence de FFM et 0,760 en présence de FSM). Les diagrammes des moyennes (figures 3 et 4) évoquent l'action de chaque antibiotique sur les deux souches.

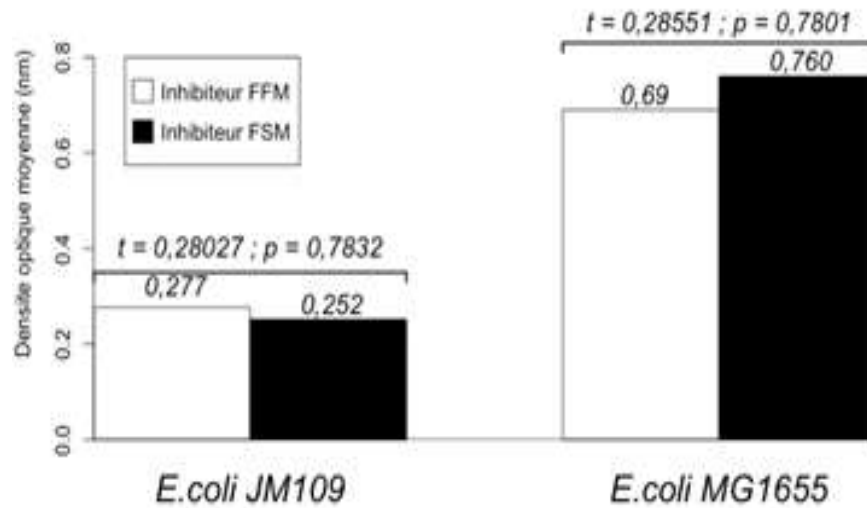


Figure 2. Analyse comparative de l'efficacité des deux antibiotiques sur chaque souche en présence de Glucose-6-phosphate

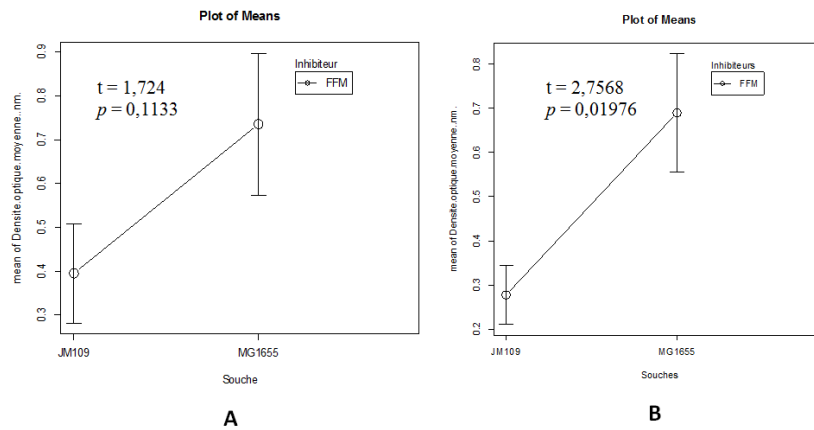


Figure 3. Effet de la FFM sur JM109 et MG1655 en absence (A) et en présence (B) de G6P

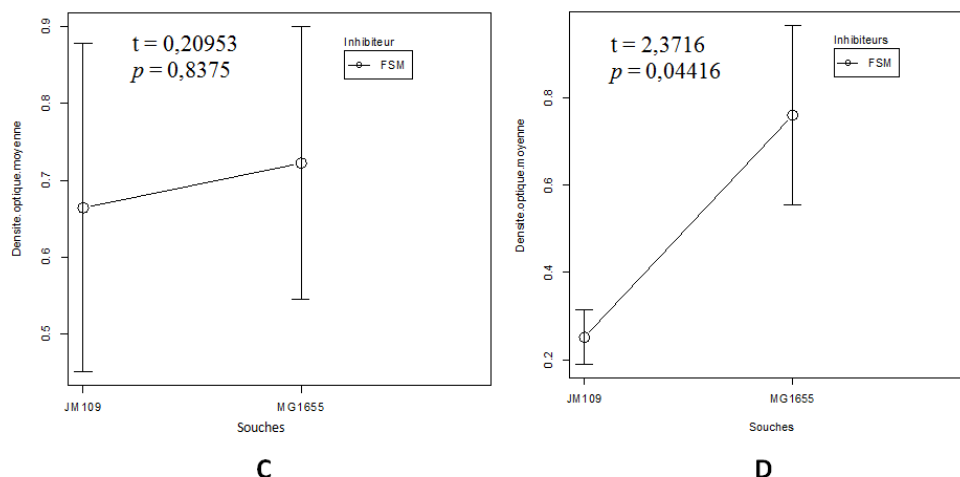


Figure 4. Effet de la FSM sur JM109 et MG1655 en absence (C) et en présence (D) de G6P

En absence de glucose-6-phosphate, il est important de signaler qu'il n'y a aucune variation significative entre les densités optiques des souches quel que soit l'antibiotique utilisé. Par contre, il faut noter une différence significative entre les moyennes des densités optiques des deux bactéries lorsque la FFM ou la FSM a été ajoutée au milieu de culture en présence de G6P. Cette différence se révèle par les valeurs de  $p = 0,01976 < 0,05$  et  $p = 0,044 < 0,05$ .

## DISCUSSION

Le G6P induit le transporteur des hexoses phosphates, qui est également le transporteur des deux antibiotiques dans la cellule. Par conséquent, en présence de G6P dans le milieu, il se produirait une meilleure entrée d'antibiotique dans la cellule et donc une plus grande inhibition se produirait de façon croissante.

A cet effet, le même protocole a été respecté mais en ajoutant au milieu du glucose-6-phosphate à une concentration de 0,07 mM. Les figures 9 ; 10 ; 11 et 12 représentent les résultats obtenus avec les souches *E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655 en présence de la FFM et de la FSM. Les résultats des figures 11 et 12 montrent un comportement similaire à celui décrit ci-dessus avec l'action de la FSM. Les résultats révèlent des stades croissants d'inhibition mais pas dans les étapes ultérieures. Au niveau de la souche *E. coli* JM109, la FSM en présence du G6P produit un effet considérable d'inhibition uniquement sur les trois premières heures ( $DO \leq 0,26$ ). A l'inverse, la FFM inhibe rapidement les souches même celles qui sont en phase avancée. La présence du G6P, potentialiserait l'effet de la FFM, pour entraîner une lyse plus rapide qu'en l'absence de G6P. Par conséquent, la réaction des cultures face à l'action de la FSM est la même, ce qui laisse à penser qu'il existerait un autre transporteur de la fosmidomycine. Cette hypothèse va dans le même sens que les études menées par Bouraoui (2012) qui a montré que le transport et la phosphorylation du glucose sont assurés par les systèmes PTS (systèmes phosphotransférases). Ces derniers résultats excluent l'hypothèse selon laquelle l'insensibilité à la FSM présentée par les cultures dans les stades avancés de la croissance serait due à l'entrée moins efficace de cet inhibiteur dans la cellule via le transporteur du glycérol-3-phosphate.

Les différences significatives entre les densités optiques des souches et celles des témoins dans les milieux supplémentés en glucose-6-phosphate indiqueraient que les deux antibiotiques inhibent la voie du MEP par des mécanismes distincts. La sensibilité significative de la JM109 en présence des deux inhibiteurs et du glucose-6-phosphate pourrait être due à la constitution de son génome et à l'effet inducteur (présence de transporteur) du glucose-6-phosphate. En outre, il n'y a pas de différence significative entre les deux antibiotiques en termes d'action inhibitrice car les analyses faites n'ont pas considéré uniquement les stades avancés de l'expérimentation mais plutôt tous les stades.

## Conclusion

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la FSM et de la FFM pour les souches *E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655 dans le milieu LB correspondent respectivement à 4,3 µg/ml (20 µM) et 3,9 µg/ml (20 µM). Dans le milieu LB, le temps de réponse à l'inhibition de la croissance des souches *E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655 induit par la FSM est supérieure à celui de la FFM. Dans le cas de la souche *E. coli* JM109, il se produit un arrêt dans la croissance des cellules, la densité cellulaire est restée stable dans la culture pendant plusieurs heures. Pour *E. coli* MG1655, il se produit des lyses cellulaires ; bien que dans certains cas, il y a eu arrêt de la croissance sans lyse cellulaire lorsque le milieu a été complété avec le G6P. La fosfomycine a entraîné plusieurs lyses cellulaires aussi bien chez *E. coli* JM109, que chez *E. coli* MG1655 dans les différentes manipulations. La sensibilité à la FSM d'*E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655 dans le milieu LB (supplémenté ou non de G6P) dépend de la phase de la culture à laquelle l'antibiotique est ajouté. La FSM inhibe la croissance des cellules lorsqu'elle est ajoutée dans les premiers stades de la croissance des cultures, mais elle est inefficace lorsqu'elle est ajoutée à un stade intermédiaire ou avancé de la croissance des cultures. D'un point de vue général, il n'y a pas de différence significative entre l'activité des deux antibiotiques sur les souches. La résistance à la FSM que présentent les

souches *E. coli* JM109 et *E. coli* MG1655 à des stades avancés de la croissance des cultures ne serait pas due à une incapacité de l'antibiotique à se fixer au transporteur du glycérol-3-phosphate. Par contre, la FFM pénètre dans la cellule par le même transporteur et inhibe efficacement la croissance à tous les stades de culture.

## REFERENCES

- Acar J. and Davies J. E., 2009. Antibiotic resistance : an ecological perspective to an old problem. *American Society for Microbiology*, 24(3): 413-433.
- Alyssa E. B., Lee S., Senn N., Nale J., Kiniboro B., Siba P. M., Mueller I. and Reeder J.C., 2013. High Levels of Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Populations in Papua New Guinea despite Variable Infection Prevalence American. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4): 718-725.
- Bouraoui H., 2012. Régulation de MtlR, activateur transcriptionnel de l'opéron mtl de *Bacillus subtilis*, par le domaine EIIB du transporteur du mannitol. Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud XI Ecole Doctorale «Gènes, Génomes, Cellules» Spécialité : Microbiologie et Génétique Moléculaire, 143 p.
- Burnichon N. and Texier A., 2003. L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques. DES bactériologie – Exposé Semestre été 2003, 29 p.
- Davey M. S., Tyrrell J. M., Howe R. A., Walsh T. R., Moser B., Tolesa M. A. and Eberl M., 2011. A promising target for treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Antimicrobial Agents a Chemotherapy*, 55(7): 3635-3640.
- Dosso M., Coulibaly M. and Kadio A., 1998. Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. Manuscrit n°PF02. Journée en hommage au Professeur A. DODIN, 4 p.
- Eddayab Y., 2012. Détection des bactéries multirésistantes au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges. Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie. Université de Limoges faculté de pharmacie, 121 p.
- Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker L. J., Cars O. and Davey P. G., 2006. National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62(5): 373-379.
- Guinoiseau E., 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat en Biochimie - Biologie moléculaire à l'université de Corse, 143 p.
- Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 2009. Rapport scientifique, 102 p.
- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., Soldati D. and Beck E., 1999. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285: 1573-1576.
- Kahan F. M., Kahan J. S., Cassidy P. J. and Kropp H., 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann NY Acad Sci.*, 235(0): 364-86.
- Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S. and Seto, H., 1998. Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1- Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Non mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Lett*, 39(43): 7913-7916.

- Levy S.B. and Marshall B., 2004. Antibacterial resistance worldwide : causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12): 122-129.
- Perrier-Gros-Claude J. D., 2013. Etude de la sensibilité d'*Escherichia coli* isolées des infections urinaires communautaires. Réseau de surveillance des résistances microbiennes dans la zone de solidarité prioritaire, <http://www.pasteur-international.org>. Consulté le 17 Mars 2017.
- Pradines B., Dormoi J., Briolant S., Bogreau H. and Rogier C., 2010. La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 422: 51-62.
- Rodriguez-concepción M., 2004. The MEP pathway : A new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 10(19): 2391-2400.
- Shigi Y., 1989. Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J Antimicrob Chemother*, 24(2): 131-145.
- Singh S. B. and Barrett J. F., 2006. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochem Pharmacol*, 71(7): 1006-15.
- Toty A. A., Guessennd N., Bahi C., Kra A. M., Otokore D. A. et Dosso M., 2013. Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 82: 12 – 21.
- Wiemer A. J., Hsiao C. H. and Wiemer D. F., 2010. Isoprenoid metabolism as a therapeutic target in Gram-negative pathogens. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(18): 1858-1871.
- Zeidler, J. G., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H. and Lichtenthaler, H. K., 1998. Inhibition of the nonmevalonate 1-deoxy-D-xylulose- 5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin, *Z. Naturforsch.* 53: 980-986.

\*\*\*\*\*