

Université de Montréal

**Effets des fluorures sur l'activité antimicrobienne des antibiotiques contre
Staphylococcus aureus et *Pseudomonas aeruginosa***

Par

Mansour Riazi

Programme des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc)
en Sciences biomédicales

Décembre 2011

© Mansour Riazi, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**« Effets des fluorures sur l'activité antimicrobienne des antibiotiques contre
Staphylococcus aureus et *Pseudomonas aeruginosa* »**

Présenté par :

Mansour Riazi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Édouard Kouassi, président-rapporteur

Dr. Madeleine Ravaoarino, directrice de recherche

Dr. George Szatmari, membre du jury

RÉSUMÉ

L'émergence des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant, qui se répand à travers le monde. *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries pathogènes opportunistes multi résistantes qui peuvent causer plusieurs maladies. Cependant, ces bactéries deviennent difficiles à traiter avec des antibiotiques sans occasionner de toxicité. Alors pour trouver des solutions, c'est nécessaire de développer de nouvelles molécules afin de combattre les agents pathogènes résistants. Grâce à leur action pharmacologique, les fluorures exercent un certain effet antibactérien au niveau de l'émail des dents; donc, leur association aux antibiotiques pourrait bien améliorer l'activité antimicrobienne. De ce fait, nous nous sommes proposés d'étudier les activités in vitro de la vancomycine (VAN), l'oxacilline (OXA), la ceftazidime (CFT) et la méropénème (MER) libre ou associée au fluorure de sodium (NaF) et fluorure de lithium (LiF) qui ont été évaluées sur des souches *S.aureus* et *P.aeruginosa* sensibles et résistantes, par la méthode de la microdilution en bouillon, déterminant leur concentration minimale inhibitrice (CMI), leur concentration minimale bactéricide (CMB), leur courbe cinétique (Time-Kill). Leur cytotoxicité sur les globules rouges humains, et leur stabilité à la température de 4°C et 22°C ont été étudiées. Les associations des antimicrobiens aux dérivés des fluorures ont montré une amélioration de l'effet des antibiotiques par la réduction de leurs concentrations et toxicité pour traiter correctement ces pathogènes résistants. Par conséquent, des antibiotiques associés aux dérivés de fluorure pourraient devenir une option de traitement contre des souches résistantes afin de diminuer la toxicité causée par de fortes doses des antibiotiques conventionnels.

MOTS-CLÉS : *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; Antibiotiques; Résistance; Dérivés de fluorure; CMI; CMB; Time-Kill; Cytotoxicité; Stabilité.

SUMMARY

The emergence of bacterial strains resistant to antibiotics is a worrying phenomenon, which has spread worldwide. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are multi-resistant opportunistic pathogenic bacteria that can cause many diseases. However, they have become difficult to treat with antibiotics without causing toxicity to humans. It is therefore necessary to develop new molecules against resistant pathogens to combat this problem. Due to their pharmacological action, fluorides have an antibacterial effect on tooth enamel which suggests that their combination with antibiotics could improve antimicrobial activity. Thus, we proposed to study in vitro activities of vancomycin (VAN), oxacillin (OXA), ceftazidime (CFT) and meropenem (MER) alone or combined with sodium fluoride (NaF) and lithium fluoride (LiF) that were evaluated against resistant and susceptible strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa* by antimicrobial susceptibility testing, in determining their minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and kinetics (Time-Kill). The evaluation of cytotoxicity on human red blood cells, and determination of stability at two different temperatures (4°C, 22°C) were also performed. Associations of antibiotics with fluoride derivatives showed an improvement by increasing the effect of antibiotics with minimal levels necessary to achieve the same result by reducing their toxicity and to properly kill these resistant pathogens. Therefore, antibiotics associated with fluoride derivatives could become a treatment option against resistant strains and at the same time reduce the toxicity caused by high doses of conventional antibiotics.

KEY WORDS:

Staphylococcus aureus; *Pseudomonas aeruginosa*; Antibiotics; Resistance; Fluoride derivatives; MIC; MBC; Time-Kill; Cytotoxicity; Stability.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DES MEMBRES DE JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
DÉDICACE.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv

PREMIÈRE PARTIE :

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
1.1 INTRODUCTION.....	5
1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE.....	6
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3 FACTEURS DE VIRULENCE ET PATHOGÉNICITÉ	8
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.4 IMPORTANCE MÉDICALE.....	10
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10

1.5 MÉCANISMES DE RÉSISTANCE.....	12
1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.6 MULTIPLES TRAITEMENTS ASSOCIÉS AUX ANTIBIOTIQUES.....	17
1.7 FLUORURE.....	17
1.7.1 Métabolisme du fluorure.....	17
1.7.2 Fonction métabolique.....	18
1.7.3 Physiologie.....	18
1.7.4 Toxicité du fluorure.....	19
1.7.4.1 Toxicité aiguë.....	19
1.7.4.2 Toxicité chronique.....	19
1.7.5 Activité antimicrobienne de fluorure	20
1.8 CONCLUSION.....	21
1.9 RÉFÉRENCES.....	22

DEUXIÈME PARTIE :

MATÉRIELS, METHODES ET RÉSULTATS.....	34
--	-----------

ARTICLE:

CHARACTERIZATION OF ACTIVITY OF FLUORIDE DERIVATIVES ASSOCIATED TO ANTIBIOTICS ON <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> AND <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.....	35
--	-----------

2.1 ABSTRACT.....	37
2.2 INTRODUCTION.....	38
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	39
2.3.1 Bacterial strains and culture.....	39
2.3.2 Antibiotics.....	39
2.3.3 Fluoride derivatives.....	40
2.3.4 Testing for bacterial susceptibility to antibiotics.....	40

2.3.4.1	Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics.....	40
2.3.4.2	Determination of minimum bactericidal concentrations (MBC) of antibiotics.....	41
2.3.5	Kinetic method (Time-Kill).....	42
2.3.6	Method of assessing the cytotoxicity of antibiotics.....	42
2.3.6.1	Hemolysis test.....	42
2.3.7	Method for determination of stability of antibiotics.....	43
2.4	RESULTS.....	44
2.4.1	Effect of fluoride derivatives on the MIC and MBC of antibiotics against strains.....	44
2.4.2	Determining the stability of the combination of antibiotics with fluoride derivatives at different temperatures.....	45
2.4.3	Cytotoxicity of antibiotics associated with fluoride derivatives in human Blood.....	45
2.4.4	Determining the Time-Kill curves.....	46
2.5	DISCUSSION.....	47
2.6	ACKNOWLEDGEMENT.....	50
2.7	REFERENCES.....	51
2.8	TABLES.....	55
2.9	FIGURES.....	57
	TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	63

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	64
3.1 DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	65
3.2 PERSPECTIVES.....	67
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....	68

LISTE DES TABLEAUX**PREMIÈRE PARTIE**

Tableau 1. Principales caractéristiques des β -lactamases.....15

Tableau 2. Selected pathogens, resistance phenotypes and underlying mechanisms.....16

DEUXIÈME PARTIE:

Table I. In vitro bacteriostatic (MIC) and bactericidal (MBC) activities of antibiotics free and combined with lithium fluoride and sodium fluoride (2 mg/L) against *S.aureus* ATCC29213, *S.aureus* 143545-2, *P. aeruginosa* ATCC27853 and *P.aeruginosa* 109530.1.....55

Table II. Influence of storage time at 4°C and 22°C on the activity of antibiotics free and associated with fluoride derivatives determined by their MIC against *P.aeruginosa* ATCC27583 and *S. aureus* ATCC29213.....56

LISTE DES FIGURES

DEUXIÈME PARTIE:

Fig 1. Hemolysis percentage of human blood by free VAN or OXA and combined with LiF(2mg/L).....	57
Fig 2. Hemolysis percentage of human blood by free CFT and MER combined with LiF (2mg/L).....	58
Fig 3. Bactericidal activity of CFT alone at concentrations of 1 x, 2x, 8x MIC against <i>P. a.</i> ATCC27853.....	59
Fig 4. Bactericidal activity of CFT combined with LiF (2mg /L) at concentrations of 1x,2x, 8x MIC against <i>P. a.</i> ATCC2785.....	59
Fig 5. Bactericidal activity of MER alone at concentrations of 0.25x, 1x, 2x MIC against <i>P. a.</i> ATCC27853.....	60
Fig 6. Bactericidal activity of MER combined with the LiF (2 mg/L) at concentrations of 0.25x, 1x, 2x MIC against <i>P. a.</i> ATCC27853.....	60
Fig 7. Bactericidal activity of VAN alone at concentrations of 0.5x, 2x, 4x MIC against <i>S. a.</i> ATCC29213.....	61
Fig 8. Bactericidal activity of VAN combined with LiF (2 mg/L) at concentrations of 0.5x, 2x, 4x MIC against <i>S. a.</i> ATCC29213.....	61
Fig 9. Bactericidal activity of VAN alone at concentrations of 1x, 4x, 8x MIC against <i>S. a.</i> 143545-2.....	62
Fig 10. Bactericidal activity of VAN combined with LiF (2 mg / L) at concentrations of 1x, 4x, 8x MIC against <i>S. a.</i> 143545-2.....	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AmF	Fluorure d'Amine
ATCC	"American Type Culture Collection"
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CFT	Ceftazidime
CFU	"Colony forming units"
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
FK	Fibrose kystique
GR	Globule rouge
g	Gramme
h	Heure
IVU	infections des voies urinaires
L	Litre
LiF	Fluorure de Lithium
MER	Méropenème
mg	Milligramme
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
NaF	Fluorure de Sodium
NCCLS	"National Committee for Clinical Laboratory Standards"

OXA	Oxacilline
P.a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PLP	protéines liant les pénicillines
ppm	parties par million
RMP	Revolutions par minute
S.a	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
TSB	"Trypticase soy Broth", Bouillon trypticase de soya
USI	unités de soins intensifs
VAN	Vancomycine
VIH/SIDA	virus de l'immunodéficience humaine/syndrome d'immunodéficience acquise
B-lactamase	bêta-lactamase
µg	microgramme
µL	microlitre
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage

DÉDICACE

À mon épouse Gina pour sa patience et à mon garçon Adrian.

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Madeleine Ravaoarino ma directrice de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour ses conseils judicieux et précieux, sa grande patience, sa sagesse, sa compréhension et ses nombreux encouragements.

En second, je remercie les membres du département de microbiologie infectiologie du CHUM, Hôtel-Dieu de Montréal, Québec, Canada, pour leur accueil et leur gentillesse.

Mes remerciements vont aussi à mon ami à qui j'ai assailli des questions: Anouar Hafiane

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous les personnels du centre de documentation du CHUM et du service informatique du CHUM, pour leur soutien.

Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude à mes frères et ma sœur et mes parents qui m'ont encouragés dans mes efforts.

Merci pour vos encouragements, et soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

PREMIÈRE PARTIE :
INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Staphylococcus aureus (*S.a*) une bactérie Gram positif, et *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*), une bactérie Gram négatif, responsables de nombreuses infections durant les deux dernières décennies sont devenues un problème clinique sérieux aux professionnels de la santé. La vancomycine (VAN) est le médicament de choix pour traiter les infections par *S.a* depuis plus de 30 ans, cependant ces dernières années, la résistance a été développée. L'oxacilline (OXA) reste active contre ces souches, mais des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires (présents hors de l'hôpital), ont développé une résistance croisée aux pénicillines M (méthicilline, oxacilline). La ceftazidime (CFT) une céphalosporine de 3^{ème} génération reste encore efficace sur de nombreuses souches de *P.a*. La méropénème (MER) une carbapénème anti-pseudomonale s'est avérée utile dans le traitement des maladies graves à Gram négatif. De plus utilisée en monothérapie, elle ne les élimine pas. Plusieurs études relatives à ces deux infections ont rapporté des taux élevés de résistance de *P.a* et *S.a* contre VAN, OXA, CFT et MER respectivement (Dumitrescu O. et al 2010, Saiman, 2007, Werner et al., 2008, Slama T.G., 2008). Par conséquent, il devient important de développer de nouvelles thérapies alternatives. Par ailleurs des chercheurs ont démontré que des fluorures associés aux antibiotiques ont amplifié leur activité.

Notre hypothèse formule que l'association de fluorure respectivement aux VAN, OXA, CFT, et MER pourrait augmenter leurs activités. Notre objectif consiste à développer de différentes formulations actives de la VAN, OXA, CFT, et MER capables d'éliminer respectivement *S.a* et *P.a*.

Nous avons réussi à les mettre en évidence par la détermination de leur activité inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB), et de la cinétique (Time-Kill) respectivement sur des souches sensibles et résistantes de *S.a* et *P.a* selon la méthode décrite par CLSI (2007) et avec l'évaluation de la cytotoxicité de VAN, OXA, CFT, et de la MER seules ou associées au fluorure de sodium (NaF) ou de fluorure de lithium (LiF) par l'hémolyse des GR humains. La détermination de la stabilité de la combinaison des antibiotiques au fluorure a été faite à la température de 22°C et 4°C. Les données générées par la présente étude permettront d'identifier une nouvelle formulation des antibiotiques-

fluorures qui démontreront une activité accrue sur les souches de *S.a* et *P.a* multi résistantes. La nouvelle formulation de VAN, OXA, CFT, et MER pourrait combattre la résistance microbienne constituer une thérapie plus efficace pour éradiquer les infections croissantes à *P.a* et *S.a* .

Ce mémoire comporte trois parties:

La première partie présente: Une revue de littérature dans laquelle nous aborderons une brève présentation et discussion au point de vue de l'épidémiologie, de la pathogénicité, de l'importance médicale, et des mécanismes de résistance des souches *S.aureus* et *P.aeruginosa* et ensuite, des multiples traitements associés aux antibiotiques précisément des dérivés de fluorure. La deuxième partie sous forme d'un article, présentera les résultats des différentes méthodes utilisées. Enfin, une discussion générale qui est incluse dans la troisième partie.

1.1 INTRODUCTION

Les maladies infectieuses sont la seconde principale cause de décès dans le monde et le troisième du décès dans les pays développés. Les multirésistantes bactéries Gram-négatives et Gram-positives vont continuer à croître en importance dans des hôpitaux et dans des communautés avec de fortes proportions des patients vulnérables et d'utilisations de quantités excessives d'antibiotiques [71]. Nous devons donc utiliser des outils à notre disposition pour réduire la propagation de la résistance. *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont le plus grand nombre de moyens pour développer une résistance aux antibiotiques.

La raison la plus commune pour un traitement empirique inefficace est la résistance aux agents utilisés. Les bactéries Gram-négatives et Gram-positives deviennent de plus en plus résistantes aux nombreux antibiotiques couramment utilisés. La diversité des mécanismes de résistance chez des organismes multirésistants rend le développement efficace de nouveaux agents antimicrobiens très difficile, surtout contre les espèces problématiques telles que *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ce problème a de plus en plus besoin d'un développement de nouveaux agents actifs contre les agents pathogènes multirésistants [80].

Il y a intérêt à rechercher des méthodes qui rendraient les antibiotiques plus efficaces afin de combattre ces bactéries. Des recherches ont démontré que l'administration de suppléments de fluorures sous forme de dentifrice, de rince-bouche, de gel et de vernis est un excellent moyen de prévention et réduction des caries dentaires [57,56]. Il est reconnu que les fluorures ont un effet antibactérien. De ce fait, il serait possible que leur combinaison à des antibiotiques améliore leur activité antibactérienne.

Cette revue propose de discuter l'épidémiologie, la pathogénicité et l'importance médicale des souches de *S.aureus* et *P.aeruginosa* ainsi que leurs mécanismes de résistance enfin de mettre en évidence de diverses propriétés du fluorure associé à un antibiotique devenu comme un antimicrobien plus actif.

1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE

1.2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une bactérie pathogène à Gram positif, la plus répandue dans les milieux hospitaliers [1]. La proportion des bactéries Gram-positif est encore plus élevée (75-80%) chez des patients avec une bactériémie [51]. Des infections à *S. aureus* sont de plus en plus signalées dans le monde. Actuellement, des bactéries à Gram positif sont responsables d'environ 50% des infections microbiologiques chez des patients atteints du cancer [2,100]. Près de 400.000 hospitalisations dues aux infections à *S. aureus* ont été signalées chaque année aux États-Unis, selon les statistiques de 2003 [2]. Entre autres, les complications médicales chez ces patients infectés sont devenues plus complexes en raison du système médical sophistiqué; par conséquent, le traitement de ces infections est devenu plus difficile. L'infection à *S. aureus* impose également un fardeau croissant aux ressources des soins de santé, ainsi que l'augmentation de la morbidité et la mortalité [2]. Dans la dernière décennie, les *staphylocoques* sont de nouveau apparus comme les bactéries prédominantes causant des infections dans milieu hospitalier [3].

Le rôle des *staphylocoques* à coagulase négative dans les infections liées au cathéter, aux infections des prothèses articulaires et aux stimulateurs cardiaques (pacemaker) des endocardites est bien établi. Par exemple, le taux d'infection de cathéters intra vasculaires a été estimé à 3-5% au Royaume-Uni. Dans une étude européenne dans les unités de soins intensifs, des staphylocoques à coagulase négative ont été trouvés comme premier germe isolé des hémocultures (19,4%). Dans l'ensemble, cela représentait 10,5% des infections (quatrième cause la plus fréquente de l'infection). De plus, ces bactéries causent 8% des cas d'endocardites dues à l'infection des valves naturelles qui ne sont pas associées à la consommation de drogues, avec un taux de mortalité de 25%. Ce dernier est semblable à celui dû à *S. aureus* [4].

S. aureus résistant à la méthicilline (SARM) est devenu très répandu dans plusieurs pays à travers le monde, avec un taux qui dépasse souvent 40-50% de toutes les autres formes isolées à partir de *S. aureus* [1]. Aux États-Unis, les infections au SARM ont été estimées environ 19 000 de décès par année à l'hôpital, un chiffre comparable à celui des décès annuels causés par le VIH/SIDA, l'hépatite virale et la tuberculose [2]. Le SARM présente plus de 60% parmi toutes les formes isolées de *S. aureus* aux Etats-Unis dans

les unités de soins intensifs des hôpitaux [2].

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie Gram négatif aérobie, une cause importante des infections acquises dans la communauté. Aussi, elle est une cause fréquente des infections nosocomiales, ce qui représente 11 à 13,8% de toutes les infections nosocomiales [22]. Dans les unités de soins intensifs, *P. aeruginosa* est généralement responsable d'un pourcentage très élevé d'infections nosocomiales, qui varient de 13.2 à 22.6% [23]. Dans la grande série de l'hôpital à l'échelle des infections du site opératoire, *P. aeruginosa* a été considéré comme responsable d'environ 6% de tous les cas. Parmi les infections du site opératoire qui touchent des patients en réanimation et signalés au réseau national de surveillance du système, parmi les infections nosocomiales de 1986 à 2003, 9,5% sont causées par *P. aeruginosa* [24]. *P. aeruginosa* a été signalé responsable d'environ 16% des infections du site opératoire et a été la cause la plus commune des infections du site opératoire après la chirurgie gastro-intestinale [25]. *P. aeruginosa* est une cause fréquente d'infections urinaires nosocomiales, soit environ 9% dans les hôpitaux et jusqu'à 16,3% chez les patients de réanimation [26]. *P. aeruginosa* est plus fréquemment responsable des infections urinaires nosocomiales chez les patients avec cathéters urinaires que chez ceux sans ces dispositifs (10,5% vs 4,1%) [27]. Des bactériémies nosocomiales ont été rapportées dues à *P. aeruginosa* chez 4-6% des cas [28] mais des taux plus élevés (14-20%) sont rapportés par unités des brûlés des soins intensifs [29]. *P. aeruginosa* est également une cause importante de bactériémie chez les patients atteints de leucémie aiguë, ce qui représente 14-21% des épisodes de bactériémies dans cette population de patients [30,31]. Dans l'enregistrement des patients atteints de la fibrose kystique aux États Unis en 2004, 57,3% de toutes les cultures d'échantillons respiratoires rapportées ont contenu de *P. aeruginosa* .

Dans une étude longitudinale qui a associé la culture d'échantillons respiratoires avec un dépistage sérologique de l'infection à *P. aeruginosa*, jusqu'à 97,5% des patients atteints de mucoviscidose ont été trouvés infectés par *P. aeruginosa* à l'âge de 3 ans [32].

1.3 FACTEURS DE VIRULENCE ET PATHOGÉNICITÉ

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Le processus d'infection par *S. aureus* implique l'existence de nombreuses protéines de surface, appelées "composants microbiens de surface des molécules reconnaissant la matrice adhésive". Celle-ci peut être identifiée comme facteurs d'agglutination, des protéines se liant à la fibronectine, au collagène et à la sialoprotéine de l'os. Les syndromes cliniques associés sont l'endocardite, l'arthrite septique, les infections endovasculaires et prothétiques-périphérique et les infections du cathéter [5]. *S. aureus* a la capacité de se développer et persister par la formation et l'accumulation de biofilms sur l'hôte et les surfaces prothétiques [6]. *S. aureus* est également capable de former des petites colonies, et par la persistance intracellulaire qui peuvent contribuer à des infections persistantes et récurrentes, comme la fibrose kystique ou endocardite [54]. *S. aureus* a la capacité d'éviter et de détruire le système immunitaire de l'hôte lors d'une infection. Elle fait cela en produisant une microcapsule anti-phagocytaire [8], et des leucocidines qui provoquent une destruction des leucocytes par la formation de pores dans la membrane cellulaire [52]. *S. aureus* envahit les tissus au cours des infections, en produisant de nombreuses enzymes telles que les protéases, lipases, nucléases, lyase hyaluronate, la phospholipase C et les métalloprotéase (élastase). Cela provoque la destruction des tissus et des infections métastatiques [49,5]. Certaines souches de *S. aureus* produisent des épidermolyses ou des toxines susceptibles de provoquer un syndrome exfoliatif de la peau ébouillantée ou d'impétigo bulleux [11]. *S. aureus* peut également sécréter la protéine inhibitrice de chimiotactisme de staphylocoques ou de la protéine d'adhérence extracellulaire, qui interfèrent à l'extravasation des neutrophiles et au chimiotactisme sur le site de l'infection [7]. Certaines souches de *S. aureus* produisent de super antigènes, résultant de diverses toxicoses, telles que l'intoxication alimentaire et le syndrome du choc toxique [9,10].

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Le mécanisme de virulence est basé sur les toxines sécrétées et la capacité à former des biofilms. En outre, la présence de certains facteurs à la surface bactérienne tels les flagelle qui créent des interactions initiales de la surface, des pilis de surface de multiples cellules (type IV) assurant l'adhésion aux membranes cellulaires. Ceci peut expliquer le mécanisme de l'infection, de la virulence et de la résistance des infections à *P. aeruginosa* [33-35]. Un élément important de la pathogénèse est le flagelle, une structure complexe de protéines responsable de la dispersion du biofilm de *P. aeruginosa*. Sa motricité conduit à la création des filaments adhérant à la surface des cellules hôtes. Comme conséquence, de nombreuses microcolonies seront rassemblées dans un agrégat et attaché à une surface, très souvent liée sur des dispositifs médicaux, de cathéter urinaire ou vasculaire au *P. aeruginosa* [43,44]. Un facteur déterminant la virulence de la pathogénèse de *P. aeruginosa* est le système de sécrétion de type III à travers quatre toxines identifiées comme ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. Ces dernières sont libérées directement chez les cellules hôtes. Les plus virulentes des protéines effectrices de type III de *P.a* est ExoU [36-38]. En outre, une production excessive d'alginate de polysaccharide extracellulaire, par certaines colonies de *P. aeruginosa* génère une condition appelée "mucoïdy" qui semble avoir un rôle important pour la formation de biofilms bactériens [22]. Aussi, l'activité de *P. aeruginosa* est différente lorsqu'il fonctionne comme un groupe. L'utilisation d'un processus de signalisation intercellulaire appelé quorum sensing (QS), lui permet une régulation collective de la transcription des gènes et génère des changements sur le métabolisme, la synthèse des protéines et la virulence [39]. Un autre facteur de la pathogénie est la protéase alcaline, qui lyse la fibrine sécrétée par *P. aeruginosa* (système de sécrétion de type I) et responsable des infections de la cornée ou des lésions pulmonaires aiguës et comme d'autres enzymes sécrétées, telles que l'élastase et la protéase IV, qui sont capables de dégrader plusieurs protéines hôtes immunorégulatrices, y compris les protéines du surfactant A, D et B, l'immunoglobuline et peptides antibactériens [40-42,50].

1.4 IMPORTANCE MÉDICALE

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Le genre *staphylocoque* comprend des espèces qui colonisent la peau humaine ou animale et les membranes muqueuses. Bien que les *staphylocoques* soient une partie de la flore humaine normale et ainsi des micro-organismes commensaux, ils sont également des microbes pathogènes opportunistes qui peuvent causer plusieurs maladies [12]. Parmi des *staphylocoques*, *S. aureus* est l'espèce la plus prédominante. Il est aussi un agent étiologique des diverses maladies humaines et animales, y compris des infections de peau, des abcès, l'intoxication alimentaire, le syndrome de choc toxique, la septicémie, l'endocardite, et la pneumonie [13,14]. *S. aureus* est l'une des causes les plus proéminentes des infections bactériennes nosocomiales et acquises par la communauté dans le monde entier [15,20]. L'incidence annuelle des infections invasives à *S. aureus* est de 28 cas pour 100 000 habitants en Amérique du Nord [21]. Depuis sa première apparition en 1960 [2], les souches de *S. aureus* résistantes au méthicilline (SARM) sont répandues dans les hôpitaux et les unités de soins intensifs [16,15].

Auparavant, des infections à SARM ont été presque toujours associées à l'hôpital ou aux unités de soins de santé. Cependant, de nouvelles souches de SARM sont apparues chez les patients sans contact précédent aux unités de soins de santé. [18]. Les infections à *S. aureus* sont des maladies importantes avec de morbidité et de mortalité dans la population pédiatrique. Au cours de la dernière décennie, le SARM acquis dans la communauté a émergé comme un agent pathogène chez les adolescents atteints par des infections de peau et des tissus mous avec un syndrome de sepsis sévère [19].

1.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa* est responsable d'infections persistantes telles que celles associées à la fibrose kystique (FK), des maladies pulmonaires, des brûlures, l'otorrhée, et la cornée [45]. Les infections nosocomiales causées par *P. aeruginosa* sont les pneumonies, les infections des voies urinaires (IVU), des septicémies, l'infections du site opératoire et de la peau dans le cadre des brûlures.

Les infections causées par *P. aeruginosa* sont associées à une morbidité et une mortalité élevées en comparaison avec d'autres bactéries pathogènes. *P. aeruginosa* a été identifié comme la deuxième cause la plus fréquente de la pneumonie acquise à l'hôpital, de la pneumonie associée aux unités des soins de santé et celle associée au ventilateur [46-48,28]. Aussi dans des unités de soins intensifs pédiatriques, *P. aeruginosa* est signalé comme la cause la plus fréquente de pneumonie nosocomiale [25]. Même si les tendances varient selon chaque centre de soin de santé, *P. aeruginosa* est souvent identifié comme le plus fréquent agent infectieux isolé dans des unités des brûlés. Il représente un pourcentage élevé d'infections documentées de blessure, de la bactériémie et de la pneumonie associée au ventilateur [53]. *P. aeruginosa* joue un rôle particulièrement important chez les patients atteints de FK, pour lesquels des infections chroniques et récurrentes du tractus sinusiennes causées par *P. aeruginosa* sont courantes [32,85]. *P. aeruginosa* est un pathogène important chez les patients souffrant à la fois des déficits immunitaires primaires et acquis, par ex. *P. aeruginosa* a été la cause la plus communément identifiée des septicémies dans une cohorte de patients atteints de déficits immunitaires primaires [55]. *P. aeruginosa* est également une cause importante de bactériémie chez les patients atteints de leucémie aiguë [30,31].

Dans une étude chez des patients infectés par le VIH, l'incidence des bactériémies à *P. aeruginosa* a été environ 10 fois le taux de celle observée dans la population générale des hôpitaux [58]. Dans une recherche de 111 patients atteints de pneumonie chez les adultes hospitalisés avec le VIH, *P. aeruginosa* a été le pathogène le plus souvent isolé [59]. Dans une revue de 233 autopsies de patients infectés par le VIH-1, *P. aeruginosa* a été identifié comme la cause la plus fréquente de bronchopneumonie bactérienne, ce qui représente 16 des 98 cas [60].

Chez des patients de greffe d'organe et de greffe de moelle, le taux de bactériémie causé par *P. aeruginosa* a augmenté par rapport à la population des hôpitaux généraux [58]. En outre, *P. aeruginosa* est fréquemment isolé à partir des infections du pied diabétique, rivalisant avec *S. aureus* comme la bactérie la plus commune isolée de ces blessures [61,62].

1.5 MÉCANISMES DE RÉSISTANCE

Au cours des dernières décennies, le taux croissant de la résistance particulièrement chez les pathogènes nosocomiaux aux antimicrobiens et leur association aux maladies infectieuses sévères ont augmenté à un rythme alarmant. Parmi des 2 millions d'infections nosocomiales survenant chaque année aux États-Unis, 50 à 60% sont causées par des souches résistantes aux antimicrobiens. Ce taux élevé de résistance augmente la morbidité, la mortalité (77,000 décès) et les coûts des soins (environ 5 à 10 milliards de dollars) [63,65].

1.5.1 *Staphylococcus aureus*

Les *staphylocoques* sont généralement responsables des infections nosocomiales. La résistance aux antibiotiques parmi ces organismes est également une préoccupation majeure [68]. Pratiquement toutes les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G lorsque cette dernière a d'abord été introduite au début des années 1940, mais en 1944 les premiers rapports de *S. aureus* résistant à la pénicilline ont déjà apparus, et aujourd'hui presque toutes les souches de *S. aureus* sont résistantes aux pénicillines et aminopénicillines [69].

Le SARM a d'abord été identifié au début des années 1960 coïncidant avec l'introduction de la méthicilline [73]. Suite à une baisse de l'incidence du SARM dans les années 1970, une constante hausse a été notée dans de nombreux pays [74]. Parmi les différents mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne, l'équilibre de la perméabilité membranaire, joue un rôle clé dans l'influx et l'efflux des antibiotiques, ce qui limite leur concentration intracellulaire. Ceci a été décrit dans les deux bactéries pathogènes à Gram positif et Gram négatif [72].

Les PLP (protéines liant les pénicillines) sont des enzymes (sérine acyltransférases), qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et qui sont la cible des bêta-lactamines. L'implication des PLP dans la processus du cycle cellulaire bactérienne a été reconnue depuis de longue date et les rôles clés qu'elles jouent dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une variété des pathogènes ont également été

documentés par plusieurs études [64]. Une modification des PLP est principalement décrite chez les bactéries à Gram positif et, beaucoup plus rarement, chez des bactéries à Gram négatif. La synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles aux bêta-lactamines (*S. aureus*) est liée à l'acquisition de nouveaux gènes. Dans le cas des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline, l'acquisition et l'intégration dans le chromosome d'un gène (*mecA*), induisent la synthèse d'une nouvelle PLP (la PLP 2a). La PLP 2a est capable d'assurer à elle seule l'assemblage du peptidoglycane et elle confère une résistance à toutes les bêta-lactamines ainsi que la méthicilline qui ont été encodées dans le chromosome et ne sont pas facilement transférables [66,69,70,17,102]. Les bêta-lactamases sont des enzymes capables de cliver le cycle bêta-lactam. Ces enzymes, sont produites par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les vraies pénicillinases sont connues chez les bactéries à Gram positif. La résistance des *staphylocoques* par la production de bêta-lactamase due à l'acquisition de gènes qui codent pour inactiver des enzymes des médicaments, semble importante en clinique. Ces bêta-lactamases sont des pénicillinases inactivant la pénicilline G, les aminopénicillines (ampicilline et ses analogues et dérivés), les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. Ces pénicillinases sont inductibles et codées par des plasmides ou des transposons [67, 70,1].

1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, bacille à Gram négatif est un organisme répandu de l'environnement qui peut causer des problèmes considérables dans les deux catégories de patients: les immunodéprimés et les patients aux soins intensifs dans les hôpitaux [75]. *P. aeruginosa* est la plus redoutable bactérie pathogène à laquelle les médecins sont confrontés à soigner chez les patients gravement malades dans les hôpitaux. *P.a* est résistant de façon intrinsèque à une variété d'agents antimicrobiens couramment utilisés, par plusieurs mécanismes [76].

La nature à large spectre d'un grand nombre de mécanismes de résistance intrinsèque exprimée par *P. aeruginosa*, a la possibilité d'acquérir une multitude de déterminants de résistance extrinsèque en un seul événement. Elle présente des défis uniques pour les cliniciens et les laboratoires pharmaceutiques [77].

P. aeruginosa est un pathogène majeur nosocomial caractérisé par sa capacité à développer une résistance à plusieurs classes d'antimicrobiens à la fois par des mécanismes intrinsèques (par ex. l'expression constitutive de β -lactamases et les diverses pompes à efflux, combinées à une faible perméabilité de la membrane externe), ou par l'acquisition de déterminants de la résistance transférable (par ex. des gènes pour β -lactamases, ou par l'enzyme inactivant des aminoglycosides ou la modification de leur cible), ou par diminution de l'expression des porines, ou des mutations dans les cibles des fluoroquinolones [78,81]. Un mécanisme important de résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa* est la production d'AmpC β -lactamase chromosomique, qui peut être induite ou réprimée et confère à la pénicilline de haut niveau de résistance aux céphalosporines [78].

Tableau 1.

Principales caractéristiques des β -lactamases

Types de β -lactamases				
β -lactamases	Pénicillinase de <i>S.aureus</i>	pénicillinase de Gram négatif	Céphalosporinase	β -lactamase spectre élargi (B.L.S.E)
Extracellulaire	+	-	-	-
Per plasmique	-	+	+	+
Entre plasma et paroi				
Chromosomique	-	-	+	-
Plasmidique	+	+	-	+
Inductible	+	-	+	-
Constitutive	-	+	+	+
Inhibée par l'acide clavulanique	+	+	-	+

- Les β -lactamases et ses enzymes: Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques en se rendant imperméables à leur pénétration.
- En produisant des enzymes capables de les inactiver.
- En modifiant la structure de leur cible.
- Les enzymes produites par les bactéries inactivent l'antibiotique en le modifiant ou en l'hydrolysant.
- Leurs substrats sont les β -lactamines, les aminosides, le chloramphénicol ou les antibiotiques de la famille de macrolide, lincosamide, streptogramine (M.L.S).

Tableau 2. Selected pathogens, resistance phenotypes and underlying mechanisms

Species	Resistance phenotype	Mechanism(s)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β -Lactam Fluoroquinolone	Low affinity Pbps Mutant topoisomerases
CA-MRSA	Penicillin Oxacillin Clindamycin Vancomycin	β -Lactamase Low affinity Pbp Constitutive <i>erm</i> expression Mechanism unclear
<i>Enterococcus faecium</i>	Ampicillin Vancomycin Linezolid Daptomycin	Low affinity Pbp Altered peptidoglycan precursor Mutant ribosomal RNA genes Mechanism unclear
<i>Escherichia coli</i>	Cephalosporins Fluoroquinolones	CTX-M β -lactamases Mutant topoisomerases Qnr enzymes Modifying enzyme (Ciprofloxacin) Efflux pumps (intrinsic and acquired)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cephalosporins Carbapenems Fluoroquinolones	ESBLs (variety) KPC-type β -lactamases Mutant topoisomerases Qnr enzymes Modifying enzyme (Ciprofloxacin) Efflux pumps (intrinsic and acquired)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenems Amikacin	OXA-type β -lactamases Ribosomal methylase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenems Aminoglycosides Fluoroquinolones	Metallo- β -lactamases AmpC/porin reduction combinations Modifying enzymes Mutant topoisomerases Efflux pumps (intrinsic and acquired)

Ce tableau a été pris de l'article [70].

1.6 MULTIPLES TRAITEMENTS ASSOCIÉS AUX ANTIBIOTIQUES

La résistance des bactéries aux antibiotiques conventionnels est devenue un point d'inquiétude dans les institutions de santé. Ces problèmes ont conduit à la continuelle recherche d'éventuels autres antimicrobiens associés aux antibiotiques conventionnels, cette association pourrait être efficace et tuer des micro-organismes résistants sans aucun effet secondaire et aussi à un moindre coût [79]. Par mauvaise utilisation des antibiotiques dans les cliniques pourrait induire l'émergence de la résistance bactérienne à ces antibiotiques, dont les mécanismes seront caractérisés par la suite par des chercheurs. Une des conséquences de la relation étroite de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques est le besoin urgent de développer de nouvelles molécules insensibles aux processus de résistance afin de combattre les bactéries pathogènes résistantes. L'augmentation de l'accélération de la résistance bactérienne et les résultats obtenus par des traitements problématiques sont directement responsables de l'augmentation actuelle de la morbidité et la mortalité associées aux infections bactériennes [72].

Malgré la grande efficacité et la disponibilité des antibiotiques depuis plus de 60 ans, les infections sont une grande menace à la vie des malades. Dans certaines causes, les antibiotiques ne montrent pas encore des résultats satisfaisants. Alors pour trouver de solutions, beaucoup d'efforts sont faits pour augmenter la dose de la chimiothérapie, en utilisant un vecteur comme les liposomes, l'argent colloïdal, l'arginine ou de nitrate, bismuth, phage filamenteux, associés aux antibiotiques pour développer de nouvelles molécules en augmentant l'activité des antimicrobiens sur les microorganismes, durant les deux dernières décades [45-83].

1.7 FLUORURE

1.7.1 Métabolisme du fluorure

Après l'ingestion du fluorure, sa majorité est absorbée par l'estomac et l'intestin grêle dans la circulation sanguine. Environ 50% du fluor absorbé chaque jour par des jeunes adultes ou d'âge moyen est associé à des muscles dans les 24 h, alors que pratiquement

tout le reste est excrété dans les urines. Environ 99% des fluorures présents dans l'organisme sont associés à des muscles [84]. Le fluorure ingéré régulièrement pendant le temps où les dents sont en développement est déposé sur toute la surface des dents et contribue à la protection durable contre la carie dentaire [101]. Selon les connaissances scientifiques, l'ingestion d'eau fluorée de façon optimale n'a pas un effet néfaste sur les os [86-90]. Les reins jouent un rôle majeur dans l'élimination du fluorure de l'organisme. Normalement, les reins sont très efficaces et excrètent le fluorure très rapidement [91].

1.7.2 Fonction métabolique

Le fluorure a une action salubre bien établie chez les êtres humains. Grâce à l'action pharmacologique, le fluorure confère une résistance de l'email des dents aux caries. En outre, des fluorures à doses élevées ou des doses pharmacologiques ont empêché l'anémie et l'infertilité provoquée par insuffisance de fer chez les souris. La nephrocalcinose induite par le phosphore alimentaire et la calcification de tissus mous provoqués par la carence de magnésium a été allégée [92].

1.7.3 Physiologie

Le fluor a été décrit comme un élément nutritionnel essentiel au développement normal et à la croissance des animaux et physiologiquement nécessaire aux êtres humains. Le fluorure est abondant dans l'environnement et sa principale source est l'eau potable. Le fluorure de compléments alimentaires sous forme de comprimés, ou de gouttes, se trouve dans les aliments et les boissons. Il a été prouvé bénéfique aux doses recommandées, et en même temps, sa toxicité à des niveaux supérieurs a également été bien établie. Le fluorure est accumulé dans les muscles de l'organisme et a été connu jouer un rôle important dans la minéralisation des os et des dents. À de quantités élevées, il a été connu pour causer la fluorose dentaire et osseuse [93].

1.7.4 Toxicité du fluorure

Il est bien établi que l'utilisation prolongée du fluorure aux niveaux recommandés ne produit aucun effet physiologique nocif chez les humains. Cependant, il y a des limites certaines pour le fluorure au-delà desquelles les effets nocifs peuvent se produire. Ces effets peuvent être classifiés en tant que toxicité aiguë et chronique.

1.7.4.1 Toxicité aiguë

Celle-ci peut se produire en raison d'une ingestion simple d'une grande quantité de fluorure. L'ingestion d'une dose mortelle aiguë de fluorure est très rare. La quantité de fluorure à considérer mortelle une fois prise oralement est de 35-70 mg de F par poids corporel de kg. C'est l'équivalent de 5-10 g de fluorure de sodium pour un adulte de 70 kg et 1-2 g de fluorure de sodium pour un enfant de 15 kg. Les symptômes de la toxicité aiguë se produisent rapidement. Il y a une douleur abdominale diffuse, de diarrhée, de vomissement, de salivation excessive, et de soif [94,95].

1.7.4.2 Toxicité chronique

Celle-ci est causée en raison de l'ingestion à long terme d'un peu de fluorure dans l'eau potable. L'ingestion excessive du fluorure de plus de 8 ppm (8 parties par million) par jour pendant plusieurs années peut mener à une fluorose osseuse. À l'ingestion plus grande de fluorure (2 à 8 mg) quotidien, la fluorose osseuse peut surgir. Les signes cliniques de fluorose osseuse sont de la douleur chronique de l'articulation, la calcification des ligaments liés à la dose, l'ostéosclérose, l'ostéoporose d'os long, et dans des cas graves, perdre de la masse musculaire et des problèmes neurologiques [94].

1.7.5 Activité antimicrobienne de fluorure

Le fluorure est bien documenté en tant qu'agent anticariogène. Une variété de mécanismes est impliquée dans les effets anticariogènes de fluorure, y compris la réduction de la déminéralisation, l'amélioration de la reminéralisation, l'ingérence de la formation de la pellicule, de la plaque de l'inhibition de la croissance microbienne et du métabolisme [96]. Les effets du fluor sur les bactéries buccales et la plaque dentaire sont bien connus. Les mécanismes par lesquels le fluorure peut interférer avec le métabolisme des bactéries et la plaque dentaire acidogène (l'acidogénicité de la plaque dentaire) incluent l'inhibition de l'enzyme glycolitique émolase et l'ATPase à protons-extrusion ainsi que la colonisation bactérienne et la concurrence. En outre, les enzymes intracellulaires ou la plaque-associée, telles que la phosphatase acide, la pyrophosphatase, la peroxydase et la catalase peuvent être affectées par des ions fluorures [97,99]. En conclusion, le fluorure est connu pour inhiber le métabolisme de biosynthèse des bactéries, mais ces effets antimicrobiens dans la prévention des caries sont souvent considérés comme peu ou pas d'importance par rapport aux interactions directes de fluorure avec le muscle pendant le développement des caries et leur progression [96]. La fluorisation de l'eau potable pour réduire la carie dentaire est généralement considérée comme l'une des triomphes de la santé publique au 20^e siècle. Le fluor semble agir à deux niveaux. Un niveau implique l'incorporation de l'anion en hydrox apatite, qui peut résister à l'hydrolyse acide, l'autre niveau est lié à l'effet de l'anion sur les bactéries cariogènes [98].

1.8 CONCLUSION

Sans aucun doute, la communauté médicale est maintenant très consciente de la préoccupation mondiale de la maladie infectieuse imposée par *S. aureus* et *P. aeruginosa* multirésistants aux antibiotiques. Les conséquences de la pandémie et l'émergence continue de souches résistantes telles que *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont profondément inquiétantes donc elles exigent une réaction urgente.

Malgré la grande efficacité et la disponibilité des antibiotiques dans certaines causes, les antibiotiques ne montrent pas encore des résultats satisfaisants. Alors, globalement, la recherche pluridisciplinaire pour trouver des nouveaux antibiotiques contre des pathogènes résistants doivent commencer sérieusement. Bien que les chercheurs, au niveau académique et pharmaceutique, travaillent à développer des réponses thérapeutiques et ont déjà fait des progrès importants, il reste encore du travail considérable.

Pour développer des nouvelles molécules, l'association des différents dérivés de fluorures aux antibiotiques a été parmi des solutions utilisées, les effets du fluorure sur les bactéries buccales et de la plaque dentaire sont bien documentés en tant qu'agent anticariogène.

Des effets antimicrobiens du fluorure dans la prévention des caries sont souvent considérés avec peu ou pas d'importance par rapport aux interactions directes de fluorure avec le muscle pendant le développement des caries et leur progression. Même s'il y a toujours une manque sur les études concernant les effets des antimicrobiens de fluorure dans les milieux cliniques, le fluorure associé aux antibiotiques pourrait alors devenir une option de traitement pour les patients infectés par des souches résistantes afin d'améliorer l'activité antimicrobienne, et aussi à réduire la toxicité causée par de fortes doses d'antibiotique.

1.9 RÉFÉRENCES

1. Rossolini GM, Mantengoli E, Montagnani F and Pollini S, Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. *Curr Opin Microbiol* 2010, 13(5):582–588
2. Boucher HW, Corey GR, Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Clin Infect Dis* 2008; 1;46 Suppl 5:S344-9.
3. Jones RN, Low DE, and Pfaller MA, Epidemiologic trends in nosocomial and community- acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: The role of streptogramins and other newer compounds. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33 (2): 101–112
4. Leclercq R, Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(3): 224–231
5. Gordon RJ, and Lowy FD, Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 1;46 Suppl 5:S350-9.
6. Donlan RM, and Costerton JW, Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.
7. Foster TJ, Immune Evasion by Staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(12):948–58.
8. O’Riordan k, and Lee JC, *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microb Rev*, Jan. 2004;17(1): 218–234
9. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1):16–34.

10. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55:77–104.
11. Prevost G, Couppie P, Monteil H. Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(2):71–6
12. Malachowa N, DeLeo FR, Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67(18): 3057–3071
13. DeLeo FR, Chambers HF, Reemergence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.* 2009 Sep;119(9):2464-74.
14. Van Belkum A, Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19(4):339–344
15. Chambers HF, DeLeo FR, Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(9):629–41
16. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008 Dec;8(6):747-63.
17. Chambers HF. Methicillin-resistant *staphylococci*. *Clin Microbiol Rev.* 1988 Apr; 1(2): 173-86.
18. Otter JA, French GL, Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010;10(4): 227–39

19. Gonzalez BE, Mon RA, *Staphylococcus aureus* infections in adolescents. *Adolesc Med State Art Rev.* 2010 Aug;21(2):318-31, x.
20. Weems JJ Jr. The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgrad Med.* 2001 Oct;110(4):24-6, 29-31, 35-6.
21. Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD. Population – based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis.* 2003 May 1;187(9):1452-9.
22. Driscoll JA, Brody SL and Kollef MH, The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* 2007; 67 (3): 351-368
23. Gaynes R, Edwards JR, Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005 Sep 15;41(6):848-54.
24. Arias CA, Quintero G, Vanegas BE, Rico CL, Patiño JF. Surveillance of Surgical Site Infections: Decade of Experience at a Colombian Tertiary Care Center. *World J. Surg.* 2003; 27(5), 529–533
25. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, Nosocomial Infections in Pediatric Intensive Care Units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics* 1999;103(4);e39
26. Jodra VM, Diaz-Agero Pérez C, Sainz de los Terreros Soler L, Maria Saa Requejo C, Dacosta Ballesteros D, Results of the Spanish national nosocomial infection surveillance network (VICONOS) for surgery patients from January 1997 through December 2003. *Am J Infect Control.* 2006 Apr;34(3):134-41.

27. Bouza E, San Juan R, Muñoz P, Voss A, Kluytmans J; A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. Clin Microbiol Infect. 2001 Oct;7(10):523-31.
28. Harbarth S, Ferrière K, Hugonnet S, Ricou B, Suter P, Pittet D, Epidemiology and Prognostic Determinants of Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care. Arch Surg. 2002 Dec;137(12):1353-9;
29. Taneja N, Emmanuel R, Chari P.S., Sharma M, A prospective study of hospital-acquired infections in burn patients at a tertiary care referral centre in North India. Burns 2004; 30(4):665–669
30. Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Rolston KV, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: retrospective analysis of 245 episodes. Arch Intern Med. 2000 Feb 28;160(4):501-9.
31. Funada H, Matsuda T. Changes in the incidence and etiological patterns of bacteremia associated with acute leukemia over a 25-year period. Intern Med. 1998 Dec; 37 (12): 1014-8.
32. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. J Infect Dis 2001 Feb 1;183(3):444-52.
33. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, and Rello J, *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies Crit Care Med. 2009 May ; 37(5): 1777–1786.

34. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, and Prince AS, Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(11): 1209–1223.
35. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J, Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006; 36(2): 78–91.
36. Frank DW. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 1997 Nov;26(4):621-9.
37. Holder IA, Neely AN, Frank DW. PcrV immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Infect Immun* 2001;69(9):5908–5910.
38. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 2004;72(12):6969–6977.
39. Juhas M, Eberl L, Tummeler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005;7(4):459–471.
40. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *AmJ Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(4): 528-37
41. Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Björck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog* 2003; 34(1): 47-55
42. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 2002; 46(1): 157-68

43. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun* 1998; 66:1000–1007.
44. O'Toole GA, Kolter R., Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol* 1998;30(2):295–304.
45. Borriello G, Richards L, Ehrlich GD, and Stewart PS, Arginine or Nitrate Enhances Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob agents and Chemother*, Jan. 2006, 50(1):382–384
46. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 2002; 122(6): 2115-21,
47. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, and Johannes RS, Epidemiology and Outcomes of Health-care–Associated Pneumonia Results From a Large US Database of Culture-Positive Pneumonia. *Chest* 2005;128(6);3854-3862
48. Osmon S, Ward S, Fraser VJ and Kollef MH, Hospital Mortality for Patients With Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2004; 125(2); 607-616
49. Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997: 55–81.
50. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16792-7.

51. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* 2003; 36(9): 1103–1110.
52. Gladstone GP, Van Heyningen WE. Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol* 1957; 38(2):123–37.
53. Yildirim S, Nursal TZ, Tarim A, Torer N, Noyan T, Demiroglu YZ, Moray G, Haberal M. Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care units, and the hospital services unit of a single center. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26(6):488-92.
54. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1998; 177(4):1023–9.
55. Lee WI, Jaing TH, Hsieh MY, Kuo ML, Lin SJ, Huang JL. Distribution, infections, treatments and molecular analysis in a large cohort of patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs) in Taiwan. *J Clin Immunol* 2006; 26(3): 274-83.
56. Marinho V.C.C. Evidence-based Effectiveness of Topical Fluorides *Adv Dent Res* 2008 20(1):3-7
57. Newbrun E, Topical Fluorides in Caries Prevention and Management: A North American Perspective, *J Dent Educ.* 2001; 65(10): 1078-83.

58. Vidal F, Mensa J, Martinez JA, Almela M, Marco F, Gatell JM, Richart C, Soriano E, Jiménez de Anta MT. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18 (7): 473-7.
59. Afessa B, Green B. Bacterial pneumonia in hospitalized patients with HIV infection: the Pulmonary Complications, ICU Support, and Prognostic Factors of Hospitalized Patients with HIV(PIP) Study. *Chest* 2000; 117: 1017-22.
60. Afessa B, Green W, Chiao J, Frederick W. Pulmonary complications of HIV infection: autopsy findings. *Chest* 1998; 113(5): 1225-9.
61. Shankar EM, Mohan V, Premalatha G, Srinivasan RS, Usha AR. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *Eur J Intern Med* 2005; 16(8): 567-70.
62. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Dia Compli* 2005; 19(3): 138-41.
63. Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(3):416-420
64. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 Sep;30(5):673-91.
65. US Department of Health and Human Services. Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States. Washington, DC: US Government Printing Office, *MMWR Recomm Rep.* 1994; 15;43(RR-5):1-18.
66. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006 Jun; 119(6suppl 1): S3-S10.
67. Poole K, Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann of Med* 2007 39(3): 162-176.

68. Jones RN, Resistance Patterns Among Nosocomial Pathogens Trends Over the Past Few Years. *Chest*. 2001 Feb;119(2 Suppl):397S-404S.
69. Rice LB, Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infec control*. 2006 jun; 34(5 suppl 1): S11-9
70. Rice LB, The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin in Microbiol* 2009, 12(5):476–481
71. Morell E.A, Balkin D.M, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Pervasive Pathogen Highlights the need for new Antimicrobial development. *Yale J OF Bio and Med* 2010 ; 83(4), pp.223-233.
72. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV., Page`s JM, Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J of Antimicrob Chemothe* 2007 59(6), 1223–1229
73. Hawkey PM, Jones AM, The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10.
74. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12): 3926–34.
75. Hawkey P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008 62, Suppl. 1, i1–i9
76. Nikaido H: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, 67(4):593-656.
77. Rice LB: The Maxwell Finland Lecture: for the duration-rational antibiotic administration in an era of antimicrobial resistance and *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2008, 46(4):491-496.

78. Mesaros, N., Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens P. M., and Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 2007, 241 13(6):560-78.
79. Iroha, I. R, Esimone, C. O., Orji J. O. and Imomoh, O. O. , Antibacterial efficacy of colloidal silver alone and in combination with other antibiotics on isolates from wound Infections. Scientific Research and Essay, 2007 Vol. 2 (8), 338-341,
80. Rice L.B., Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. Cleve Clin J Med. 2007; 74 • supplement 4:S12-20.
81. Rolston K.V.I, New antimicrobial agents for the treatment of bacterial infections in cancer patients. Hematol Oncol 2009; 27(3): 107–114
82. Sun Q, Liang X, Zheng Q, Liu W, Xiao S, Gu W , Lu H, High Efficacy of 14-Day Triple Therapy-Based, Bismuth-Containing Quadruple Therapy for Initial Helicobacter pylori Eradication. Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 2010 15(3): 233–238
83. Hagens S, Habel A, and Bläsi U, Augmentation of the Antimicrobial Efficacy of Antibiotics by Filamentous Phage. Microb Drug Resist 2006; 12(3):164-8
84. Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. J Dent Res 1990;69:539-49.
85. Saiman L., Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: ‘the motion for’. Pediatr Respir Rev. 2007; 8(3): 249–255

86. Cauley JA, Murphy PA, Riley TJ, Buhari AM. Effects of fluoridated drinking water on bone mass and fractures: The study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1995 Jul;10(7):1076-86.
87. Gordon SL, Corbin SB. Summary of workshop on drinking water fluoridation influence on hip fracture on bone health. (National Institutes of Health, 10 April, 1991) *Osteoporos Int*. 1992 May;2(3):109-17.
88. Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Melton LJ . Hip fracture incidence before and after the fluoridation of the public water supply, Rochester, Minnesota. *Am J Public Health* 1993;83(5):743-5.
89. Karagas MR, Baron JA, Barrett JA, Jacobsen SJ. Patterns of fracture among the United States elderly: Geographic and fluoride effects. *Ann Epidemiol* 1996;6(3):209-16
90. Suarez-Almazor ME, Flowerdew G, Saunders LD, Soskolne CL, Russell AS. The fluoridation of drinking water and hip fracture hospitalization rates in two Canadian communities. *Am J Public Health* 1993;83(5):689-93.
91. National Research Council. Health effects of ingested fluoride. Report of the Subcommittee on Health Effects of Ingested Fluoride. Washington, DC: National Academy Press;1993.
92. Nielsen FH, Micronutrients in Parenteral Nutrition: Boron, Silicon, and Fluoride. *Gastroenterology* 2009; 137(5 suppl): S55–S60
93. Dhar V, Bhatnagar M, Physiology and toxicity of fluoride. *Indian J Dent Res*. 2009 20 (3): 350-355
94. Mellberg JR, Ripa LW. Fluoride metabolism. *Fluorides in Preventive Dentistry-Theory and clinical Applications*. Quintessence Publishing Co Limited; 1983. p. 81-102.

95. Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16 Rev 2:1-153.
96. Wieganda A, Buchalla W, Attin T, Review on fluoride-releasing restorative materials—Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007; 23(3): 343–362
97. Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.* 1990 Feb; 69 Spec No:660-7;
98. Cao J, Doyle R.J. , Fluoride modifies adhesion of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 Jan 14;32(2):175-7.
99. Thongboonkerd V, Luengpailin J, Cao J, Pierce WM, Cai J, Klein JB, and Doyle R. J., Fluoride Exposure Attenuates Expression of *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors. *J Biol Chem* 2002; 277 (19): 16599–16605
100. Klustersky J, Ameye L, Maertens J, Georgala A, Muanza F, Aoun M, Ferrant A, Rapoport B, Rolston K, Paesmans M. Bacteremia in febrile neutropenic cancer patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Nov;30 Suppl 1:S51-9
101. Newbrun E. What we know and do not know about fluoride. *J Public Health Dent.* 2010; 70(3):227-33.
102. Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy MÉ, Tristan A, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010. *Med Sci (Paris).* 2010 Nov;26(11):943-9.

DEUXIÈME PARTIE:
MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

ARTICLE:

**CHARACTERIZATION OF ACTIVITY OF
FLUORIDE DERIVATIVES ASSOCIATED TO ANTIBIOTICS
ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**CHARACTERIZATION OF ACTIVITY OF FLUORIDE DERIVATIVES
ASSOCIATED TO ANTIBIOTICS ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Riazi Mansour, Ravaoarinoro Madeleine

Department of Microbiology and Infectiology, University of Montréal, and Centre
hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu

Running head: Antimicrobial effect of fluoride derivative on *S.aureus* and *P.*
aeruginosa stains

In preparation

2.1 ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a threat to global health that is always associated with high mortality rates and medical costs. The rapid emergence and spread of antibiotic resistant strains such as *S. aureus* and *P. aeruginosa* in health care units and in the community urgently requires the development of new treatments. Since it is rather expensive for clinical settings to undertake research for the discovery of antibiotics, this present research investigated methods to improve currently available antibiotics. Since fluorides have some antibacterial effect in the mouth, their combination with antibiotics could improve and increase the antimicrobial activity and decrease the toxicity of antibiotics, allowing for the treatment of resistant pathogens. Thus, the in vitro activity of vancomycin (VAN), oxacillin (OXA), ceftazidime (CFT), and meropenem (MER) alone or combined with lithium fluoride (LiF) or sodium fluoride (NaF) were evaluated against susceptible and drug resistant *S.aureus* and *P.aeruginosa* strains. Using the microplate dilution method, it was possible to determine their minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC), as well as evaluating the kinetics (Time-Kill). Cytotoxicity, and conservation of the stability of antibiotics associated with fluoride derivatives at temperatures of 4°C and 22°C were also investigated. In conclusion, as a result of our research the combination of antibiotics VAN and OXA with (2 mg/L) LiF against *S.aureus* ATCC 29213, as well as CFT and MER with (2 mg/L) LiF against *P.aeruginosa* ATCC27853 showed that the derivatives of fluoride can increase the activity of antibiotics by having MICs two fold below the MICs of their free forms, and also their risk of toxicity against human blood being less.

KEY WORDS :

Staphylococcus aureus; *Pseudomonas aeruginosa*; Antibiotics; Resistance; Fluoride derivatives; MIC; MBC; Time-Kill; Cytotoxicity; Stability

2.2 INTRODUCTION

P. aeruginosa (*P.a*) is a Gram-negative nosocomial pathogen of great concern known to have multiple mechanisms of resistance to antimicrobial agents. *S. aureus* (*S.a*) is an important Gram-positive pathogen causing several infections in hospital and community settings (1,2). Vancomycin (VAN) and oxacillin (OXA) are effective treatments currently used against Gram-positive bacteria. Antibiotics such as ceftazidime (CFT), and meropenem (MER) are used against Gram-negative bacteria, although some cases of resistance have been reported (3,4,5). With increasing incidence of cases of resistance, it becomes necessary to develop more effective molecules, either by improving existing antibiotics or by the synthesis of new antibacterial molecules. In recent decades, despite much progress on the production of new antibiotics which is a long and tedious process, it has become necessary to find new treatment options from existing products. This would make them more effective antibiotics to combat resistant bacteria. Fluoride is known to have an antibacterial effect [26]. Thus, it is possible that combining fluoride with antibiotics could improve their effectiveness. Preliminary research has already shown the positive influence of lithium fluoride and sodium fluoride on some antibiotics [23,24,13]. In this study, VAN, OXA, CFT, MER were combined with lithium fluoride and sodium fluoride to evaluate their activity against *S.a* and *P.a*. Sensitivity tests to determine their minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC), and an assessment of the kinetics (Time-Kill), the cytotoxicity and preservation of stability were performed.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Bacterial strains and culture

Two bacterial species: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were used in this study. The control strain *S. aureus* ATCC 29213, and the clinical (resistant) strain *S. aureus* 143545-2, were inoculated on nutrient agar (Quélab Laboratories inc., Montreal, Quebec, Canada), while the control strain *P. aeruginosa* ATCC27853 and clinical (resistant) strain *P. aeruginosa* 109530.1 were inoculated on selective agar (Difco Laboratories Detroit Michigan USA). *P. aeruginosa* strains were incubated for 18h at 37 °C. Following this first passage, the strains were subcultured twice, respectively, on nutrient and selective agar. Freezing media containing TSB (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) with 10% glycerol (Sigma- Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) were prepared to maintain the bacterial cultures at -70 °C. The culture media used were Mueller-Hinton broth (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA). The solutions of Mg^{2+} and Ca^{2+} were prepared from $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ and $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (Sigma, St. Louis, MO, USA). Stock solutions of 12.8 mg / mL were prepared and distributed in volumes of 500 μ L. These samples were stored at -70 °C.

2.3.2 Antibiotics

Vancomycin (Hospira, Montreal, Canada) is bactericidal and belongs to the glycopeptide family. Like the β -lactam antibiotics, it is an inhibitor of peptidoglycan synthesis of the bacterial cell wall. Its spectrum of activity therefore includes only gram-positive bacteria. Oxacillin (Hospira, Montreal, Canada), a narrow-spectrum class of penicillin, is a first-line treatment for infections with staphylococci. Ceftazidime (Glaxo Inc., Toronto, Canada), is a third generation cephalosporin. It is bactericidal and its broad spectrum of activity includes both gram-positive and gram-negative bacteria. Meropenem (Glaxo Inc., Toronto, Canada) is a bactericidal antibiotic of the carbapenem class, with an ultra-

wide spectrum that targets many Gram-positive and Gram-negative bacteria including β -lactamase resistant strains.

2.3.3 Fluoride derivatives

Stock solutions of 1300 mg /L lithium fluoride and sodium fluoride (Sigma-Aldrich Co.), were prepared, hermetically sealed and stored at room temperature, away from light. Preliminary studies on fluoride derivatives required that their dilutions were prepared before each test. The stock solutions were agitated until dissolved and then, solutions of lithium fluoride and sodium fluoride at 4, 8, 16 and 32 mg/L were prepared. Sensitivity tests were carried out in a final volume of 200 μ L, using final concentrations of lithium fluoride and sodium fluoride at 2, 4 and 8 mg/L. To determine the MIC of the antibiotic combinations with fluoride, 50 μ L of each of the 10 dilutions of antibiotics were distributed into the wells of their corresponding column of the microplate. Then, the dilutions of each respective fluoride were distributed in 10 wells in the same row in volumes of 50 μ L. Finally, 100 μ L aliquots of various dilutions of fluorides were added as control in duplicate to each microplate to achieve the final concentrations used in the study.

2.3.4 Testing for bacterial susceptibility to antibiotics

2.3.4.1 Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics

The minimum inhibitory concentrations (MIC) is the lowest concentration in μ g / ml of an antibiotic that inhibits bacterial growth completely. This in vitro test determines whether a strain is susceptible or resistant to the antibiotic. The minimum inhibitory concentrations were determined using the method suggested by the NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (8). The MICs of four antibiotics were determined by the microplate dilution method for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated in the Hotel-Dieu du CHUM hospital. The method is as follows: 1:1 serial dilutions covering ranges of (0.25 to 128 g/ml) of 4 antibiotics (free or associated with fluoride derivatives) were prepared from stock

Solutions of 512 mg/L, prepared the same day in deionized sterile water. A bacterial colony taken from a 24 hour culture on nutrient and selective agar was inoculated into 3.6 ml or 4.5 ml Mueller-Hinton broth (MHB) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA), and incubated at 37°C with agitation until a turbidity equivalent to a solution of 0.5 McFarland units (turbidimeter Adjust. Abbot Laboratories) was reached. This bacterial suspension corresponds to a concentration equal to 10^8 cfu / mL (colony forming units per milliliter). The resulting suspension was then diluted ten times at 1:10 in fresh Mueller-Hinton broth to give a final inoculum of 10^4 cfu/mL. A bacterial solution (inoculum) without antibiotics was used as a positive control, while uninoculated Mueller-Hinton broth was used as a negative control. The MIC of antibiotics tested for *S. aureus* ATCC 29213 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as a positive control. The MICs of antibiotics for each strain were then determined and strains were considered resistant to an antibiotic when the MIC in $\mu\text{g/mL}$ is greater than the sensitivity threshold. To ensure the validity of susceptibility testing, the MIC of the free antibiotic against the reference strain *S.aureus* ATCC29213 and *P.aeruginosa* ATCC27853 were evaluated and compared with the values of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic at which bacterial growth was completely inhibited. Strains with MICs above the threshold of sensitivity of a given antibiotic are classified as resistant whereas strains with MICs below the threshold are considered sensitive. In addition, there were three positive and negative controls in each microplate. The positive control consisted of 100 μL of CAMHB as well as 100 μl of inoculum, whereas the negative control contained only 200 μL of CAMHB. All tests were performed under the same experimental conditions in triplicate.

2.3.4.2 Determination of minimum bactericidal concentrations (MBC) of antibiotics

To evaluate the bactericidal effect of antibiotics, four serial dilutions of 1/10 of the inoculum were prepared and a volume of 10 μL from each dilution was inoculated on nutrient agar for *S. aureus* and on selective agar for *P. aeruginosa*. After inoculating, the plates were incubated for 18 h at 37°C and the colonies were counted. Following

incubation for 18 hours at 37°C in microplates, 100 µL of the supernatant of some wells from the multiwell plate experiment described above, without either turbidity or sediment were also seeded onto agar plates. Again, the plates were incubated at 37 °C for 18 hours. The colonies of these plates were also counted. The evaluation of bactericidal activity was done in triplicate.

2.3.5 Kinetic method (Time-Kill)

Determination of the Time-Kill curves of 4 antibiotics with and without added fluoride were performed as follows: a fresh culture of clinical strains *S. aureus* 143545-2 or *S.aureus* ATCC29213 or *P.aeruginosa* 109530,1 or *P.aeruginosa* ATCC 27853 in a final inoculum of 5×10^4 cfu /mL in a sterile Mueller-Hinton broth was incubated at 37° C for 2, 4, 6, 8 and 24 h with one, two and four times the MIC determined for each of 4 antibiotics alone or associated with fluoride derivatives. The cultures of the same strains without antibiotics were used as positive control. All experiments were repeated in triplicate (9).

2.3.6 Method of assessing the cytotoxicity of antibiotics

2.3.6.1 Hemolysis test

Human blood from volunteers who did not receive the drug in the last 3 days before the sample was collected in heparin-containing tubes. The plasma was removed from whole blood by centrifugation (Damon / reading division, reading PR-6000). The erythrocyte pellet was washed two times with 10 volumes of buffer A (147mM NaCl, 6 mM glucose, 20 mM Tris-HCl pH 7.2) by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes. The 3% erythrocyte suspension was prepared by mixing the pellet in buffer B (74mM NaCl, 6mM Glucose, 147mM Sucrose , 20mM Tris-HCl pH 7.2). Each of four antibiotics was combined with two fluoride derivatives (lithium and sodium) were tested for different incubation times at 37° C and were shaken in shaker bath (LAB-Line Instruments, Inc.) for the following times: 1,20,40,60,80,100,120 min. The hemolysis test was done in triplicate. The results are expressed as % of hemolysis by optical spectrophotometer

(Secoman S.500, France), indicating the optical density in relation to white as the indicator of complete hemolysis up to 100% (6,7).

2.3.7 Method for determination of stability of antibiotics

To assess the length of each antibiotic's stability at different temperatures in microplate, 8 microplates were loaded with VAN, OXA, CFT, MER, in their form alone or associated with lithium fluoride and sodium fluoride and stored at cold (4°C) and room temperature (22°C). These were tested against *P. aeruginosa* ATCC27583 and *S.aureus* ATCC 143545-2 in triplicate after 1, 2 and 4 weeks. For testing each antibiotic in its form alone, 100 µl of each dilution was loaded into a well while 50 µl was loaded into each well to the antibiotic associated with a fluoride derivatives.

2.4 RESULTS

2.4.1 Effect of fluoride derivatives on the MIC and MBC of antibiotics against strains

The fluorides lower the MIC of VAN against *S. aureus* ATCC29213 and the resistant *S. aureus* strain 143545-2, and also decreases the MIC of CFT and MER against *P. aeruginosa* ATCC27853 as shown on (table I). The susceptibility of the strains above was tested with the antibiotics listed in their free form and combined with different concentrations of fluoride derivatives (2,4,8,10 mg/L). Based on the results of three trials, the most effective concentration of each fluoride in our case (2 mg/L) was established. The MIC of strains was then tested in triplicate with different concentrations of fluoride. By comparing the MIC determined between free antibiotics and antibiotics combined with fluoride derivatives, Table I shows that fluoride can alter the activity of an antibiotic. The MIC of 4 antibiotics combined with fluoride derivatives were found to be two fold lower than the MIC of free antibiotic. The MIC of VAN combined with LiF (2mg/L) against *S. aureus* ATCC 29213 was lower by two fold than free VAN. In case of VAN and NaF (2mg/L), against *S. aureus* ATCC29213 we found also a MIC smaller by two fold than the free VAN. In OXA combination of LiF respectively (2,4,8,10 mg/L) concentrations, the same MICs to those of free OXA were observed. The NaF of (4mg/L) showed the same MIC to that of free OXA and MIC greater than that of free OXA with 2,8,10 mg/L concentration. In addition, the MIC of combination of VAN/LiF whose concentrations were as follows: 2, 4, and 8 mg/L against *S. aureus* 143545-2 had MICs lower by one fold than those of free VAN, but remained similar with NaF (2,4,8,10 mg/L). Concentrations of 2,4,8 and 10 mg/L of LiF associated with CFT were tested against *P.aeruginosa*ATCC27853. The MICs observed lower by one fold than the MIC of free CFT. In the case of MER only concentrations of 2,4 mg/L of LiF and NaF against *P.aeruginosa* ATCC27853 showed MIC lower by two fold than those of free MER. Based on these results concentrations of 2 mg/L for LiF and NaF, were tested with VAN, OXA, CFT and MER against *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains. In assessing

the impact of fluoride derivatives on the activity of VAN and OXA against *S. aureus* and also CFT, MER against *P. aeruginosa*, the combination of LiF (2mg/L) was chosen for its efficiency and lower concentration with an MIC two fold smaller than the MIC corresponding to that of the free form. Following the determination of MIC, an analysis of the bactericidal activity (MBC) of free VAN, OXA, CFT, MER and combined with LiF and NaF was made (Table I). Table I shows the same MBC for all antibiotics except two fold lower for VAN/LiF against *S.aureus* (143545-2). Concerning NaF combined with OXA, CFT, and MER the MBC was not determined.

2.4.2 Determining the stability of the combination of antibiotics with fluoride derivatives at different temperatures

The stability of the antibacterial activity following storage at cold (4°C) and room temperature (22 °C) was evaluated by testing the sensitivity of *P. aeruginosa* ATCC 27583 and *S.aureus* ATCC 143545-2 against CFT, MER, VAN and OXA in their free form and combined with lithium fluoride and sodium fluoride (Tables II). Tables II show that for all the antibiotics used in their free form, the MIC remains the same at 0, 2 and 4 weeks, at both temperatures, For VAN, CFT, MER in their combined form with LiF and NaF respectively of 2mg/L, the MIC was reduced by half at the beginning of the week at both temperatures. After 2 weeks of storage, a MIC reduced to half was obtained for the VAN/LiF (2mg/L) combined and the same MIC after 4 weeks for the free form and combined one. While at T°= 4°C according to Table II, the MIC for VAN and CFT combined is one fold smaller. Contrary to what was observed with OXA and MER, the different temperatures did not play a big role.

2.4.3 Cytotoxicity of antibiotics associated with fluoride derivatives in human blood

Figure 1,2 shows in vitro results of % human blood hemolysis test of four antibiotics VAN, OXA, CFT and MER combined with 2mg/L LiF, which it varies between 2 and 20%.

2.4.4 Determining the Time-Kill curves

The combinations of lithium fluoride and sodium fluoride (2 mg/L) to VAN, OXA, CFT, MER showed maximum bactericidal activity within 6-8 h in all the experiments and the efficacy was similar to that of antibiotics alone but regarding to the bactericidal activity of fluoride alone, no effect was observed (Figures 3-10).

2.5 DISCUSSION

It is of great interest to make the antibiotics more effective. We evaluated the influence of fluoride derivatives on the activity of VAN, OXA, CFT and MER. We attempted to determine if combination of fluoride derivatives with 4 antibiotics VAN, OXA, CFT and MER could improve their activity against *S.aureus* and *P.aeruginosa* strains. According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007), the MICs of VAN and OXA acceptable for *S.aureus* ATCC29213 vary from 0.5 to 2 µg/ml and MICs of CFT and MER acceptable to *P.aeruginosa* ATCC27853 are respectively ≤ 8.00 and ≤ 4.00 µg/ml for quality control. To ensure the validity of susceptibility testing, MICs of antibiotics used against *S.aureus* ATCC29213 and against *P.aeruginosa* ATCC 27853 were tested in each trial. In addition, before testing clinical strains, the most effective concentrations of each fluoride should be determined. Preliminary studies have shown that fresh stock solution of fluoride derivatives, as well as the novelty of its dilutions had a significant impact on results.

The MICs lower than those of free antibiotics have been observed in cases where the dilutions were prepared directly before susceptibility testing. This is probably due to faster inactivation of the activity of fluoride at low concentrations. Fluoride concentrations with MICs were mostly lower than the free antibiotic were selected. Subsequently, the concentrations of fluoride which MICs were higher than the MIC of free antibiotic were eliminated. Finally, when several concentrations of the same derivative of fluoride remained the smallest was chosen. It is important to understand that the lowest concentration of an antimicrobial agent is always recommended because it reduces the chances of developing toxicity if the experiment was done in vivo. Finally, 2 mg/L of LiF and NaF were chosen as the concentration to be associated with VAN, OXA, CFT and MER. While certain combinations of antibiotics and fluoride derivatives showed no improvement in the bacteriostatic activity by a decreasing in CMI or that have shown that just during a test, VAN and OXA with (2 mg/L) LiF against *S.aureus* ATCC 29213, as well as CFT and MER with (2 mg/L) LiF against *P.aeruginosa* ATCC 27853 showed that the derivatives of fluoride can increase the activity of antibiotics. In the

presence of fluoride, only 2 CMI's were higher than the CMI of reference from a total of 48 MICs determined. So the combination of an antibiotic with a fluoride could become an interesting alternative to current therapies.

Indeed, with research in the field of dentistry, it appears that the activity of fluoride may increase with duration of treatment (10). The possibility of such an increase in the activity of fluoride is intriguing because the doses of an antibiotic combined with a fluoride could be reduced during therapy, reducing the risk of toxicity and fewer pathogens become resistant if dose of antibiotics was reduced (11). The use of fluoride either alone or on combination therapy to combat caries has proved to be an effective practice in regarding the growth of cariogenic *Streptococci*. Fluoride and xylitol act synergistically to suppress sugar metabolism in *mutans streptococci* leading to reduced growth of these organisms. Fluoride inhibits enolase, a glycolytic enzyme coded by an essential gene (17,18,25). Enolase is a protein which play important roles in adhesion and in gene regulation (19,20). In combination therapy, fluoride is associated to cations which increase its antimicrobial properties. At varying degree different cations act as adjuvants to augment the antimicrobial activities of fluoride. In case of amine fluoride (AmF) a stronger antimicrobial agent than NaF against caries causing bacteria, inhibition of acid production by AmF thought to be the reason for its antimicrobial activity (21,22).

In addition, the bactericidal activity of VAN, OXA, CFT and MER was assessed. The possibility of influence of fluoride on the MBC of an antibiotic has been studied. Regarding the activity of VAN and OXA free and combined with 2mg/L of LiF against the reference strain *S. aureus* ATCC29213 and *S. aureus* 143545-2, and the activity of CFT and MER free and combined 2mg/L of LiF against the reference strain of *P. aeruginosa* ATCC27853 and *P. aeruginosa* 109530.1, the MICs were equivalent to MBC. It is interesting that the combination of LiF with VAN against *S. aureus* ATCC 29213 and *S. aureus* 143545-2 and also combinations of LiF with CFT and MER against *P. aeruginosa* ATCC27853 which had MICs below the MIC of their free form (Table I). Thus we can see the same combination to have a MBC equivalent to free antibiotics in (Table I). It seems that LiF has an influence on the bactericidal activity of antibiotics directed against the strains just as it had on the bacteriostatic activity in (Table I). Again,

there is an influence of fluoride derivatives from improving the bacteriostatic activity of antibiotics on the MBC. The same observation is made with 2 mg/L NaF combined with VAN against *S. aureus* ATCC29213. It is quite likely that the effectiveness of the associations varies among bacterial strains. If a derivative of fluoride influences the bacteriostatic activity of an antibiotic, it can also affect its bactericidal activity. Lithium exerts a synergistic effect towards fluoride by increasing the antimicrobial properties of fluoride through poorly understood mechanisms (23). Lithium is used as an adjuvant in oral vaccines and acts by increasing the properties of aluminum in these vaccines against hepatitis B (24). It would be interesting to study different combinations of antimicrobials on strains that are most common in the clinic to find which combination works best to treat them. This would ensure that the antibiotic chosen to treat an infection to a particular pathogen may be combined with the corresponding concentration of fluoride derivative to increase its effectiveness. The study of the sensitivity of a bacterial strain to an antibiotic for the determination of MIC has its challenges. The dilution of antibiotic is a time-consuming job which limits the possibilities to evaluate the effectiveness of antibiotic therapy within a reasonable time (12).

To facilitate this practice, the level of conservation of the stability of VAN, OXA, CFT and MER has been tested. Following storage at cold (4 °C) and room temperature (22°C), the sensitivity of *P. aeruginosa* ATCC 27583 and *S. aureus* ATCC 143545-2 to CFT, MER, VAN and OXA in their free and combined form with lithium fluoride and sodium fluoride was assessed (Tables II). Tables II shows that all the antibiotics used in their free form, the MIC determined remained the same for 0, 2 and 4 weeks, with $T^{\circ}=4^{\circ}\text{C}$ and 22°C . For VAN, CFT, and MER in their combined form with LiF and NaF (2mg/L), the MICs were reduced by half in early weeks, at the two different temperatures. After 2 weeks of storage, a 50% reduction in the MIC was obtained for the VAN associated with 2mg/L of LiF and the same MIC after 4 weeks for the free form and combined. While at $T^{\circ}=4^{\circ}\text{C}$ according to Table II, the MIC for VAN and CFT combined was 50% smaller. Contrary to what was observed with OXA and MER the different temperatures have not played a major role. It is possible that the concentrations of OXA and MER used in our study were too low, resulting in a loss of stability of the

antibiotic. In the future, it would be better to do more studies on this subject in order to explain this discrepancy.

In conclusion, there is an urgent need to improve current antibiotics. Advancements in research on the impact of fluoride on the activity of antimicrobial agents could potentially limit the spread of multi-resistant bacteria. In this regard, the sensitivity of bacterial species responsible for most infections with different combinations of antibiotics and derivatives of fluoride must be evaluated. The cytotoxic effect of antibiotics like VAN, OXA, CFT, and MER combined with LiF and NaF 2mg/L in vitro in our study is negligible according to the results. In the study of Time-Kill curves, viable cells were not detected at 6 to 8 hours in presence of one, two and four times the MICs determined for each of the four antibiotics VAN, OXA, CFT, and MER alone or associated with LiF and NaF (2mg/L), no viable cells were detected after 24 hours (data not shown) (14-16).

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

I want to thank the Director of the Department of Microbiology and Infectious Diseases, CHUM Hôtel Dieu Hospital, Dr. Michel Poisson, for his warm welcome. I would also like to thank Mrs Annette Hollmann for editing this manuscript.

2.7 REFERENCES

1. Jean S.S., Hsueh P.R., Antimicrobial Drug Resistance in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2011;110(1):4–13
2. Hawkey PM, Jones AM, The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10.
3. Rehm S.J., and Tice A. , *Staphylococcus aureus*: Methicillin-Susceptible *S. aureus* to Methicillin-Resistant *S. aureus* and Vancomycin-Resistant *S. aureus* . *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 15;51 Suppl 2:S176-82.
4. Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010 Jan-Feb;14(1):71-6.
5. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R, Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy.* 2005 Oct;25(10):1353-64.
6. Yoshihara E, Nakae T. Cytolytic activity of liposome containing stearylamine. *Biochimica Biophysica Acta* 1986, 854(1) : 93-101
7. Parenham MJ & Wetzig H., Toxicity screening of liposomes. *Chem and Phys lipids* 1993, 64(1-3): 263-274.
8. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth information supplement. M100-S16. 2007 Jan., 26 (3).
9. Piccoli L., Larosa M., and Marchetti F. Time –Kill curves as a tool for targeting ceftazidime serum concentration during continuous infusion. *J Antimicrob Chemother* 2003 Dec;52(6):1047-8.

10. Ismail, A.I. et Hasson, H. Fluoride supplements, dental caries and fluorosis: a systematic review. *J Am Den Associ*, Nov. 2008, 139 (11), pp.1457-68.
11. Furuya, E.Y. et Lowy, F.D.. Antimicrobial-resistant bacteria in a community setting. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jan;4(1):36-45.
12. Massoni-Cristante, S., Loiez C., Adriensen B. et Husson M.O. Mise au point d'une méthode de mesure d'associations d'antibiotiques bactéricides par superposition de bandelettes E-test appliquée aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au cours de la mucoviscidose. *Patho Bio*, 2003, Avr., 51 (3), pp.135-42.
13. Duckworth RM. The science behind caries prevention. *Int Dent J*. 1993 Dec; 43 (6 Suppl 1):529-39.
14. Garrigos C., Murillo O., Euba G., Verdaguer R., Tubau F., Cabellos C., Cabo J., and Ariza J., Efficacy of Usual and High Doses of Daptomycin in Combination with Rifampin versus Alternative Therapies in Experimental Foreign-Body Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec; 54(12):5251-6.
15. Joukhadar C., Pillai S., Wennersten C., Moellering R.C., Eliopoulos G.M., Lack of Bactericidal Antagonism or Synergism In Vitro between Oxacillin and Vancomycin against Methicillin-Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):773-7.
16. Liang W, Liu XF, Huang J, Zhu D, Li J, Zhang J, Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 2011, 11:109
17. Carpousis, A.J., The RNA degradosome of E.coli: An mRNA degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol*. 2007, 61, 71-87.

18. Cimasoni, G., The inhibition of enolase by fluoride in vitro. *Caries Res.* 1972; 6(2): 93-102.
19. Terrier B., Degand N., Guilpain P., Servettaz A., Guillevin L., Mouthon L., Alpha-enolase: A target of antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Autoimm. Rev.* 2007, 6(3), 176-182.
20. Commichau, F.M., Rothe, F.M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Völker, U., Stülke, J., Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Jun;8(6):1350-60.
21. Van Loveren, C., Antimicrobial activity of fluoride and its in vitro importance: identification of research questions. *Caries Res.* 2001; 35 Suppl 1: 65-70.
22. Shani, S., Friedman, M., Steinberg, D., Relation between surface activity and antibacterial activity of amine-fluorides. *Int. J. Pharm.* 1996, 131, 33-39.
23. Treasure P, Effects of fluoride, lithium and strontium on extracellular polysaccharides production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.* 1981, 60, 1601-1610.
24. Kuriyama, S., Tsujii, T., Ishizaka, S., Kikuchi, E., Kinoshita, K., Nishimura, K., Kitagami, K., Yoshikawa, M., Matsumoto, M., Enhancing effects of oral adjuvants on anti-HB responses induced by hepatitis B vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 1988, 72(3), 383-389.

25. Maehara, H., Iwami, Y., Mayanagi, H., Takahashi, B., Synergistic inhibition by combination of fluoride and xylitol on glycolysis by mutans streptococci and its biochemical mechanism. *Caries Res.* 2005, 39(6), 521-528.

26. Buzalaf MA., Pessan JP., Honório HM., Cate JM., Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr oral sci.* 2011;22:97-114.

2.8 TABLES

Table I. In vitro bacteriostatic (MIC) and bactericidal (MBC) activities of antibiotics free and combined with lithium fluoride and sodium fluoride (2mg/L) against *S.aureus* ATCC29213, *S. aureus* 143545-2, *P. aeruginosa* ATCC27853 and *P.aeruginosa* 109530.1

Microorganisms	Abs	Break point	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			MBC ($\mu\text{g/mL}$)		
			Ab free	Ab+ LiF(2mg/L)	Ab+ NaF(2mg/L)	Ab free	Ab+ LiF(2mg/L)	Ab+ NaF(2mg/L)
<i>S.a</i> (ATCC 29213)	VAN	≤ 2.00	1.00	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00
	OXA	≤ 2.00	0.50	0.50	1.00	0.50	0.50	UD
<i>S.a</i> (143545-2)	VAN	UD	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00
	OXA	≥ 4.00 ≥ 0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	UD
<i>P.a</i> (ATCC27853)	CFT	≤ 8.00	4.00	2.00	4.00	4.00	4.00	UD
	MER	≤ 4.00	0.50	0,25	0,25	0.50	0.50	UD
<i>P.a</i> (109530,1)	CFT	≥ 32.0	32.0	32.0	64.0	64.0	64.0	64.0
	MER	≥ 16.0	16.0	16.0	32.0	32.0	32.0	UD

S.a, *Staphylococcus aureus* ; *P.a*, *Pseudomonas aeruginosa* ; **Ab**, antibiotic ; **MIC**, minimum inhibitory concentration; **MBC**, minimum bactericidal concentration; **LiF**, lithium fluoride; **NaF**, sodium fluoride; **VAN**, vancomycin ; **OXA**, oxacillin ; **CFT**, ceftazidime ; **MER**, meropenem ; **UD**, undetermined

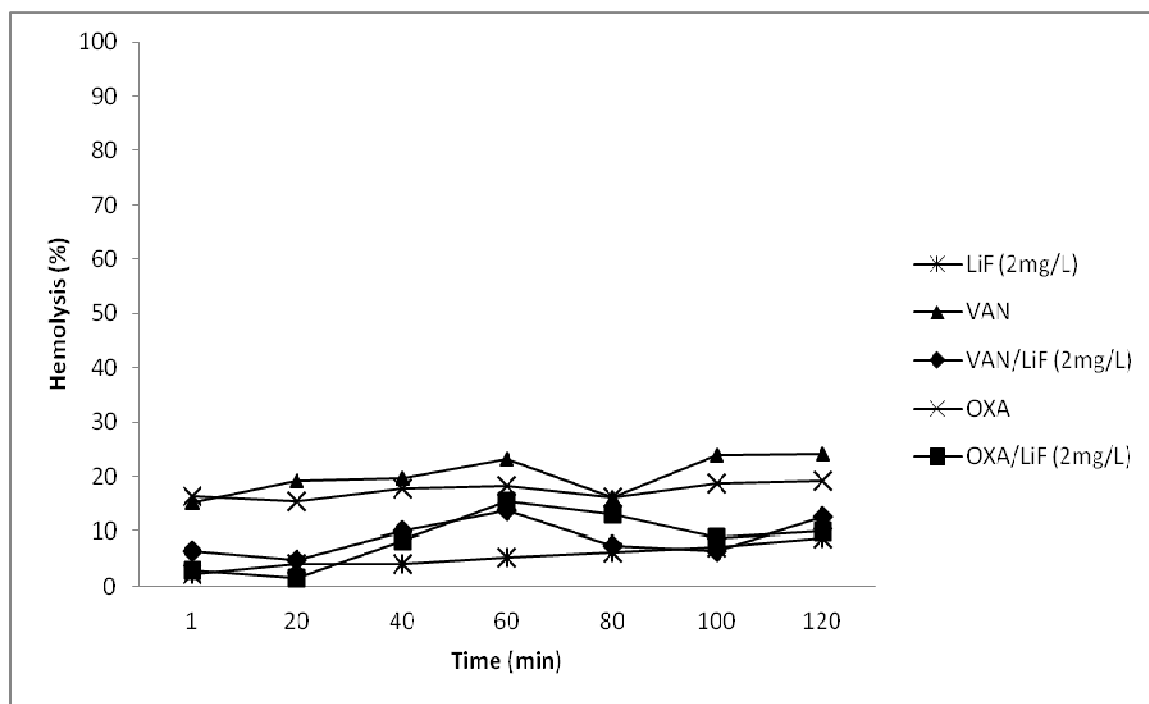
Table II. Influence of storage time at 4°C and 22°C on the activity of antibiotics free and associated with fluoride derivatives determined by their MIC against *P.aeruginosa* ATCC27583 and *S. aureus* ATCC29213

Weeks of storage	Content of the wells	MIC (µg/ml) VAN		MIC (µg/ml) OXA		MIC (µg/ml) CFT		MIC (µg/ml) MER	
		4°C	22°C	4°C	22°C	4°C	22°C	4°C	22°C
0	Ab free	1.00	1.00	0.50	0.50	4.00	4.00	0.50	0.50
	Ab+LiF (2mg/L)	0.50	0.50	0.50	0.50	2.00	2.00	0.25	0.25
	Ab+NaF (2 mg/L)	0.50	0.50	1.00	1.00	4.00	4.00	0.25	0.25
2	Ab free	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	0.50	0.50
	Ab+LiF (2 mg/L)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.50	0.50
	Ab+NaF (2 mg/L)	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	0.50	0.50
4	Ab free	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.00
	Ab+LiF (2 mg/L)	1.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Ab+NaF (2 mg/L)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.00

P.a, *Pseudomonas aeruginosa* ; *S.a*, *Staphylococcus aureus* ; MIC, minimum inhibitory concentration; VAN, vancomycin ; OXA , oxacillin ; MER, meropenem ; CFT, ceftazidime ; Ab, antibiotic; LiF, lithium fluoride; NaF, sodium fluoride ;

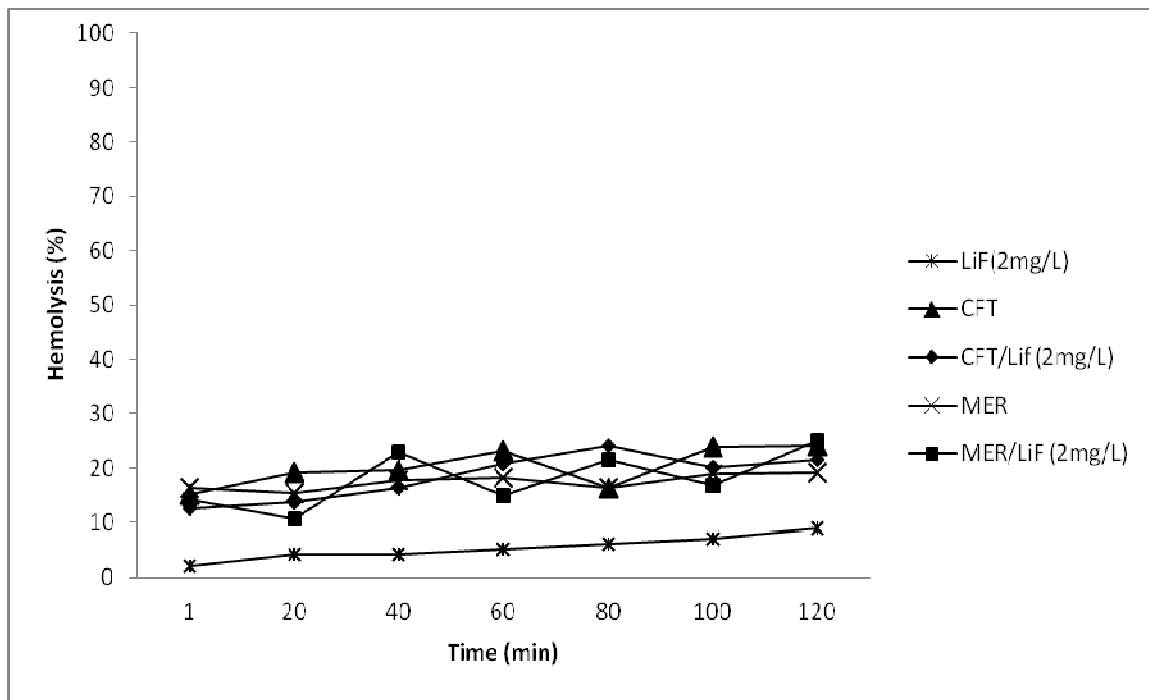
2.9 FIGURES

Figure 1. Hemolysis percentage of human blood by free VAN or OXA and combined with LiF (2mg/L)

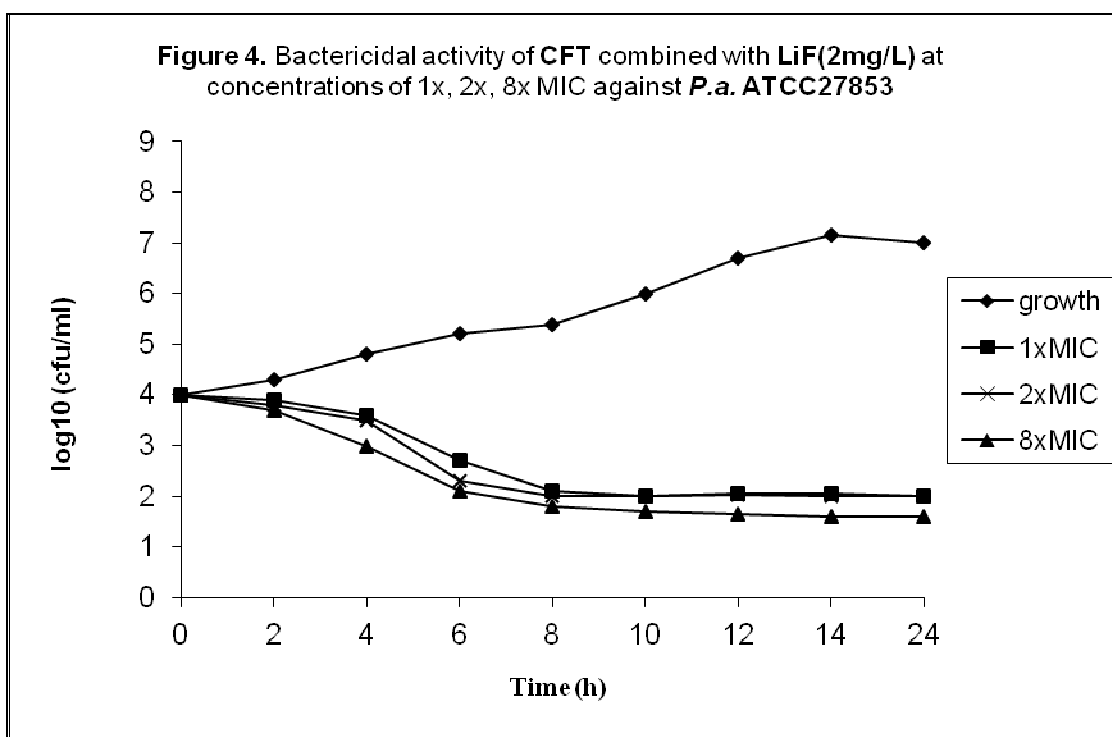
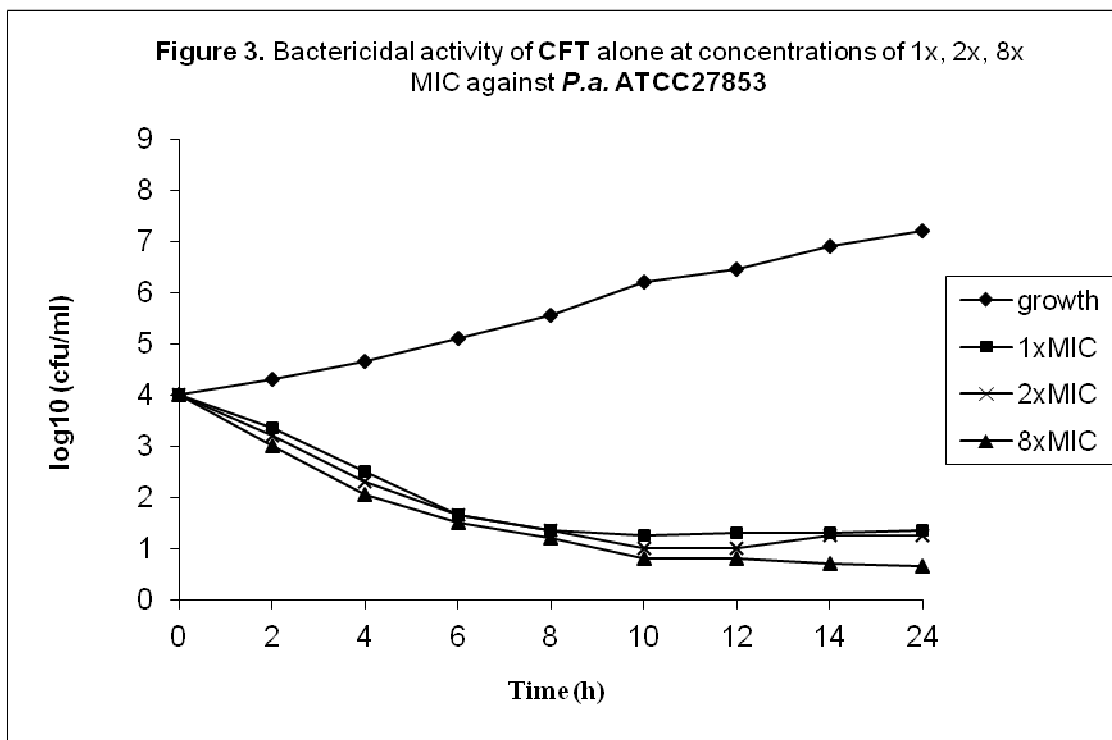


VAN, vancomycin; **OXA**, oxacillin; **LiF**, lithium fluoride; **MIN**, minute

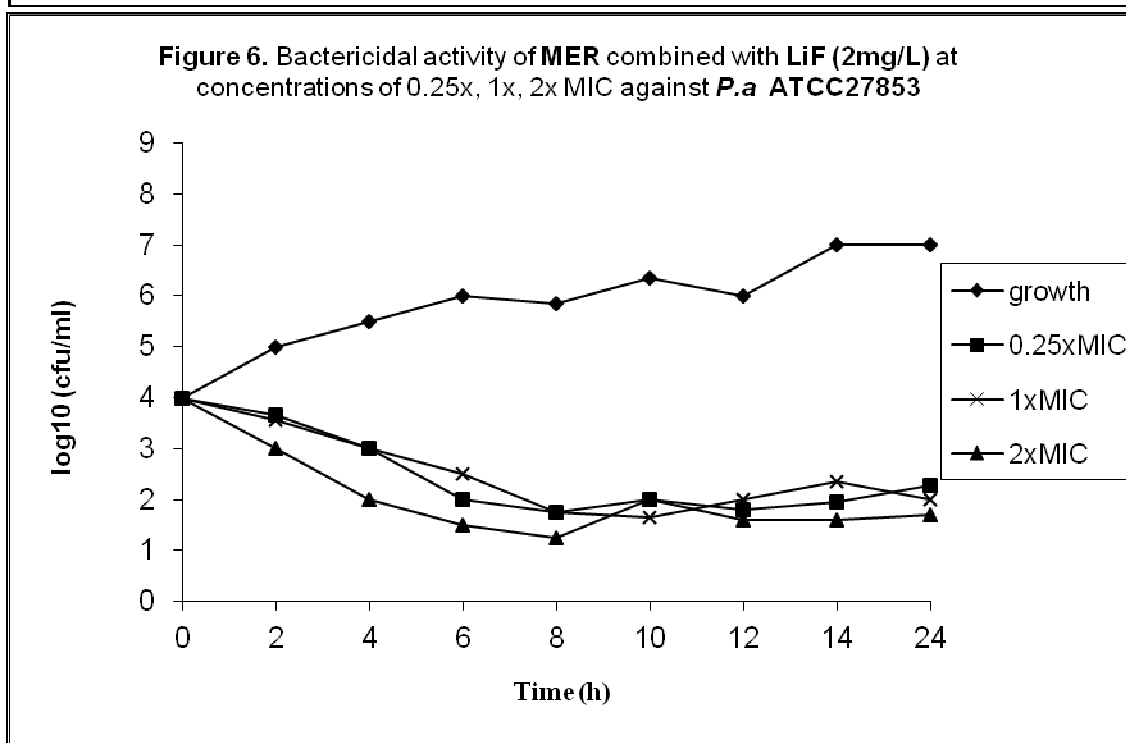
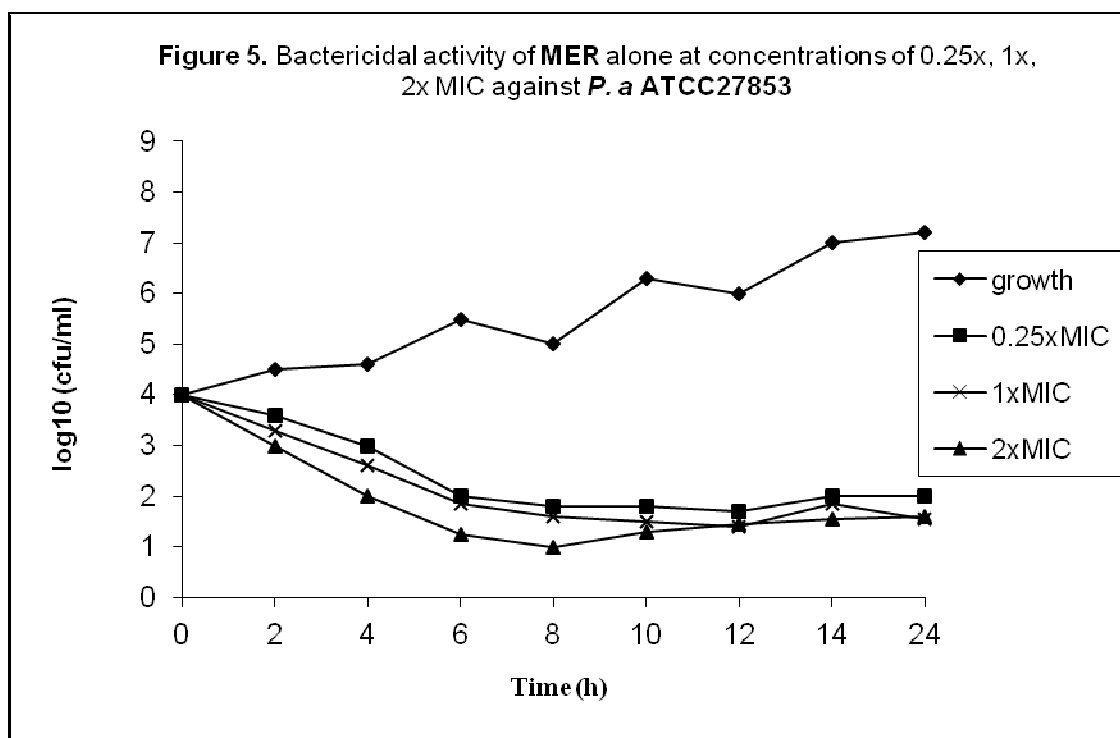
Figure 2. Hemolysis percentage of human blood by free CFT or MER and combined with LiF (2mg/L)



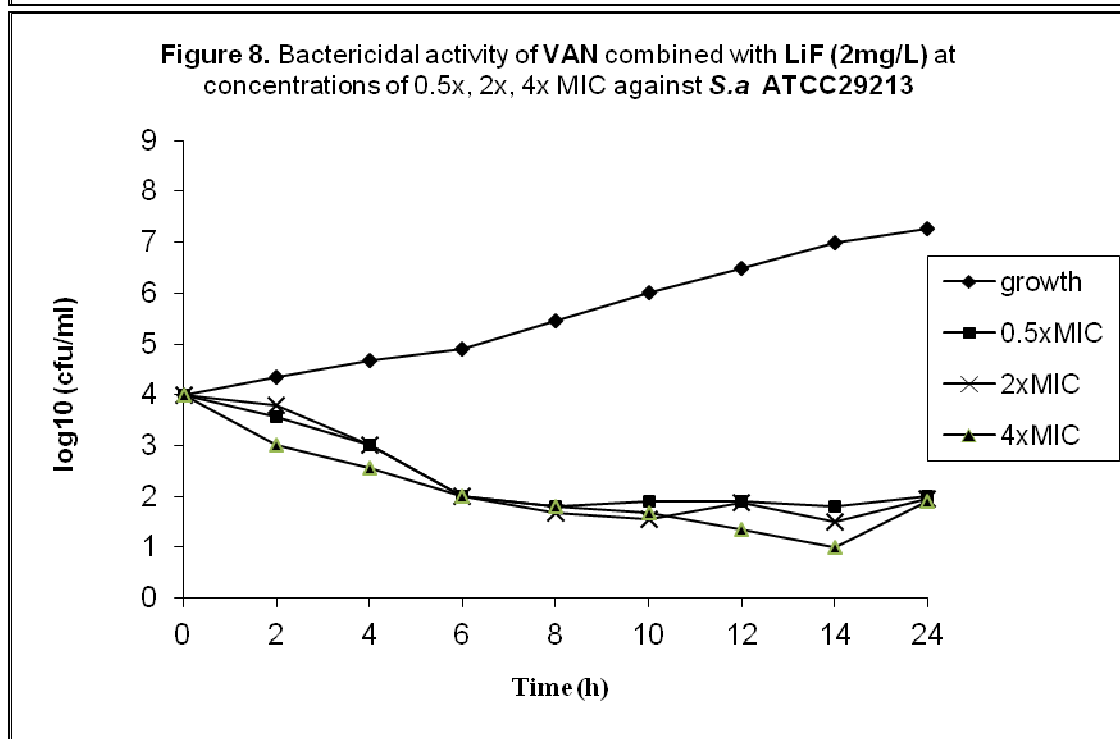
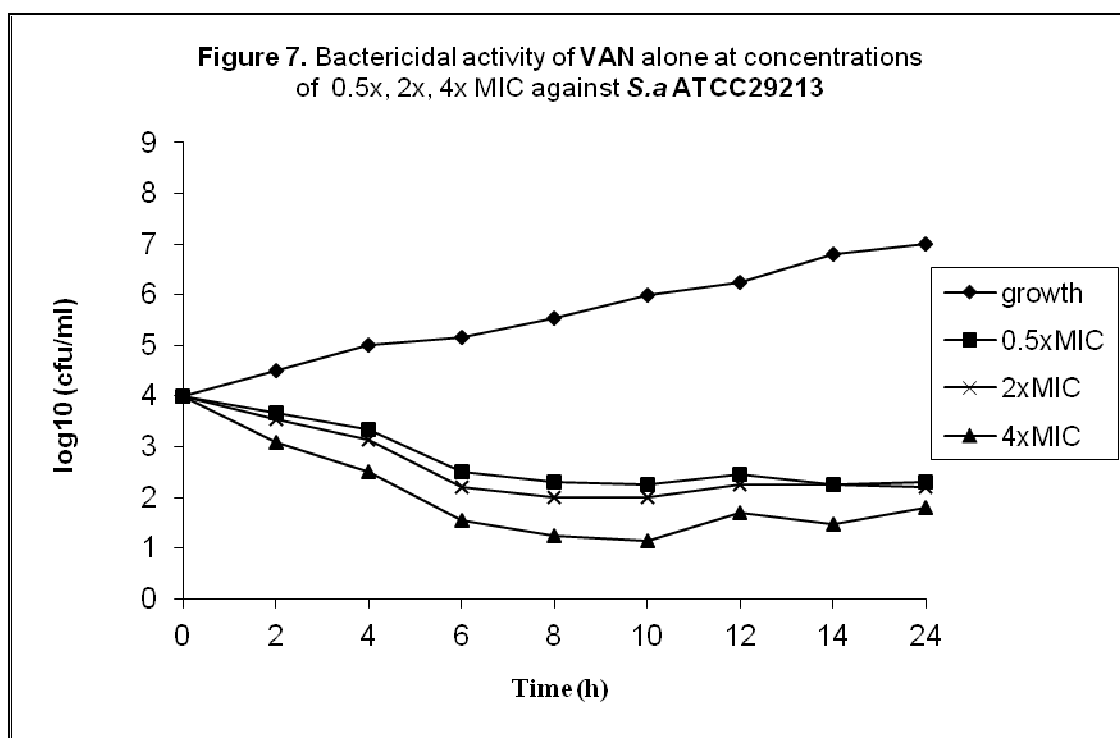
CFT, ceftazidime; MER, meropenem; LiF, lithium fluoride; MIN, minute;



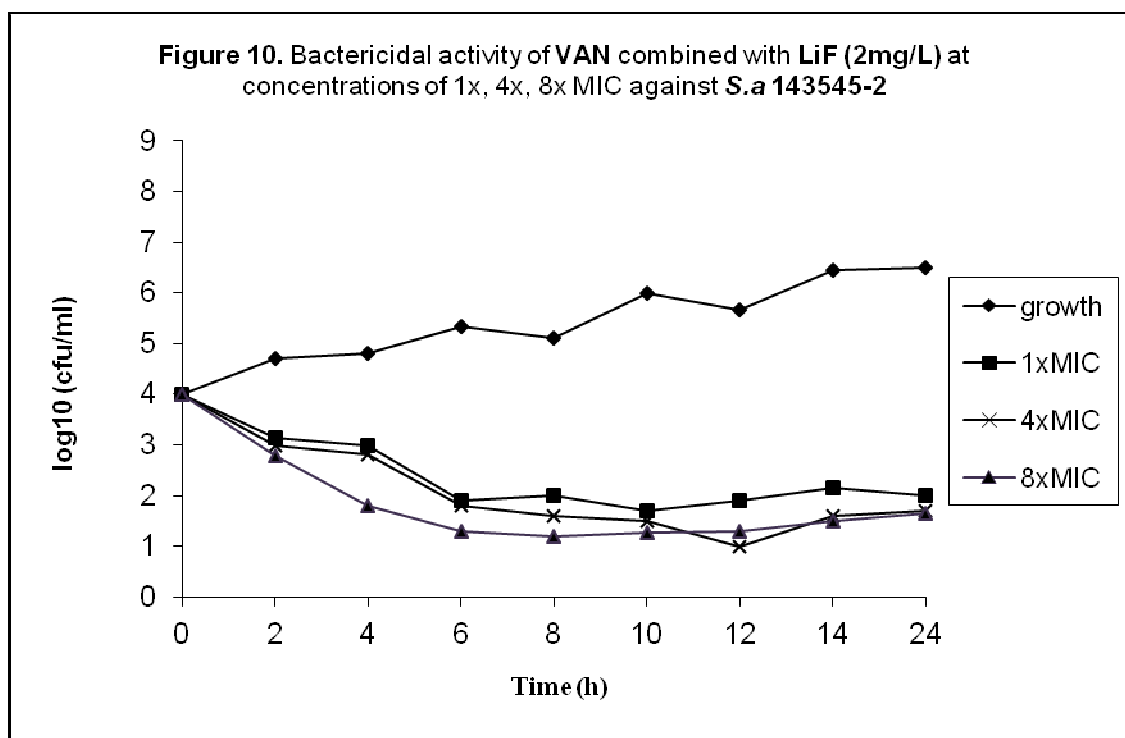
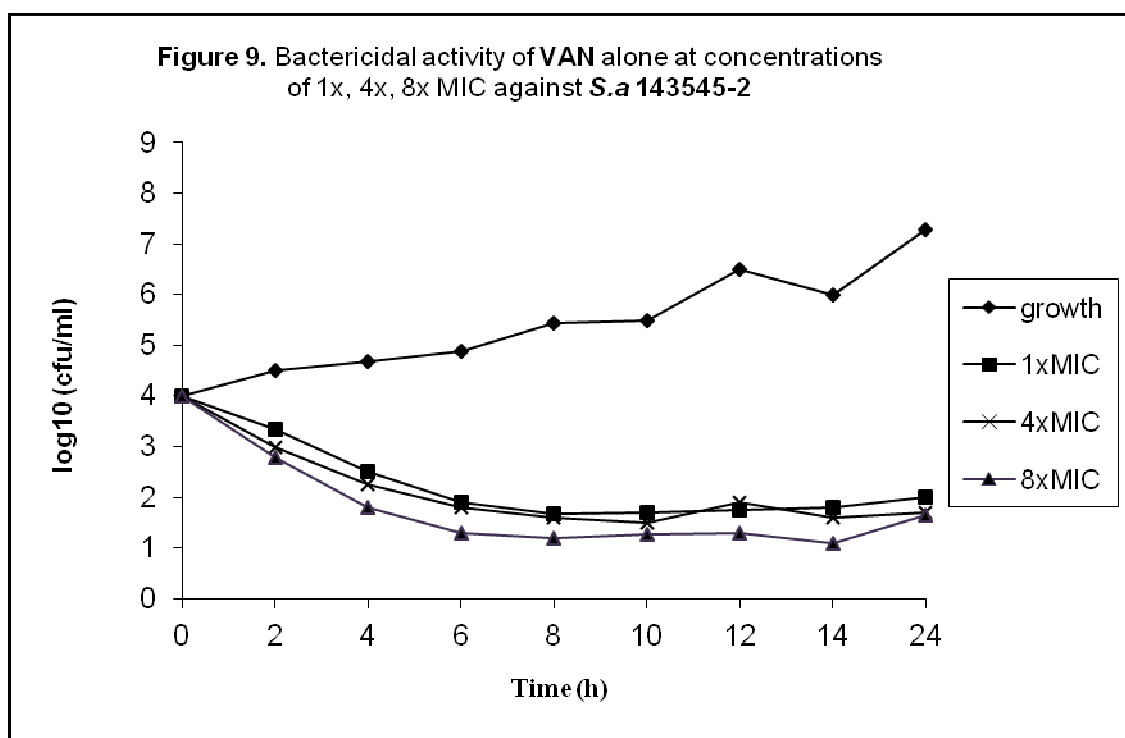
MIC, minimum inhibitory concentrations; ***P.a.***, *Pseudomonas aeruginosa*; **CFT**, ceftazidim; **LiF**, lithium fluoride; **h**, hour;



MIC, minimum inhibitory concentrations; *P.a.*, *Pseudomonas aeruginosa*; MER, meropenem; LiF, lithium fluoride; h, hour;



MIC, minimum inhibitory concentrations; ***S.a.***, *Staphylococcus aureus*; **VAN**, vancomycin ; **LiF**, lithium fluoride; **h**, hour;



MIC, minimum inhibitory concentrations; *S.a.*, *Staphylococcus aureus*; VAN, vancomycin ; LiF, lithium fluoride; h, hour;

TROISIÈME PARTIE :
DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

3.1 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La pharmacorésistance disséminée des souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est un problème grave dans le contexte clinique et santé de la communauté. Il est donc important de trouver des combinaisons actives d'antibiotiques qui pourraient être efficaces dans le traitement des infections causées par cette problématique «super bactérie». Dans cette étude, nous avons analysé les activités in vitro de deux dérivés de fluorure LiF et NaF (2mg/L) combinés aux antibiotiques VAN, OXA, CFT, et MER contre les souches cliniques résistantes.

Le fluorure comme agent antimicrobien utilisé dans le domaine de la médecine dentaire où il a d'abord été observé que le fluorure a arrêté la croissance des Streptocoques cariogènes en inhibant l'enzyme glycolytique émolase. Le fluorure inhibe l'émolase, une enzyme glycolytique codé par un gène essentiel et hautement conservé entre différentes formes de vie: de archaebactéries et eubactéries aux parasites et mammifères (Carpousis, 2007; Cimasoni,1972). L'émolase est une protéine qui a été démontré à jouer un rôle dans l'adhésion et dans la régulation des gènes (Terrier et al, 2007;. Commichau et al, 2009). Lorsqu'il est utilisé en thérapie de combinaison, le fluorure est le plus souvent associé aux cations qui augmentent ses propriétés antimicrobiennes. Différents cations fonctionnent comme adjuvants pour augmenter l'activité antimicrobienne de fluorure à des degrés variable (Van Loveren, 2001). Par ailleurs, le lithium exerce un potentiel adjuvant pour le fluorure en augmentant les propriétés antimicrobiennes de fluorure par des mécanismes mal connus (Treasure, 1981). Le lithium a été utilisé comme adjuvant dans les vaccins oraux contre l'hépatite B et agit en augmentant les propriétés de l'aluminium dans les vaccins (Kuriyama et al., 1988).

Une étude menée par (Maehara et al., 2005) ont démontré que le fluorure et le xylitol agissent en synergie pour supprimer le métabolisme du sucre dans les *Streptocoques mutans* conduisant à une croissance réduite de ces organismes.

Les interactions entre l'énolase et RNAses putatifs impliqués dans la dégradation de l'ARNm en *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pyogenes* ont été rapportés suggérant un rôle dans la régulation des gènes pour l'énolase (Commichau et al, 2009; Kang et al, 2010).

Parce qu'une réduction de la CMI de la vancomycine associée à LiF contre *S. aureus* a été observée. Nous croyions que l'inhibition de l'énolase par LiF interfère aux mécanismes de régulation des gènes dans *S. aureus*. Bien qu'aucune interaction n'a pas été rapportée entre l'ARNases putatifs impliqués dans la dégradation de l'ARNm et l'énolase de *S. aureus*, (Anderson et Dunnman,2009).

Notre recherche indique que des combinaisons telles que les LiF et NaF /vancomycine, les LiF et NaF /oxacilline, les LiF et NaF /ceftazidime, et les LiF et NaF /méro-pénème sont synergiques in vitro contre les souches *S.aureus* ATCC29213 , *S.aureus* 143545-2, *P.aeruginosa* ATCC27853 et *P.aeruginosa* 109530,1. La combinaison des dérivés de fluorure aux antibiotiques pourrait être une option alternative au traitement des infections causées par *S.aureus* et *P.aeruginosa*.

En conclusion, l'activité bactéricide de la VAN, OXA, CFT, et MER respectivement combinée aux dérivés de fluorure in vitro a montré des bénéfices par rapport à l'efficacité du médicament seul contre les bactéries. Sachant que l'efficacité des antibiotiques combinés est supérieure à celle des antibiotiques seuls, ils pourraient être utilisés pour traiter les souches résistantes de *S. aureus* et *P.aeruginosa* retrouvées chez les patients atteints de maladies infectieuses.

3.2 PERSPECTIVES

Bien que des études in vitro aient besoin d'être confirmées par des résultats des études in vivo, les données obtenues soutiennent l'utilisation des dérivés de fluorure combinés avec des antimicrobiens, y compris les LiF et NaF et les VAN, OXA, CFT, et MER dans le traitement des infections, potentiellement dues par des souches résistantes aux antimicrobiens, limitant le développement de leurs effets nocifs et indésirables. Ainsi, l'index thérapeutique des antibiotiques pourrait être amélioré et moins de toxicité serait occasionnée.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Dia Compli* 2005; 19(3): 138-41.

Afessa B, Green B. Bacterial pneumonia in hospitalized patients with HIV infection: the Pulmonary Complications, ICU Support, and Prognostic Factors of Hospitalized Patients with HIV(PIP) Study. *Chest* 2000; 117(4): 1017-22.

Afessa B, Green W, Chiao J, Frederick W. Pulmonary complications of HIV infection: autopsy findings. *Chest* 1998; 113(5): 1225-9.

Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun* 1998; 66(3):1000–1007.

Borriello G, Richards L, Ehrlich GD, and Stewart PS, Arginine or Nitrate Enhances Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob agents and Chemother*, Jan. 2006, 50(1):382–384

Boucher HW, Corey GR, Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Clin Infect Dis* 2008; 1;46 Suppl 5:S344-9.

Bouza E, San Juan R, Muñoz P, Voss A, Kluytmans J; A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Oct;7(10):523-31.

Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001 Feb 1;183(3):444-52.

Buzalaf MA., Pessan JP., Honório HM., Cate JM., Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr oral sci.* 2011;22:97-114.

Cao J, Doyle R.J. , Fluoride modifies adhesion of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 Jan 14;32(2):175-7.

Carpousis, A.J., The RNA degradosome of E.coli: An mRNA degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 2007, 61, 71-87.

Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010 Jan-Feb;14(1):71-6.

Cauley JA, Murphy PA, Riley TJ, Buhari AM. Effects of fluoridated drinking water on bone mass and fractures: The study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1995 Jul;10(7):1076-86.

Chambers HF, DeLeo FR, Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(9):629–41

Chambers HF. Methicillin-resistant *staphylococci*. *Clin Microbiol Rev.* 1988 Apr; 1(2): 173-86.

Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Rolston KV, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: retrospective analysis of 245 episodes. *Arch Intern Med.* 2000 Feb 28;160(4):501-9.

Cimasoni, G., The inhibition of enolase by fluoride in vitro. *Caries Res.* 1972;6(2):93-102.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth information supplement. M100-S16. 2006 Jan., 26 (3).

Commichau, F.M., Rothe, F.M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Völker, U., Stülke, J., Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. interactions with essential proteins involved in mRNA processing. Mol Cell Proteomics. 2009 Jun;8(6):1350-60.

DeLeo FR, Chambers HF, Reemergence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. J Clin Invest. 2009 Sep;119(9):2464-74.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2008 Dec;8(6):747-63.

Dhar V, Bhatnagar M, Physiology and toxicity of fluoride. Indian J Dent Res. 2009 20 (3): 350-355

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1):16–34.

Donlan RM, and Costerton JW, Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002 Apr;15(2):167-93.

Driscoll JA, Brody SL and Kollef MH, The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections Drugs 2007; 67 (3): 351-368

Duckworth RM. The science behind caries prevention. Int Dent J. 1993 Dec;43(6 Suppl 1):529-39.

Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy MÉ, Tristan A, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010. *Med Sci (Paris)*. 2010 Nov;26(11):943-9.

Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16792-7.

Foster TJ, Immune Evasion by Staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(12):948–58.

Frank DW. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 1997 Nov;26(4):621-9.

Funada H, Matsuda T. Changes in the incidence and etiological patterns of bacteremia associated with acute leukemia over a 25-year period. *Intern Med*. 1998 Dec; 37 (12): 1014-8.

Furuya, E.Y. et Lowy, F.D.. Antimicrobial-resistant bacteria in a community setting. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jan;4(1):36-45.

Garrigos C., Murillo O., Euba G., Verdaguer R., Tubau F., Cabellos C., Cabo J., and Ariza J., Efficacy of Usual and High Doses of Daptomycin in Combination with Rifampin versus Alternative Therapies in Experimental Foreign-Body Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec; 54(12):5251-6.

Gaynes R, Edwards JR, Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 15;41(6):848-54.

Gladstone GP, Van Heyningen WE. Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol* 1957; 38(2):123-37.

Gonzalez BE, Mon RA, *Staphylococcus aureus* infections in adolescents. *Adolesc Med State Art Rev*. 2010 Aug;21(2):318-31, x.

Gordon RJ, and Lowy FD, Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 1;46 Suppl 5:S350-9.

Gordon SL, Corbin SB. Summary of workshop on drinking water fluoridation influence on hip fracture on bone health. (National Institutes of Health, 10 April, 1991) *Osteoporos Int*. 1992 May;2(3):109-17.

Hagens S, Habel A, and Bläsi U, Augmentation of the Antimicrobial Efficacy of Antibiotics by Filamentous Phage. *Microb Drug Resist* 2006; 12(3):164-8

Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*. 1990 Feb; 69 Spec No:660-7;

Harbarth S, Ferrière K, Hugonnet S, Ricou B, Suter P, Pittet D, Epidemiology and Prognostic Determinants of Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care. *Arch Surg*. 2002 Dec;137(12):1353-9;

Hawkey PM, Jones AM, The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10.

Hawkey PM, The growing burden of antimicrobial resistance. *J of Antimicrob Chemother* 2008 62, Suppl. 1, i1-i9

Holder IA, Neely AN, Frank DW. PcrV immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Infect Immun* 2001;69(9):5908–5910.

Iroha, I. R, Esimone, C. O., Orji J. O. and Imomoh, O. O. , Antibacterial efficacy of colloidal silver alone and in combination with other antibiotics on isolates from wound Infections. *Scientific Research and Essay*, 2007 Vol. 2 (8), pp. 338-341,

Ismail, A.I. et Hasson, H. Fluoride supplements, dental caries and fluorosis: a systematic review. *J Am Dent Associ*, Nov. 2008, 139 (11), pp.1457-68.

Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Melton LJ . Hip fracture incidence before and after the fluoridation of the public water supply, Rochester, Minnesota. *Am J Public Health* 1993;83(5):743-5.

Jean S.S., Hsueh P.R., Antimicrobial Drug Resistance in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2011;110(1):4–13

Jodra VM, Diaz-Agero Pérez C, Sainz de los Terreros Soler L, Maria Saa Requejo C, Dacosta Ballesteros D, Results of the Spanish national nosocomial infection surveillance network (VICONOS) for surgery patients from January 1997 through December 2003. *Am J Infect Control*. 2006 Apr;34(3):134-41.

Jones RN, Low DE, and Pfaller MA, Epidemiologic trends in nosocomial and community- acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: The role of streptogramins and other newer compounds. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33 (2): 101–112

Jones RN, Resistance Patterns Among Nosocomial Pathogens Trends Over the Past Few Years. *Chest*. 2001 Feb;119(2 Suppl):397S-404S.

Joukhadar C., Pillai S., Wennersten C., Moellering R.C., Eliopoulos G.M., Lack of Bactericidal Antagonism or Synergism In Vitro between Oxacillin and Vancomycin against Methicillin-Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Feb;54(2):773-7.

Juhas M, Eberl L, Tummler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ Microbiol 2005;7(4):459–471.

Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1998; 177(4):1023–9.

Karagas MR, Baron JA, Barrett JA, Jacobsen SJ. Patterns of fracture among the United States elderly: Geographic and fluoride effects. Ann Epidemiol 1996;6(3):209-16

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J, Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect 2006; 36(2): 78–91.

Klastersky J, Ameye L, Maertens J, Georgala A, Muanza F, Aoun M, Ferrant A, Rapoport B, Rolston K, Paesmans M. Bacteremia in febrile neutropenic cancer patients. Int J Antimicrob Agents. 2007 Nov;30 Suppl 1:S51-9

Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, and Johannes RS, Epidemiology and Outcomes of Health-care–Associated Pneumonia Results From a Large US Database of Culture-Positive Pneumonia. Chest 2005;128(6);3854-3862

Kuriyama, S., Tsujii, T., Ishizaka, S., Kikuchi, E., Kinoshita, K., Nishimura, K., Kitagami, K., Yoshikawa, M., Matsumoto, M., Enhancing effects of oral adjuvants on anti-HB responses induced by hepatitis B vaccine. Clin. Exp. Immunol. 1988, 72(3), 383-389.

Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. J Infect Dis. 2003 May 1;187(9):1452-9.

Leclercq R, Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. Clin Microbiol Infect 2009; 15(3): 224–231

Lee WI, Jaing TH, Hsieh MY, Kuo ML, Lin SJ, Huang JL. Distribution, infections, treatments and molecular analysis in a large cohort of patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs) in Taiwan. J Clin Immunol 2006; 26(3): 274-83.

Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. FEMS Microbiol Rev. 2006 Sep;30(5):673-91.

Maehara, H., Iwami, Y., Mayanagi, H., Takahashi, B., Synergistic inhibition by combination of fluoride and xylitol on glycolysis by mutans streptococci and its biochemical mechanism. Caries Res. 2005, 39(6), 521-528.

Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV., Page`s JM, Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. J of Antimicrob Chemothe 2007 59(6), 1223–1229

Malachowa N, DeLeo FR, Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. 2010; 67(18): 3057–3071

Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. AmJ Respir Cell Mol Biol 2003; 28(4): 528-37

Marinho V.C.C. Evidence-based Effectiveness of Topical Fluorides Adv Dent Res 2008 20(1):3-7

Massoni-Cristante, S., Loiez C., Adriensen B. et Husson M.O. Mise au point d'une méthode de mesure d'associations d'antibiotiques bactéricides par superposition de bandelettes E-test appliquée aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au cours de la mucoviscidose. Patho Bio, 2003, Avr., 51 (3), pp.135-42.

McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol 2001; 55:77-104.

Mellberg JR, Ripa LW. Fluoride metabolism. Fluorides in Preventive Dentistry-Theory and clinical Applications. Quintessence Publishing Co Limited; 1983. p. 81-102.

Mesaros, N., Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens P. M., and Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 2007, 241 13(6):560-78.

Morell E.A, Balkin D.M, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Pervasive Pathogen Highlights the need for new Antimicrobial development. Yale J OF Bio and Med 2010 ; 83(4), pp.223-233.

National Research Council. Health effects of ingested fluoride. Report of the Subcommittee on Health Effects of Ingested Fluoride. Washington, DC: National Academy Press;1993.

Newbrun E, Topical Fluorides in Caries Prevention and Management: A North American Perspective, J Dent Educ. 2001; 65(10): 1078-83.

Newbrun E. What we know and do not know about fluoride. *J Public Health Dent.* 2010; 70(3):227-33.

Nielsen FH, Micronutrients in Parenteral Nutrition: Boron, Silicon, and Fluoride. *Gastroenterology* 2009; 137(5 suppl): S55–S60

Nikaido H: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, 67(4):593-656.

Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R, Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacother.* 2005 Oct;25(10):1353-64.

O’Riordan k, and Lee JC, *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microb Rev*, Jan. 2004;17(1): 218–234

Osmon S, Ward S, Fraser VJ and Kollef MH, Hospital Mortality for Patients With Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2004; 125(2); 607-616

O’Toole GA, Kolter R., Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol* 1998;30(2):295–304.

Otter JA, French GL, Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010;10(4): 227–39

Parham MJ & Wetzig H., Toxicity screening of liposomes. *Chem and Phys lipids* 1993, 64(1-3): 263-274.

Piccoli L., Larosa M., and Marchetti F. Time–Kill curves as a tool for targeting ceftazidime serum concentration during continuous infusion. *J Antimicrob Chemother* 2003 Dec;52(6):1047-8.

Poole K, Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann of Med* 2007 39(3): 162–176.

Prevost G, Couppie P, Monteil H. Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(2):71–6

Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997: 55–81.

Rehm S.J., Tice A. , *Staphylococcus aureus*: Methicillin-Susceptible *S. aureus* to Methicillin-Resistant *S. aureus* and Vancomycin-Resistant *S. aureus* . *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 15;51 Suppl 2:S176-82.

Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 2002; 122(6): 2115-21,

Rice LB, Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *ajic*. 2006; 34 (5suppl 1): S11-9

Rice L.B., Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Cleve Clin J Med*. 2007; 74 • supplement 4:S12-20.

Rice LB, The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin in Microbiol* 2009, 12(5):476–481

Rice LB: The Maxwell Finland Lecture: for the duration-rational antibiotic administration in an era of antimicrobial resistance and *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2008, 46(4):491-496.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, Nosocomial Infections in Pediatric Intensive Care Units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics* 1999;103(4);e39

Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12): 3926–34.

Rolston K.V.I, New antimicrobial agents for the treatment of bacterial infections in cancer patients. *Hematol Oncol* 2009; 27(3): 107–114

Rossolini GM, Mantengoli E, Montagnani F, Pollini S, Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. *Curr Opin Microbiol* 2010, 13(5):582–588

Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, and Prince AS, Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(11): 1209–1223.

Saiman L., Clinical utility of synergy testing for multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: ‘the motion for’. *Pediatr Respir Rev*.2007; 8(3): 249–255

Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 2002; 46(1): 157-68

Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Björck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog* 2003; 34(1): 47-55

Shani S., Friedman M., Steinberg D., Relation between surface activity and antibacterial activity of amine-fluorides. *Int. J. Pharm.*1996, 131, 33-39.

Shankar EM, Mohan V, Premalatha G, Srinivasan RS, Usha AR. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *Eur J Intern Med* 2005; 16(8): 567-70.

Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 2004;72(12):6969–6977.

Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care*. 2008;12 Suppl 4:S4.

Slama TG, Clinical review: Balancing the therapeutic, safety, and economic issues underlying effective antipseudomonal carbapenem use. *Crit Care*. 2008; 12(5): 233.

Suarez-Almazor ME, Flowerdew G, Saunders LD, Soskolne CL, Russell AS. The fluoridation of drinking water and hip fracture hospitalization rates in two Canadian communities. *Am J Public Health* 1993;83(5):689-93.

Sun Q, Liang X, Zheng Q, Liu W, Xiao S, Gu W, Lu H, High Efficacy of 14-Day Triple Therapy-Based, Bismuth-Containing Quadruple Therapy for Initial *Helicobacter pylori* Eradication. Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter*2010 15(3): 233–238

Arias CA, Quintero G, Vanegas BE, Rico CL, Patiño JF. Surveillance of Surgical Site Infections: Decade of Experience at a Colombian Tertiary Care Center. *World J. Surg.* 2003; 27(5), 529–533

Taneja N, Emmanuel R, Chari PS, Sharma M, A prospective study of hospital-acquired infections in burn patients at a tertiary care referral centre in North India. *Burns* 2004; 30(4):665–669

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006 Jun; 119(6suppl 1): S3–S10.

Terrier B., Degand N., Guilpain P., Servettaz A., Guillevin L., Mouthon L., Alpha-enolase: A target of antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Autoimm. Rev.* 2007, 6(3), 176-182.

Thongboonkerd V, Luengpailin J, Cao J, Pierce WM, Cai J, Klein JB, and Doyle R. J., Fluoride Exposure Attenuates Expression of *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors. *J Biol Chem* 2002; 277 (19): 16599–16605

Treasure, P., Effects of fluoride, lithium and strontium on extracellular polysaccharides production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.* 1981, 60, 1601-1610.

US Department of Health and Human Services. Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States. Washington, DC: US Government Printing Office, MMWR Recomm Rep. 1994; 15;43(RR-5):1-18.

Van Belkum A, Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19(4):339–344

Van Loveren, C., Antimicrobial activity of fluoride and its in vitro importance: identification of research questions. *Caries Res.* 2001; 35 Suppl 1: 65-70.

Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, and Rello J, *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies *Crit Care Med.* 2009 May ; 37(5): 1777–1786.

Vidal F, Mensa J, Martinez JA, Almela M, Marco F, Gatell JM, Richart C, Soriano E, Jiménez de Anta MT. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(7): 473-7.

Liang W, Liu XF, Huang J, Zhu D, Li J, Zhang J, Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 2011, 11:109

Weems JJ Jr. The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgrad Med.* 2001 Oct;110(4):24-6, 29-31, 35-6.

Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(3):416–420

Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 2008 Nov 20;13(47).

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16 Rev 2:1-153.

Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res* 1990;69:539-49.

Wieganda A, Buchalla W, Attin T, Review on fluoride-releasing restorative materials—Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007; 23(3): 343–362

Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* 2003; 36(9): 1103–1110.

Yildirim S, Nursal TZ, Tarim A, Torer N, Noyan T, Demiroglu YZ, Moray G, Haberal M. et al. Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care units, and the hospital services unit of a single center. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26(6):488-92.

Yoshihara E, Nakae T, Cytolytic activity of liposome containing stearylamine. *Biochimica Biophysica Acta* 1986, 854(1) : 93-101

