

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2014

N°84

VALIDATION D'UNE METHODE D'ETUDE *IN VITRO*
DES ASSOCIATIONS D'ANTBIOTIQUES SUR DES
SOUCHES DE BACILLES A GRAM NEGATIF

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLÔME D'ETAT)

Présentée et soutenue publiquement

LE 05 Juillet 2014

PAR

Mlle Biné Mariam NDIONGUE

Née le 23 Juin 1987 à DAKAR (SENEGAL)

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT :	M. Cheikh Saad-Bouh	BOYE	Professeur
MEMBRES :	M. Bara	NDIAYE	Professeur
	Mme Amy GASSAMA	SOW	Maître de Conférences Agrégé
	M. Gora	MBAYE	Maître de Conférences Agrégé
DIRECTEUR DE THESE :	M. Cheikh Saad-Bouh	BOYE	Professeur

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE
DAKAR**

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

DECANAT & DIRECTION

DOYEN

M. ABDARAHMANE DIA

PREMIER ASSESSEUR

M. AMADOU DIOUF

DEUXIEME ASSESSEUR

M. ABDOUL WAKHABE KANE

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

M. SEYBATOU MAGATTE NDAW

DAKAR, LE 26 MAI 2014

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013–2014

I. MEDECINE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. Mamadou	BA	Pédiatrie
M. Mamadou	BA	Urologie
Mme Mariame GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M. Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M. Seydou Boubakar	BADIANE	Neurochirurgie
M. Mamadou Diarrah	BEYE	Anesthésie-Réanimation
M. Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M. Cheikh Ahmed Tidiane	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M. Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
§M. Jean Marie	DANGO	Anatomie et Cytologie Patho.
M. Abdarahmane	DIA	Anatomie-Chirurgie Générale
Mme. Anta TAL	DIA	Médecine Préventive
M. Baye Assane	DIAGNE	Urologie
+ * M.Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
M. Bay Karim	DIALLO	O.R.L
M. Maboury	DIAO	Cardiologie
M. Madieng	DIENG	Chirurgie Générale
*M. Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M. Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M.EL Hadj Malick	DIOP	O-R-L
M. Mamadou	DIOP	Anatomie
M. Saliou	DIOP	Hématologie Clinique
Mme. Thérèse MOREIRA	DIOP	Médecine Interne I
M. Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Boucar	DIOUF	Néphrologie
Mme. Elisabeth	DIOUF	Anesthésiologie-Réanimation
M. Mamadou Lamine	DIOUF	Hépatologie / Gastro- Entérologie
M. Raymond	DIOUF	O.R.L
M. Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M. Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M. Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
M. Papa Ahmed	FALL	Urologie
Mme. Sylvie SECK	GASSAMA	Biophysique
Mme. Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologique
M.Oumar	GAYE	Parasitologie
§ M. Lamine	GUEYE	Physiologie
*M. Serigne Maguèye	GUEYE	Urologie
+*M. Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne
M. Abdoul	KANE	Cardiologie
M. Assane	KANE	Dermatologie
M. Oumar	KANE	Anesthésie-Réanimation
M. Mamadou	MBODJ	Biophysique
M. Jean Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique

*M. Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M. Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Orthopédie-Trauma
M. Issa	NDIAYE	O.R.L
*M. Madoune Robert	NDIAYE	Ophthalmologie
M. Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie Thoracique&Cardio-vasculaire
M. Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
M. Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
M. Papa Amadou	NDIAYE	Ophthalmologie
*M. Cheikh Tidiane	NDOUR	Maladies Infectieuses
M. Alain Khassim	NDOYE	Urologie
*M. Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
M. Oumar	NDOYE	Biophysique
M. Gabriel	NGOM	Chirurgie Pédiatrique
*M. Abdou	NIANG	CM / Néphrologie
M. El Hadji	NIANG	Radiologie
Mme. Mbayang NDIAYE	NIANG	Physiologie
Mme. Suzanne Oumou	NIANG	Dermatologie
*M. Youssoupha	SAKHO	Neurochirurgie
M. Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M. Niama DIOP	SALL	Biochimie Médicale
M. Abdoulaye	SAMB	Physiologie
M. Mamadou	SARR	Pédiatrie
M. Moustapha	SARR	Cardiologie
§Mme. Awa Marie COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M. Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
M. Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M. EL Hassane	SIDIBE	Endocrinologie-Métabolisme Nutrition-Diabétologie
*M. Masserigne	SOUMARE	Maladies Infectieuses
M. Ahmad Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
M. Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
+* M. Papa Salif	SOW	Maladies Infectieuses
Mme. Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M. Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
§M. Cheickna	SYLLA	Urologie
M. Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M. Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale

+ Disponibilité

* Associé

§ Détachement

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Abdoulaye		BA	Physiologie
Mme Aïssata LY		BA	Radiologie
M.EL Hadj Amadou		BA	Ophthalmologie
M. Momar Codé		BA	Neurochirurgie
M. Mamadou		CISSE	Chirurgie Générale
§M. Mamadou Lamine		CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M. Ahmadou		DEM	Cancérologie
M. Djibril		DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
M. Saïdou		DIALLO	Rhumatologie
* M. Babacar		DIAO	Urologie
§M. Alassane		DIATTA	Biochimie Médicale
M. Charles Bertin		DIEME	Orthopédie-traumatologie
M. Yémou		DIENG	Parasitologie
M. El Hadj Ibrahima		DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Ibrahima Bara		DIOP	Cardiologie
M. Papa Saloum		DIOP	Chirurgie Générale
M. Saïd Norou		DIOP	Médecine Interne II
Mme. Sokhna BA		DIOP	Radiologie
M. Saliou		DIOUF	Pédiatrie
Mme Awa Oumar TOURE		FALL	Hématologie Biologique
M. Babacar		FAYE	Parasitologie
§ Mme. Mame Awa		FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar		FAYE	Parasitologie
M. Oumar		FAYE	Histologie-Embryologie
M. Papa Lamine		FAYE	Psychiatrie
M. EL Hadj Fary		KA	Clinique Médicale/Néphrologie
M. Ousmane		KA	Chirurgie Générale
M. Abdoulaye		LEYE	Clinique Médicale / Médecine Interne
Mme. Fatimata		LY	Dermatologie
Mme. Nd. Maïmouna NDOUR		MBAYE	Médecine Interne
*M. Mouhamadou		MBENGUE	Hépatologie / Gastro-Entérologie
M. Philippe Marc		MOREIRA	Gynécologie
M. Mor		NDIAYE	Médecine du Travail
M. Moustapha		NDIAYE	Neurologie
+ *M. Papa		NDIAYE	Médecine Préventive
*M.Souhaïbou		NDONGO	Médecine Interne
M. Jean Marc Ndiaga		NDOYE	Anatomie
Mme Marie	DIOP	NDOYE	Anesthésie-Réanimation
M. Lamine		NIANG	Urologie
M. Abdoulaye		POUYE	CM / Médecine Interne
Mme. Paule Aïda	NDOYE	ROTH	Ophthalmologie
M. André Daniel		SANE	Orthopédie-Traumatologie
Mme. Anne Aurore		SANKALE	Chirurgie plastique et reconstructive
Mme. Anna		SARR	Médecine Interne
*M.Ibrahima		SECK	Médecine Préventive
Mme Fatou Samba D. NDIAYE		SENE	Hématologie Clinique

Mme Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M. Assane	SYLLA	Pédiatrie
M. Abdourahmane	TALL	O.R.L
M. Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie
Mme Nafissatou Oumar	TOURE	Pneumologie

+ Disponibilité

* Associé

§ Détachement

MAITRES-ASSISTANTS

Mme. Fatou Diallo	AGNE	Biochimie Médicale
M. El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M. Amadou Gabriel	CISS	Chirurgie Thoracique & Cardio. Vasc.
Mme. Mariama Safiéto KA	CISSE	Médecine Interne
Mme. Ndèye Fatou	COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
M. Mamadou	COUME	Médecine Interne
M. André Vauvert	DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie
M. Daouda	DIA	Hépatologie / Gastro-Entérologie
M. Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie-Embryologie
*M. Moussa	DIALLO	Dermatologie
*Mme Marie Edouard Faye	DIEME	Gynécologie Obstétrique
M. Pape Adama	DIENG	Chirurgie Thoracique & Cardio-Vasculaire
Mme. Seynabou FALL	DIENG	Médecine Interne I
Mme. Evelyne Siga	DIOM	O.R.L.
M. Ansoumana	DIATTA	Pneumophtisiologie
M. Amadou Lamine	FALL	Pédiatrie
M. Boubacar	FALL	Urologie
M. Lamine	FALL	Pédopsychiatrie
Mme. Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine du Travail
M. Mohamed Lamine	FALL	Anesthésie-réanimation
Mme. Louise	FORTES	Maladies Infectieuses
M. Pape Macoumba	GAYE	Cancéro-radiothérapie
*M. Serigne Modou Kane	GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
Mme. Roughyatou	KA	Bactériologie – Virologie
Mme. Yacine Dia	KANE	Pneumophtisiologie
*M. Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
M. Alassane	MBAYE	Cardiologie
Mme. Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M. Magatte	MBAYE	Gynécologie-Obstétrique
M. Amadou Koura	NDAO	Neurologie
M. Mouhamadou Bamba	NDIAYE	Cardiologie
M. Papa Ibrahima	NDIAYE	Anesthésie Réanimation
M. Boucar	NDONG	Biophysique
Mme. Ndèye Dialé Ndiaye	NDONGO	Psychiatrie
M. Oumar	NDOUR	Chirurgie Pédiatrique
M. Ndaraw	NDOYE	Neurochirurgie
Mme. Marguerite Edith D.	QUENUM	Ophtalmologie
M. Jean Claude François	SANE	Orthopédie-Traumatologie
M. Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M. Gora	SECK	Physiologie
Mme. Lala Bouna	SECK	Neurologie

M. Mohamed Maniboliot	SOUMAH	Médecine légale
M. Roger Clément Kouly	TINE	Parasitologie Médicale
M. Kamadore	TOURE	Santé Publique
M. Silly	TOURE	Stomatologie
M. Issa	WONE	Médecine Préventive

ASSISTANTS

Mme Nafissatou Ndiaye	BA	Anatomie Pathologique
M. El Hadji Amadou Lamine	BATHILY	Biophysique
Mme Fatou	CISSE	Biochimie Médicale
M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Mouhamadou Lamine	DIA	Bactériologie-Virologie
M Sidy Akhmed	DIA	Médecine du Travail
M. Chérif Mouhamed M.	DIAL	Anatomie Pathologique
Mme. Mama SY	DIALLO	Histologie-embryologie
M. Mor	DIAW	Physiologie
Mme. Marie Joseph	DIEME	Anatomie Pathologique
M. Abdoulaye Dione	DIOP	Radiologie
Mme. Aïssatou Seck	DIOP	Physiologie
M. Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M. Ousseynou	DIOP	Biophysique
Mme. Abibatou SALL	FALL	Hématologie
M. Blaise Félix	FAYE	Hématologie
M. Magaye	GAYE	Anatomie
M. Mamadou Makhtar Mbacké	LEYE	Médecine Préventive
M. Ainina	NDIAYE	Anatomie
M. Magatte	NDIAYE	Parasitologie Médicale
M. Khadim	NIANG	Médecine Préventive
M. Moussa	SECK	Hématologie
M. Abdou Khadir	SOW	Physiologie
M. Doudou	SOW	Parasitologie Médicale
M. Khadime	SYLLA	Parasitologie Médicale
M. Ibou	THIAM	Anatomie Pathologique

CHEFS DE CLINIQUE-ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

M. Abou	BA	Pédiatrie
Mme. Aïssatou	BA	Pédiatrie
*M. El Hadji Makhtar	BA	Psychiatrie
M. Idrissa	BA	Pédopsychiatrie
M. Idrissa Demba	BA	Pédiatrie
Mme. Mame Sanou Diouf	BA	O.R.L.
M. Papa Salmane	BA	Chirurgie Thoracique & Cardio –vasc.
M.Nfally	BADJI	Radiologie
M. Mamadou Diawo	BAH	Anesthésie-Réanimation
Mlle. Marie Louise	BASSENE	Hépto-gastroentérologie
M. Malick	BODIAN	Cardiologie
M. Momar	CAMARA	Psychiatrie
Mme. Maimouna Fafa	CISSE	Pneumologie
M. Mouhamadou Moustapha	CISSE	Néphrologie
M. Abdoulaye	DANFA	Psychiatrie
M. Richard Edouard Alain	DEGUENONVO	O-R-L
M. Mohamed Tété Etienne	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
Mme. Nafissatou	DIAGNE	Médecine Interne
M. Ngor Side	DIAGNE	Neurologie
Mme. Viviane Marie Pierre	CISSE	DIALLO
M. Souleymane	DIATTA	Maladies Infectieuses
M. Demba	DIEDHIOU	Chirurgie Thoracique
Mme Mame Salimata	DIENE	Médecine Interne II
*M. Mamadou Moustapha	DIENG	Neurochirurgie
M. Rudolph	DIOP	Cancérologie
M. Assane	DIOP	Stomatologie
M. Abdoul Aziz	DIOUF	Dermatologie
M. Assane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Doudou	DIOUF	Maladies Infectieuses
Mme. Aimée Lakh FAYE	FALL	Cancérologie
Mme. Anna Modji Basse	FAYE	Chirurgie Pédiatrique
M. Atoumane	FAYE	Neurologie
Mme. Fatou Ly	FAYE	Médecine Interne
*M. Papa Moctar	FAYE	Pédiatrie
M. Mamour	GUEYE	Pédiatrie
M. Modou	GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
M. Aly Mbara	KA	Pédiatrie
M. Daye	KA	Ophtalmologie
M. Ibrahima	KA	Maladies Infectieuses
M. Sidy	KA	Chirurgie Générale
M. Younoussa	KEITA	Cancérologie
M. Amadou Ndiassé	KASSE	Pédiatrie
M. Charles Valérie Alain	KINKPE	Orthopédie-Traumatologie
M.Ahmed Tall	LEMROBOTT	Orthopédie-Traumatologie
M. Papa Alassane	LEYE	Néphrologie
M. Yakham Mohamed	LEYE	Anesthésie-réanimation
Mme. Indou DEME	LY	Médecine Interne
Mm. Khardiata Diallo	MBAYE	Pédiatrie
M. Lamine	NDIAYE	Maladies Infectieuses
		Chirurgie Plastique et Reconstructive

M. Maodo	NDIAYE	Dermatologie
M. Babacar	NIANG	Pédiatrie
* M. Mouhamadou Mansour	NIANG	Gynécologie-Obstétrique
M. Aloïse	SAGNA	Chirurgie Pédiatrique
Mme. Magatte Gaye	SAKHO	Neurochirurgie
Mme. Nafy Ndiaye	SARR	Médecine Interne
M. Simon Antoine	SARR	Cardiologie
M. Mamadou	SECK	Chirurgie Générale
M. Sokhna	SECK	Psychiatrie
Mme. Marième Soda DIOP	SENE	Neurologie
M. Aboubacry Sadikh	SOW	Ophthalmologie
Melle Adjaratou Dieynabou	SOW	Neurologie
M. Yaya	SOW	Urologie
M. Abou	SY	Psychiatrie
M. Alioune Badara	THIAM	Neurochirurgie
Mme. Khady	THIAM	Pneumologie
M. Mbaye	THIOUB	Neurochirurgie
M. Aliou	THIONGANE	Pédiatrie
M. Alpha Oumar	TOURE	Chirurgie Générale
M. Cyrille	ZE ONDO	Urologie

+ Disponibilité

* Associé

§ Détachement

II. PHARMACIE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M. Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
Mme Aïssatou Gaye	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
M. Alioune	DIEYE	Immunologie
* M. Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Tandakha Ndiaye	DIEYE	Immunologie
M. Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
M. Yérim Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie
M. Mamadou	FALL	Toxicologie
*M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
M. Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
* M. Omar	NDIR	Parasitologie
Mme. Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
M. Guata yoro	SY	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Alassane	WELE	Chimie Thérapeutique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Melle Thérèse	DIENG	Parasitologie
M. Djibril	FALL	Pharmacie Chimique & Chimie Orga.
M. Pape Madièye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M. Modou Oumy	KANE	Physiologie
M. Gora	MBAYE	Physique Pharmaceutique
*M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
M. Daouda	NDIAYE	Parasitologie
Mme. Maguette D.SYLLA	NIANG	Immunologie
M. Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
M. Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

MAITRES DE CONFERENCES

M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
----------	------	--

MAITRES-ASSISTANTS

M. Makhtar	CAMARA	Bactériologie-virologie
Mme. Rokhaya Ndiaye	DIALLO	Biochimie Pharmaceutique
M. Amadou	DIOP	Chimie Analytique
M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M. Babacar	MBENGUE	Immunologie
*Mme Halimatou Diop	NDIAYE	Bactériologie – Virologie
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Serigne Omar	SARR	Chimie Analytique & Bromatologie
Mme. Awa Ndiaye	SY	Pharmacologie

ASSISTANTS

Melle Aïda Sadikh	BADIANE	Parasitologie
Mme Kady Diatta	BADJI	Botanique
M. Mamadou	BALDE	Chimie Thérapeutique
Mme. Awa Ba	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. William	DIATTA	Botanique
M. Adama	DIEDHIOU	Chimie Thérapeutique & Organique
M. Cheikh	DIOP	Toxicologie
M. Moussa	DIOP	Pharmacie Galénique
M. Louis Augustin D.	DIOUF	Physique Pharmaceutique
M. Alphonse Rodrigue	DJIBOUNE	Physique Pharmaceutique
M. Alioune Dior	FALL	Pharmacognosie
*M. Babacar	FAYE	Biologie Moléculaire et cellulaire
M. Djiby	FAYE	Pharmacie Galénique
M. Macoura	GADJI	Hématologie
Melle Rokhaya	GUEYE	Chimie Analytique & Bromatologie
Mme. Rokhaya Sylla	GUEYE	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
Mme Arame	NDIAYE	Biochimie Médicale
M. Mouhamadou	NDIAYE	Parasitologie
M. Idrissa	NDOYE	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
Mme. Mathilde M. P. Cabral	NDIOR	Toxicologie
M. Abdoulaye	SECK	Bactériologie –Virologie
* M. Mame Cheikh	SECK	Parasitologie
M. Mbaye	SENE	Physiologie Pharmaceutique
M. Madièye	SENE	Pharmacologie
M. Papa Mady	SY	Physique Pharmaceutique
Mme. Fatou Guèye	TALL	Biochimie Pharmaceutique
M. Yoro	TINE	Chimie Générale
Mme Aminata	TOURE	Toxicologie

* Associé

*

III. CHIRURGIE DENTAIRE

PROFESSEURS TITULAIRES

M Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
*M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
M. Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
M. Abdoul Wakhabe	KANE	Odontologie Cons. Endodontie
* M. Papa Ibrahima	NGOM	Orthopédie Dento-Faciale
M. Malick	SEMBENE	Parodontologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mme Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M. Daouda	CISSE	Odontologie Prév. et Sociale
Mme Adam Marie SECK	DIALLO	Parodontologie
M. Babacar	FAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Daouda	FAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M. Malick	FAYE	Pédodontie
M. Cheikh Mouhamadou M.	LO	Odontologie Prév. Sociale
M. El Hadj Babacar	MBODJ	Prothèse Dentaire
§ Mme Charlotte FATY	NDIAYE	Chirurgie Buccale
Mme Fatou gaye	NDIAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Mouhamed	SARR	Odontologie Cons. Endodontie
Mme Soukèye DIA	TINE	Chirurgie Buccale
M. Babacar	TOURE	Odontologie Conservatrice Endodontie

MAITRES ASSISTANTS

Mme Aïssatou TAMBA	BA	Pédodontie-Prévention
M. Khaly	BANE	O.C.E.
Mme Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M. Abdoulaye	DIOUF	Parodontologie
M. Joseph Samba	DIOUF	Orthopédie Dento-Faciale
Mme Fatou	LEYE	O.C.E.
M. Malick	MBAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Paul Débé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale
Mme Farimata youga DIENG	SARR	Matières Fondamentales
M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire

ASSISTANTS

Mme. Adjaratou Wakha	AIDARA	O.C.E.
M. Abdou	BA	Chirurgie Buccale
M. Alpha	BADIANE	Orthopédie Dento-Faciale
Mme. Binetou C. GASSAMA	BARRY	Chirurgie Buccale
*M. Khalifa	DIENG	Odontologie Légale
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire
M. Abdoulaye	DIOUF	Odontologie Pédiatrique
M. Massamba	DIOUF	Odontologie Prév. et Sociale
Mme. Ndèye Nguiniane Diouf	GAYE	Odontologie Pédiatrique
*M. Moctar	GUEYE	Prothèse Dentaire
*M. Mouhamadou Lamine	GUIRASSY	Parodontologie
Melle. Aïda	KANOUTE	Santé Publique Dentaire
M. Alpha	KOUNTA	Chirurgie Buccale
M. Papa Abdou	LECOR	Anatomo- Physiologie
M. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
Mme. Diouma	NDIAYE	Odontologie Conservatrice-Endodontie
M. Mamadou Lamine	NDIAYE	Odontologie Conservatrice-Endodontie
M. Seydina Ousmane	NIANG	Odontologie Conservatrice- Endodontie
M. Oumar Harouna	SALL	Matières Fondamentales
M. Babacar	TAMBA	Chirurgie Buccale
Mme. Soukèye Ndoye	THIAM	Odontologie Pédiatrique
Mme. Néné	THIOUNE	Prothèse Dentaire
M. Amadou	TOURE	Prothèse Dentaire
M. Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

* Associé

§ Détachement

*Au nom d'Allah Le Tout
Puissant.*

*Paix et Salut sur Son
Prophète Mohamed*

A LA MEMOIRE DE...

Feu mes grands-parents, que je n'ai pas eus la chance de bien connaître...
Puissiez-vous reposer en paix

Feu mon oncle adoré IBRAHIMA NDIONGUE,

Presque un an déjà qu'un vide subsiste que rien ne peut combler dans mon cœur. La blessure est toujours aussi profonde et elle ne cicatrisera jamais de la perte d'un père. J'aurai tant voulu que tu sois là pour partager ce moment de joie avec nous et te serrer dans mes bras. Cependant je me console en pensant à tous ces moments de complicité, de bonheur vécus avec toi et à toutes ces bénédictions qui irradient vers nous depuis ton petit coin au paradis. Saches que chacune de mes réussites t'est dédiée depuis toujours. Reposes en paix.

Feu mon honorable tante AISSATA NDIONGUE, je t'avais promis de partager ce moment avec toi. Mais hélas le bon Dieu en a décidé autrement. Je garde de toi un modèle de piété et de gentillesse. Merci pour tes prières et tes bénédictions.... Tu nous manques et ce travail t'est dédié.

Feu mon oncle OUMAR NDIONGUE

**QUE LA CLEMENCE DE DIEU REGNE SUR VOUS ET QUE LA
MISERICORDE APAISE VOS AMES**



DEDICACES ET
REMERCIEMENTS

JE DEDIE CE TRAVAIL...

A ma chère mère, MARIETOU FALL, mon Rayon de Soleil,

Je serai tentée de dire qu'aucune femme ne t'arrive à la cheville...

Dieu seul peut témoigner de l'acharnement et des sacrifices fournis pour la réussite de tes enfants qui a toujours été ton souci majeur. Merci pour tes prières, ton soutien constant, merci d'avoir toujours été là dans les épreuves les plus dures et de ne jamais t'être avouée vaincue lorsque souvent, j'ai voulu baisser les bras.

Mon attachement et mon amour envers toi ne peuvent être exprimés ou traduits par ces quelques mots imparfaits. Merci de m'avoir toujours donné le souffle pour pouvoir continuer...

Enfin...Merci tout simplement d'être ma Mère.

Je prie Allah le Tout Puissant de t'accorder santé et longue vie afin que tu puisses célébrer avec ta fille l'aboutissement de tant de sacrifices et de privation, le fruit de l'arbre que tu as si bien entretenu. AMEN.

A mon père DAHIROU NDIONGUE

Tu ne t'es jamais ménagé pour notre réussite et notre bonheur. Ton humilité ta droiture, ton sens de l'honneur et du travail m'ont toujours marquée.

Saches que tu es ma référence et j'espère un jour, pouvoir acquérir le quart de tes qualités. Je ne trouverai jamais assez de mots pour exprimer tout mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour les sacrifices consentis.

Merci pour tes encouragements permanents... merci de m'avoir permis de marcher la tête haute.

J'espère en ce jour être ta fierté. Qu'Allah le Tout Puissant te procure santé et longue vie.

A mon oncle BASSIROU FALL

Tu es pour moi le symbole de la loyauté, de l'honnêteté et de la vertu. Je ne trouverai jamais assez de mots pour exprimer tout mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour ton amour envers nous. Je prie DIEU, le TOUT PIUSSANT pour qu'il te prête longue vie pour que tu puisses jouir de ton œuvre dirigé avec abnégation et sacrifices.

Que ce travail soit le témoignage de mon amour et ma gratitude envers toi

A mon oncle FADEL NDIONGUE

Pour tes conseils si précieux

Pour tout l'amour que tu m'as apporté depuis toute petite.

L'occasion m'est enfin donnée de t'exprimer mon attachement.

Je prie DIEU, le TOUT PIUSSANT pour qu'il te prête longue vie.

A mes frères AMADOU TIJANE, PAPA MOUHAMADOU, EL HADJI HAMIDOU

Puissions-nous rester toujours aussi unis dans la tendresse, solidaires dans la vie et fidèles à l'éducation que nos chers parents ont su nous inculquer. Merci pour l'affection, le soutien, le réconfort que vous apportez à votre sœur chérie,

En témoignage de ce profond amour qui nous lie ce travail, vous est dédié.

A mes oncles et tantes,

Vous m'avez toujours témoigné une grande affection.

Source de bonheur et de solidarité, puisse dieu me donner la force et le courage pour vous montrer mon respect, mon estime et mon amour envers vous.

Je vous dédie ce modeste travail en vous souhaitant une vie pleine de bonheur et de santé.

A mes cousins et cousines adorés YOUMA AICHA THIOUB, MOUSSA IBRA SOW, HAMET SALOUM SOW dans les moments les plus difficiles, vos conseils, votre soutien et votre réconfort ont été sans faille. Vous m'avez aidée à surmonter les épreuves les plus dures. Aucun mot ne saurait exprimer tout l'amour que je vous porte. Ce travail n'est que le reflet de toute mon affection et ma reconnaissance.

A tous mes autres cousins et cousines, je n'oublie personne ce travail vous est tous dédiés

A mon amie d'enfance et sœur NDEYE AIDA MBOW pour ta tendresse infinie, pour ta générosité, ton amour pour moi, ta sensibilité, tu sais la place que tu tiens dans mon cœur. Je te dédie ce travail.

A tous mes amies avec qui j'ai partagé des moments de peine et de joie à la fac : **ROKHAYA DIA, AMINATA SYLLA, MAME AWA TALL, NDIAYTA NDOUR, FATOU NDIAYE...** Que nos liens d'amitié perdurent pour toujours.

A mon cher ami MAMADOU BACHIR BASSE

Pour tes précieux conseils, ta disponibilité, ta modestie, pour tout l'estime et l'admiration que j'ai pour toi Je te dédie ce travail.

A mes chères tantes, AISSATOU BA, MAGUETTE TALL, AMINATA GUEYE, NDEYE BEYE

A **tous mes camarades** de la promotion pharmacie 2011, particulièrement à mon binôme et sœur de galère **NDEYE AMI NDIAYE** et à son mari.

A **toutes les personnes** qui ont contribué à ce travail...

A **tous ceux j'ai dû oubliés...**

Je remercie...

Tous mes maîtres, merci de votre enseignement

Tout le personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital

Aristide Le Dantec, particulièrement à Amadou Diop, Assane Faye, Mme
THIAM, tonton Oumar, tonton Badji, Djiby, Michel.

Dr Assane Dieng, Dr Sokhna Fall et Abdoulaye Diop

A NOS MAÎTRE ET JUGES

A notre Maître et Président de jury

Monsieur le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider notre jury de thèse. Nous ne saurions exprimer toute notre gratitude... L'élève que nous sommes ne peut reconnaître la grandeur de son Maître. Ces années passées à vos côtés nous ont permis de nous perfectionner, de développer notre esprit scientifique et d'apprécier encore la bactériologie. Vous nous avez inspiré dans ce travail et vous nous avez guidés dans sa réalisation malgré vos nombreuses tâches. Votre rigueur, votre sens de la méthode mais aussi la patience et la compréhension dont vous avez fait preuve, nous ont beaucoup marqués. Pouvons-nous à travers cet humble travail, vous témoigner l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre fidélité à vos idéaux.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Bara NDIAYE

Vous aviez accepté de parrainer notre promotion sortante. Nous sommes ravies de vous retrouver à nouveau dans notre jury de thèse. La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce modeste travail nous réjouit. Votre disponibilité à notre égard, le caractère paternel avec lequel vous nous avez reçus, nous ont profondément touché, ceci en plus de vos nombreuses qualités humaines et intellectuelles qui forcent notre admiration. Soyez rassuré, cher Maître de notre estime et de notre très sincère reconnaissance

A notre Maître et Juge

Madame le Professeur Amy GASSAMA SOW

Nous sommes sensibles au privilège que vous nous faites en acceptant avec enthousiasme de siéger dans notre jury de thèse. Nous avons toujours été séduits par votre simplicité, votre générosité dans le partage du savoir et votre amabilité qui font de vous un Professeur aimé et qui nous servira toujours d'exemple. Veuillez trouver ici, cher Maître, l'expression de nos sentiments les meilleurs.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Gora MBAYE

Nous sommes très sensibles au grand honneur que vous nous faites, en acceptant de siéger notre jury de thèse malgré vos multiples occupations. Les mots les plus forts nous manquent pour vous exprimer notre gratitude. Votre amour du travail cumulé de rigueur scientifique et de votre modestie n'ont d'égal que votre mérite et sont pour nous un exemple à suivre. Soyez rassuré de notre parfaite reconnaissance Cher Maître

.

«Par délibération, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ou improbation»



LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxy-ribonucléique
AM3	: Antibiotique Medium 3
AMK	: Amikacine
AMM	: Autorisation de Mise sur Marché
AMP	: Ampicilline
AMP-GM	: Ampicilline - Gentamicine
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
ARNt	: Acide Ribonucléique de transfert
ATB	: Antibiotique
ATCC	: American Type Culture Collection
CI	: Concentration Inhibitrice
CIP	: Ciprofloxacine
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CRO	: Ceftriaxone
CRO- GM	: Ceftriaxone - Gentamicine
CRO-AMK	: Ceftriaxone - Amikacine
CRO-CIP	: Ceftriaxone - Ciprofloxacine
EMB	: Eosyne Méthylène Blue
FBC	: Fraction Bactericidal Concentration
FIC	: Fraction Inhibitory Concentration
HCl	: Chlorure d'Hydrogène
LCR	: Liquide Céphalo- Rachidien
Mm	: Millimètre

Mn : Minute
NaOH : Hydroxyde de Sodium
PLP : Protéines Liant les Penicillines
PSE : Peudomonas Specific Enzym
UFC : Unité Formant Colonie



LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Représentation schématique de la microméthode échiquier: préparation des gradients de concentration dans la plaque.....	47
<u>Figure 2</u> : Traduction graphique de l'index FIC ISOBOLOGRAMME.....	50
<u>Figure 3</u> : Courbe de synergie partielle de l'association AMP-GEN sur <i>Escherichia coli</i>	56
<u>Figure 4</u> : Courbe d'addition de l'association CRO-GEN sur <i>Escherichia coli</i>	57
<u>Figure 5</u> : Courbe de synergie totale de l'association CRO-AMK sur <i>Escherichia coli</i>	58
<u>Figure 6</u> : Courbe de synergie totale de l'association CRO-CIP sur <i>Escherichia coli</i>	59
<u>Figure 7</u> : Courbe de synergie totale de l'association CRO-AMK sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
<u>Figure 8</u> : Courbe de synergie totale de l'association CRO-CIP sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
<u>Figure 9</u> : Courbe de synergie partielle de l'association CIP-AMK sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
<u>Figure 10</u> : Courbe d'addition de l'association CIP-GEN sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
<u>Figure 11</u> : Corrélation entre CMI par E-test et CMI cibles.....	66
<u>Figure 12</u> : Corrélation entre E-test® et « échiquier ».....	69



LISTE DES TABLEAUX

<u>TABLEAU I</u> : Classification des Entérobactéries.....	7
<u>TABLEAU II</u> : Solvants et diluants des antibiotiques.....	41
<u>TABLEAU III</u> : Résultats CMI par la méthode Etest ®	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	52
<u>TABLEAU IV</u> : Résultats CMI par la méthode Etest ®	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	52
<u>TABLEAU V</u> :Résultats antibiogramme de contrôle	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	53
<u>TABLEAU VI</u> :Résultats antibiogramme de contrôle	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	53
<u>TABLEAU VII</u> : Critères d'interprétation de la sensibilité selon les antibiotiques.....	54
<u>TABLEAU VIII</u> : Sensibilité des souches vis-à-vis des différents antibiotiques utilisés.....	55
<u>TABLEAU IX</u> : Sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis de l'association Ampicilline - Gentamicine.....	56
<u>TABLEAU X</u> : Sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis de l'association Ceftriaxone - Gentamicine.....	57
<u>TABLEAU XI</u> : Sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis de l'association Ceftriaxone - Amikacine.....	58
<u>TABLEAU XII</u> : Sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis de l'association Ceftriaxone – Ciprofloxacine.....	59
<u>TABLEAU XIII</u> : Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de vis-à-vis de l'association Ceftriaxone-Amikacine.....	60
<u>TABLEAU XIV</u> : Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis de l'association Ceftriaxone-Ciprofloxacine.....	61
<u>TABLEAU XV</u> : Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis de l'association Ciprofloxacine-Amikacine.....	62

<u>TABLEAU XVI</u> : Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis de l'association Ciprofloxacine-Gentamicine.....	63
<u>TABLEAU XVII</u> : Résultats CMI parE-TEST® comparés aux valeurs cibles.	66
<u>TABLEAU XVIII</u> : Valeurs de CMI obtenues avec les deux méthodes.....	67



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. GENERALITES SUR LES BACILLES A GRAM NEGATIF	5
I.1. LES ENTEROBACTERIES	5
I.1.1. Définition	5
I.1.2. Taxonomie.....	5
I.1.3. Caractères bactériologiques	8
I.1.4. Etude des principaux genres	8
I.1.4.1. Escherichia.....	8
I.1.4.2. Klebsiella.....	9
I.1.4.3. Enterobacter	10
I.2. LES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES ..	10
I.2.1. Définition	10
I.2.2. Taxonomie.....	11
I.2.3. Etude de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
II. RAPPELS SUR LES ANTIBIOTIQUES.....	14
II.1. LES BETA-LACTAMINES	14
II.2. LES AMINOSIDES.....	15
II.3. LES MACROLIDES, LINCOSAMIDES ET STREPTOGRAMINES.....	16
II.4. LES QUINOLONES.....	16
II.5. LES CYCLINES.....	17
II.6. LES PHENICOLES.....	17
II.7. LES GLYCOPEPTIDES (VANCOMYCINE, TEICHOPLANINE)	17

II.8. LES SULFAMIDES ET LA TRIMETHOPRIME	18
III. LA RESISTANCE DES BACILLES GRAM NEGATIF AUX ANTIBIOTIQUES	18
III.1. NOTION DE RESISTANCE BACTERIENNE	18
III.2. LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE	19
III.2.1. La résistance naturelle ou intrinsèque	19
III.2.2. La résistance acquise	19
III.2.3. La résistance clinique.....	20
III.3. LE DETERMINISME GENETIQUE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	20
III.3.1. La résistance chromosomique	21
III.3.2. La résistance extra-chromosomique	21
III.4. MECANISMES BIOCHIMIQUES DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	22
III.4.1. Diminution de la perméabilité et efflux actif.....	22
III.4.2. Modification de la cible des antibiotiques	23
III.4.3. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques	23
IV. LES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES EN THERAPEUTIQUE ANTI-INFECTIEUSE.....	23
IV.1. LE BUT DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES [62,66] ..	24
IV.2. LE CHOIX DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES ET LEURS REGLES D'UTILISATION	26
IV.2.1. Critères de choix des associations d'antibiotiques	26
IV.2.2. Règles d'utilisation des associations d'antibiotiques	27

IV.3. DEFINITION DES INTERACTIONS DANS UNE ASSOCIATION.....	28
IV.4. METHODES D'ETUDE DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES	30
IV.4.1. Les techniques d'étude par diffusion	30
IV.4.2. La technique E-test®	31
IV.4.3. Les techniques d'étude par dilution en milieu liquide	31
IV.4.3.1. Technique simplifiée pour la pratique clinique.....	31
IV.4.3.2. La technique de « l'Echiquier »	32
V. LE CONTROLE DE QUALITE	32
VI. QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION	33
VI.1. CORRELATION ET DROITE DE REGRESSION	33
VI.1.1. Notion de corrélation	33
VI.1.2. Droite de régression.....	34
VI.2. LIMITE DE DETECTION	35
VI.3. PRECISION	35
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL	36
I. MATERIEL	37
I.1. SOUCHES BACTERIENNES.....	37
I.2. MATERIEL DE LABORATOIRE	37
I.2.1. Le matériel pour l'étude de la sensibilité.....	37
I.2.2. Le matériel pour la réalisation des associations d'antibiotiques	38
I.3. MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS	39
I.3.1. Milieux de culture.....	39

I.3.1.1. L'Antibiotic Medium 3 (AM3)	39
I.3.1.2. Autres milieux de culture (voir annexes).....	39
I.3.2. Réactifs.....	40
I.3.2.1. Solutions tampons	40
I.3.2.2. Solutions mères d'antibiotiques	40
II. ASSURANCE QUALITE.....	41
II.1. CONTROLE DES SOUCHES.....	41
II.2. CONTROLE DES MILIEUX	42
II.3. CONTROLE DE QUALITE.....	42
II.4. ANTIBIOGRAMME DE CONTROLE	42
II.4.1. Principe	42
II.4.2. Technique (selon recommandations CA-SFM)	43
II.4.3. Lecture et interprétation	43
III. METHODE.....	44
III.1. DETERMINATION DES CMI EN MILIEU LIQUIDE PAR LA METHODE DE DILUTION	44
III.2. APPRETEMENT DES MICROPLAQUES DE SENSIBILITE ..	45
III.2.1. Préparation des solutions d'antibiotiques	45
III.2.2. Préparation des gradients de concentration dans la microplaque	45
III.2.3. Préparation de l'inoculum et ensemencement des plaques	48
III.3. RESULTATS ET INTERPRETATION.....	48
III.3.1. Lecture.....	48
III.3.2. Interprétation	49

IV.	RESULTATS DES CONTROLES	51
IV.1.	TESTS DE STERILITE.....	51
IV.1.1.	Milieux de culture.....	51
IV.1.2.	Tampons	51
IV.2.	TEST D’EFFICACITE	51
IV.3.	RESULTATS CONTROLE DE QUALITE.....	51
IV.4.	ANTIBIOGRAMME DE CONTROLE	53
V.	ETUDE DE L’ASSOCIATION DES ANTIBIOTIQUES SUR LES SOUCHES BACTERIENNES	54
V.1.	DETERMINATION DES CMI ET PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES POUR CHAQUE ANTIBIOTIQUE	54
V.2.	PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES AUX ASSOCIATIONS D’ANTIBIOTIQUES.....	55
V.2.1.	Sensibilité d’Escherichia coli aux différentes associations	56
V.2.2.	Sensibilité de Pseudomonas aeruginosa aux différentes associations	60
VI.	LA VALIDATION DE LA METHODE.....	64
VII.	DISCUSSION.....	69
VII.1.	LES ASSOCIATIONS D’ANTIBIOTIQUES.....	69
VII.1.1.	LE CHOIX DES BACTERIES	70
VII.1.2.	LE CHOIX DES ASSOCIATIONS D’ANTIBIOTIQUES	70
VII.1.3.	ASSOCIATION BETA-LACTAMINES- AMINOSIDES	71
VII.1.3.1.	Association Pénicilline-Aminoside	71
VII.1.3.2.	Association Céphalosporines de troisième génération Aminosides	72

VII.1.4. ASSOCIATION BETA-LACTAMINES- QUINOLONES.....	72
VII.1.5. ASSOCIATION QUINOLONES-AMINOSIDES	73
VII.2. VALIDATION DE LA METHODE D'ETUDE DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES.....	73
VII.3. AVANTAGES ET LIMITES DE LA METHODE	75
VII.4. PERSPECTIVES	75
CONCLUSION.....	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76
ANNEXES.....	

INTRODUCTION

Ces dernières décennies, l'utilisation considérable des antibiotiques contre les bactéries a conduit à l'émergence croissante de résistances de ces dernières et les bacilles à Gram négatif y occupent une place importante.

La prévalence de la résistance bactérienne aux antibiotiques est préoccupante dans les établissements de soins et le choix d'antibiotiques efficaces rendu difficile. De ce fait l'optimisation de l'utilisation des antibiotiques impose une recherche d'une efficacité maximale, de conséquences écologiques minimales sur l'évolution des flores bactériennes, d'une moindre toxicité, et du meilleur rapport coût/bénéfice. Malgré l'apparition de molécules dotées de CMI plus basses ou d'un spectre plus étendu les cliniciens n'ont pas remis en cause l'intérêt des associations [4].

Ainsi les associations d'antibiotiques ont été conçues dans le but d'augmenter la bactéricidie, d'élargir le spectre antibactérien, de prévenir l'émergence de mutants résistants voire de réduire les doses à administrer afin de minimiser les effets secondaires [62].

Le choix des associations est fonction de plusieurs critères et celui de choix se rapporte au type de germe. L'usage d'une association est recommandé, quel que soit l'antibiotique utilisé, dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* du fait de sa moindre sensibilité, de mécanismes particuliers de résistances et de la sélection fréquente de mutants résistants sous traitement [14]. Une approche similaire peut être faite sur les Entérobactéries ayant un niveau de résistance inhabituel. [26].

Cependant l'utilisation des associations n'a pas connu un grand essor et les techniques d'étude très peu validées.

L'objectif de notre travail est donc d'améliorer une méthode d'étude des associations d'antibiotiques sur des souches de bacilles à Gram négatif.

Pour ce faire, nous avons réalisé une étude *in vitro* de six associations binaires

Les résultats obtenus sur la base de protocoles validés, comparés à ceux de la littérature nous permettront de formuler des recommandations quant à l'utilisation des associations d'antibiotiques.

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LES BACILLES A GRAM NEGATIF

Les bacilles à Gram négatif représentent un groupe bactérien hétérogène qui comprend les Entérobactéries et d'autres genres comme *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*.

I.1. LES ENTEROBACTERIES

I.1.1. Définition [65, 109]

Les Entérobactéries sont un groupe de bacilles à Gram négatif d'environ 2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large, mobiles avec une ciliature péritriche ou immobiles, poussant sur des milieux ordinaires, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz, réduisant les nitrates en nitrites et dépourvues d'oxydases.

I.1.2. Taxonomie

❖ Historique [32, 34, 70]

La période de naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe entre 1937 lorsque Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels, on trouvait déjà des noms tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*. Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67. Avec les travaux de Donald BRENNER et de PATRICK A.D. GRIMONT, cette famille a connu un essor et beaucoup de nouveaux genres et espèces furent découverts. En 1972, EDWARD et EWING intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*. En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. En 1985, FARMER et COLL décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

❖ **Habitat et pouvoir pathogène [5, 30]**

Les Entérobactéries sont des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, où ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène soit à l'état de commensaux mais cette localisation digestive n'est pas exclusive. On les retrouve également dans l'environnement, où elles participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement.

❖ **Classification**

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Cette classification est résumée dans le **TABLEAU I**.

TABLEAU I : Classification des Entérobactéries [44]

Groupes	Familles	Genre	Espèces
GROUPE I	<i>Edwardsielleae</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
	<i>Salmonnelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella Typhi</i> <i>Salmonella Paratyphi</i> <i>Salmonella Enteritidis</i>
GROUPE II	<i>Escherichieae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>Levineae</i>	<i>Levinea</i>	<i>Levinea amalonatica</i>
GROUPE III	<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
GROUPE IV	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i> <i>Providencia stuartii</i>
		<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter freundii</i>
GROUPE V	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

I.1.3. Caractères bactériologiques

❖ Caractères morphologiques [50]

Les Entérobactéries ont en général une morphologie typique. Ce sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 μ de long sur 0,6 μ de large. Les *Proteus* sont très polymorphes, en forme longue et filamenteuse ou petits bacilles droits. Les espèces mobiles les plus nombreuses le sont par une ciliature péritriche. Les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). On note parfois la présence d'une capsule visible au microscope chez certains genres comme *Klebsiella*. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion.

❖ Caractères cultureux [29, 50]

Les Entérobactéries se développent facilement *in vitro* sur des milieux nutritifs simples. Leur température optimale de croissance est de 37°C mais leur culture est possible entre 20 et 40°C. Leur temps de division varie entre 20 et 40 mn. Sur des milieux gélosés, les colonies d'Entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes et atteignent 2mm de largeur exceptées celles de *Yersinia* plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes. En milieu liquide, les Entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon.

I.1.4. Etude des principaux genres [29, 50, 67, 91]

I.1.4.1. *Escherichia*

Ce genre comporte plusieurs espèces dont *Escherichia coli*. C'est une bactérie isolée en 1885 par Theodor Von Escherich et couramment appelée "colibacille". Hôte normale de l'intestin de l'homme et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un signe de contamination fécale. Elle exprime les

caractères généraux des Entérobactéries. Elle est en outre mobile, capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole [98]. Il existe différents pathotypes d'*Escherichia coli* responsables d'infections intestinales :

- ETEC : Enterotoxinogen *Escherichia coli*, responsable de la « diarrhée des voyageurs » ou « turista » et des syndromes épidémiques dans les pays du Tiers-monde.
- EIEC : Entero-invasive *Escherichia coli*, encore appelé « *Escherichia coli* Shigella-like » responsable de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale
- EHEC : Entero-haémorragic *Escherichia coli*, responsable de diarrhées sanglantes liées à la production de toxines
- EPEC : Entero-pathogen *Escherichia coli*, responsable de gastro-entérites infantiles. C'est une souche assez sensible à toutes les β -lactamines malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique.
- DAEC : Diffusely Adherent *Escherichia coli* responsable de diarrhées aqueuses
- EAEC : Entero-aggrégatif *Escherichia coli* responsable de diarrhées persistantes

I.1.4.2. *Klebsiella*

Au sein des Entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles et généralement encapsulées. On distingue cependant plusieurs espèces mais *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine. Les *Klebsiella pneumoniae* forment sur milieux solides de grosses colonies de 4mm de diamètre environ, bombées, muqueuses et luisantes. En bouillon, on note la formation d'un trouble dense avec une colorette visqueuse. Ce sont des bactéries capsulées, surtout au sortir de l'organisme, très polymorphes. Elles sont très répandues dans la nature. Ce sont aussi des commensaux du tube digestif des

animaux et de l'homme qui peut en héberger dans l'oropharynx. Elles sont responsables d'infections respiratoires; anciennement appelées "pneumobacilles de Frielandler" mais aussi d'infections urinaires, d'otites, de cystites et d'affections rénales. Elle est naturellement résistante aux pénicillines (Amoxicilline et Ticarcilline) par production d'une β -lactamase. Résistance inhibée par l'Acide clavulanique.

I.1.4.3. *Enterobacter*

Ce genre comprend plusieurs espèces ; *Enterobacter cloacae* étant l'espèce type. Les *Enterobacter* présents dans l'environnement, sont également des commensaux du tube digestif. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables en milieu hospitalier, d'infections urinaires, de bactériémies de méningites ou de suppurations diverses. *Enterobacter cloacae* est principalement isolé chez des patients ayant des pathologies sévères ou certains facteurs les prédisposant aux infections : les traitements antibiotiques au long cours. Elle oppose une résistance naturelle aux pénicillines et aux céphalosporines de 1ere génération. Elle a souvent une polyrésistance en particulier aux β -lactamines par production d'une céphalosporinase dérégulée. Les autres espèces sont généralement plus sensibles sauf en cas d'acquisition de résistances d'origine plasmidique.

I.2. LES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES [91]

I.2.1. Définition

Ce sont des bacilles à Gram négatif, qui contrairement aux Entérobactéries ne fermentent pas de sucres. Ces bactéries aérobies strictes sont le plus souvent oxydases positive et de culture très facile sur des milieux usuels. Elles sont soit immobiles soit mobiles par une ciliature polaire.

I.2.2. Taxonomie

❖ Historique

En 1857, le genre *Pseudomonas* anciennement appelé genre pléthorique fut répertorié avec 160 espèces à son actif. L'édition du BERGERY'S MANUEL de 1974 retenait 29 espèces d'intérêt médical. En 1934 seulement 30 espèces furent retenues; mais c'est seulement avec l'avènement de la génétique que de nouvelles espèces et genres ont vu le jour.

❖ Classification

La taxonomie des bacilles à Gram négatif non fermentaires est en perpétuelle modification et les genres couramment isolés au laboratoire sont: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alteromonas*. Ces genres regroupent plusieurs espèces appartenant au grand ensemble des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales. La classification des bacilles à Gram négatif non fermentaires repose aujourd'hui essentiellement sur la génétique bactérienne et dans une moindre mesure sur l'étude des caractères biochimiques. Ce qui a permis de découvrir de nouveaux genres: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, *Weeksella*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*.

❖ Habitat

Les bacilles à gram négatif non fermentaires sont des bactéries ubiquitaires et saprophytes très répandues dans l'environnement, en particulier dans celui hydrique (eaux, sols, végétaux). Ils peuvent également contaminer les solutés pour perfusion, les solutions antiseptiques, les préparations médicamenteuses liquides.

I.2.3. Etude de *Pseudomonas aeruginosa* [16, 85]

❖ Caractères morphologiques et culturels

Bacille long et fin de 1-3 μ de long sur 0,5-1 μ de large, *Pseudomonas aeruginosa* est anciennement appelé bacille pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pus de couleur bleu-vert. Il est mobile de type polaire avec un seul cil (monotriche). C'est une bactérie non exigeante, qui en culture sur milieu gélosé élabore des pigments notamment: la (pyocyanine) de couleur bleu-vert pathognomonique et les pigments jaune pâle (pyoverdine) ou jaune orangé non spécifiques.

❖ Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa exprime son potentiel pathogène lorsqu'il est introduit dans des zones aux défenses immunitaires diminuées. Il est rencontré dans divers prélèvements effectués chez des malades aux systèmes de défense déficients (immunodéprimés, greffés, cancéreux, leucémiques...) qui sont beaucoup plus réceptifs, mais également chez les patients des services de réanimation ou de soins intensifs. L'émergence de cette bactérie à l'heure actuelle est liée à sa grande fréquence dans les infections nosocomiales, mais surtout du fait de sa multirésistance aux antibiotiques. C'est ce qui est à l'origine de la difficulté de son isolement et de son traitement. La virulence de *Pseudomonas aeruginosa* est en grande partie liée à la production de toxines (exotoxine S, exotoxine A) et d'enzymes (protéases). Il est entre autre responsable de cystites, de plaies, de septicémies, de diverses suppurations, d'infections iatrogènes, digestives, oculaires etc.

❖ Sensibilité

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ayant une sensibilité limitée qu'à certains antibiotiques. C'est pourquoi le choix des molécules pour son traitement est très important. En effet elle est résistante à de nombreux antibiotiques :

Benzylpénicillines, Aminopénicillines, Céphalosporines de 1^{ère} et de 2^{ème} générations et même parfois de 3^{ème} génération, Phénicolés, Tétracyclines, Triméthoprime, Quinolones de 1^{ère} générations, Macrolides etc.

Cette résistance fait intervenir plusieurs facteurs :

- l'imperméabilité de la paroi à certains antibiotiques entraîne une résistance naturelle pour les pénicillines M (Méthicilline, Cloxacilline) ou une résistance acquise faisant intervenir des porines vis-à-vis de la Ticarcilline, la Cefsulodine et l'Imipenème
- l'inactivation enzymatique impliquant plusieurs β -lactamases de type plasmidique comme PSE (Pseudomonas Spécific Enzyme), PSE-1 et PSE-4, Carbénicillinases et Oxacillinases, de type chromosomique habituellement réprimées (Céphalosporinase inductible de Sabath)
- la modification de l'affinité de l'antibiotique pour la cible.

Ces quelques données expliquent les phénotypes de résistance très variés et la difficulté d'établir une hiérarchie parmi les molécules antitypocyaniques rien que sur la base des CMI publiées. De plus la conjoncture épidémiologique variable d'un hôpital et d'un service à l'autre, rend aléatoire toute prévision de sensibilité. Néanmoins certaines β -lactamines présentent une bonne activité sur *Pseudomonas aeruginosa*. C'est le cas des Céphalosporines comme la Ceftazidime ou la Cefsulodine de Monobactames (Aztréonam) et de Carbapénèmes (Imipenème). Parmi les Aminosides l'Amikacine reste la plus active. Les quinolones de 2^{em} génération comme l'Ofloxacin et la Ciprofloxacine ont également une activité intéressante.

La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* à la Colistine reste constante quant à la Fosfomycine elle doit être utilisée en association pour éviter l'émergence rapide de mutants résistants.

Les β -lactamines antipyocyaniques associés aux Fluoroquinolones ou aux Aminosides constituent les traitements en première intention dans les infections généralisées.

II. RAPPELS SUR LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont, au sens strict, des agents antibactériens naturels d'origine biologique et inhibant la croissance d'autres micro-organismes. Ils sont élaborés par des micro-organismes (champignons et diverses bactéries). Cependant, avec le développement des méthodes de synthèse et d'hémisynthèse, cette définition trop réduite a été modifiée. On appelle antibiotique « toute substance qui, à faible concentration, inhibe la croissance bactérienne ».

Un antibiotique est donc une substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique douée d'une activité antibactérienne à l'échelon moléculaire s'exerçant au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques ou d'un équilibre physico-chimique.

II.1. LES BETA-LACTAMINES [77, 78]

Les β -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique. Elles présentent une bonne diffusion dans tous les tissus y compris le LCR. Elles agissent en bloquant la synthèse du peptidoglycane constituant de la paroi des bactéries, en inhibant les enzymes essentielles à la synthèse que sont ; les transpeptidases et les carboxypeptidases aussi appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Les β -lactamines se fixent sur les PLP empêchant le substrat naturel de s'y fixer (ACYL-D-ALANYL-D-ALANINE) qui présente une analogie structurale avec le cycle bêta-lactame. Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides temps-dépendant d'où la nécessité de répéter les doses. Leur structure chimique comprend un cycle β -lactame responsable de l'activité antibactérienne

On distingue plusieurs sous-groupes dans cette famille

❖ Les pénicillines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle thiazolidine. Dans cette sous famille, les groupes les plus importants sont : les pénicillines naturelles (les groupes G et V), les pénicillines du groupe M (cloxacilline), les aminopénicillines (amoxicilline), les carboxypénicillines (carbénicilline), les acyl-ureidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmécillinam).

❖ Les céphalosporines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle dihydrothiazidique. Elles sont constituées de 4 générations : 1^{ère} génération (Céfaloine), 2^{ème} génération (Céfoxitine), 3^{ème} génération (Céftriaxone) et 4^{ème} génération (Cefpirome).

❖ Les penèmes

Ils possèdent un noyau penème, constitués par les oxapenèmes, les sulfopenèmes et l'imipenème.

❖ Les monobactams

L'Aztreonam est le seule représentant de cette sous famille.

II.2. LES AMINOSIDES [59, 102]

Les Aminosides ou Aminoglycosides sont des hétérosides naturels ou hémi synthétiques qui agissent essentiellement en inhibant la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome. Cette fixation inhibe la traduction ou induit des erreurs de lecture du code génétique aboutissant à la synthèse de protéines anormales incompatibles avec la vie de la bactérie. Ce sont des antibiotiques bactéricides subdivisés en trois classes :

les aminosides de première génération : kanamycine

les aminosides de deuxième génération : Amikacine, Gentamicine, Tobramycine
les aminosides de troisième génération : Nétilmycine

II.3. LES MACROLIDES, LINCOSAMIDES ET STREPTOGRAMINES [55, 109]

Les Macrolides sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines ARN-dépendantes. Ils se lient de façon réversible à la sous unité 50S des ribosomes au niveau du site P. Ils empêchent ainsi le transfert du complexe peptidyl-ARNt depuis le site P vers le site A, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique. Les macrolides (tel que l'érythromycine), les Lincosamides (lincomycine) et Lynergistines (pristinamycine) ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, mycoplasmes et les bacilles négatifs anaérobies. Les molécules possèdent tous un macrocycle lactone, mais elles se différencient entre elles selon le nombre de chaînons que celui-ci comporte.

II.4. LES QUINOLONES [3]

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, possédant une structure de base comportant un cycle accolé à un hétérocycle pipérazine en position 7 et un atome de fluor en position 6. Ils inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur les topoisomérases, enzymes qui interviennent dans la bonne conformation de l'ADN empêchant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN bactérien. On distingue :

- Les quinolones de première génération ou non fluorés : actifs que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries et ne sont indiqués que dans le traitement des infections urinaires. (Exemple : acide nalidixique).

- Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones : Norfloxacin, Pefloxacin, Ciprofloxacine, Ofloxacine. plus récents et ont une plus grande activité par leur large spectre.
- Les quinolones de troisième génération (Sparfloxacine) : leur spectre d'activité concerne les Entérobactéries, les staphylocoques, les pseudomonas (inconstant) et pneumocoques pour sparfloxacine.

II.5. LES CYCLINES [24, 94]

Les tétracyclines inhibent la phase d'élongation de la synthèse protéique en empêchant la fixation du complexe [aminoacide-ARNt] sur le complexe [ARNm-ribosome]. D'autres mécanismes d'action sont également possibles dont une altération de la membrane cytoplasmique. C'est une famille d'antibiotiques à structure homogène ayant en commun un noyau naphtacène. Elles ont une activité bactériostatique mais un spectre d'activité assez large.

II.6. LES PHENICOLES [11, 101]

Comme les Macrolides et les Lincosamides, les Phénicolés se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe acide aminé -ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre qui couvre une grande variété de germes à gram négatif et à gram positif. Nous avons dans ce groupe le Chloramphénicol et le Thiamphénicol.

II.7. LES GLYCOPEPTIDES (VANCOMYCINE, TEICHOPLANINE) [101]

Les glycopeptides sont au même titre que les β -lactamines, des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne. Leur action est toutefois différente. Ils se fixent par leur fraction aglycone aux extrémités D-Ala-D-Ala du précurseur

lipopeptidique et inhibent, par l'encombrement stérique qu'ils créent, l'action subséquente de la transpeptidase et de la transglycosylase.

II.8. LES SULFAMIDES ET LA TRIMETHOPRIME [59, 102]

Ils agissent en inhibant la synthèse des folates et ont une action antimétabolite. L'acide folique nécessaire au métabolisme du DNA et certains acides aminés doivent être synthétisés par les bactéries car elles ne peuvent pas incorporer les folates exogènes. Ils inhibent compétitivement la dihydroptérate synthétase dont le substrat normal est l'acide para-aminobutyrique (P.A.B.).

III. LA RESISTANCE DES BACILLES GRAM NEGATIF AUX ANTIBIOTIQUES

III.1. NOTION DE RESISTANCE BACTERIENNE

Pour chaque antibiotique, est défini un spectre d'activité, c'est à dire l'éventail d'espèces bactériennes "sensibles" susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique surtout *in vivo* après utilisation de posologie standard. Une résistance est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie. De nombreuses définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques ont été retenues, selon différents critères utilisés. Selon les auteurs:

une souche est dite "résistante" lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce.

une souche est dite "résistante" lorsque la concentration qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la celle pouvant être atteinte *in vivo*.

une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique [27].

III.2. LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE [59, 69, 106]

III.2.1. La résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance. Elle a pour support génétique le chromosome bactérien mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes).

• Exemples

- *Klebsiella spp* produit naturellement des β -lactamases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne.
- les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage de ceux-ci à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies.

III.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. Elle a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était initialement faible. Elle n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible. A l'inverse de la résistance naturelle qui est caractéristique de l'espèce, la résistance acquise est évolutive et varie en fonction du temps, de

l'environnement et des conditions d'utilisation de l'antibiotique. L'acquisition de cette résistance peut être due soit à une mutation génétique soit par apport de matériel génétique étranger. La résistance acquise a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques d'où l'intérêt et la nécessité de réaliser des antibiogrammes.

III.2.3. La résistance clinique

La résistance clinique est la plus pertinente dans le cadre de la pratique médicale courante, puisqu'elle se traduit par l'échec clinique d'une antibiothérapie. Dans la majorité des infections, un échec clinique se traduit par l'absence d'amélioration de l'état général après environ 72 heures de traitement et la prescription d'un deuxième antibiotique. Plusieurs facteurs entrent en cause dans ce type de résistance:

- les facteurs environnementaux (cations, protéines inhibitrices etc...).
- la pharmacocinétique.
- le choix judicieux de l'antibiotique.
- les mécanismes développés par les bactéries.

III.3. LE DETERMINISME GENETIQUE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES [33, 47]

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué d'une part d'un génophore obligatoire ; le chromosome et d'autre part de un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques ; les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons.

Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides, les éléments

transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique.

III.3.1. La résistance chromosomique

La résistance chromosomique résulte d'une mutation dont elle présente tous les caractères. C'est un phénomène rare, dû au hasard. Elle n'est pas provoquée par la présence de l'antibiotique. Mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce ; celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique.

L'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle est transmissible, permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles).

III.3.2. La résistance extra-chromosomique

L'information génétique est portée par des plasmides transférables à d'autres bactéries par conjugaison, par transduction ou par transformation. L'ensemble de ces gènes peut être sur des fragments d'ADN appelés «transposons» qui peuvent s'intégrer soit dans des plasmides, soit dans le chromosome en allant de l'un à l'autre. Ce type de résistance est plus fréquemment rencontré en clinique humaine (près de 80% des résistances acquises). La résistance extra-chromosomique est contagieuse, se transmet horizontalement entre bactéries cohabitantes, même d'espèces différentes et peut concerner plusieurs antibiotiques voir plusieurs familles d'antibiotiques entraînant une polyrésistance. Cela est dû au fait qu'il est beaucoup plus rapide pour une

bactérie d'acquérir un gène de résistance plutôt que de développer une résistance par une série de mutations. [101]

La résistance plasmidique concerne la plupart des antibiotiques. Seuls y échappent les Rifamycines, les Polypeptides, les Nitrofuranes, les Quinolones et les Glycopeptides. Toutes les espèces bactériennes y sont sujettes. L'usage d'un seul antibiotique dont la résistance est codée par un gène du plasmide, sélectionne les souches résistantes à toutes les molécules dont le gène de résistance se trouve sur le plasmide; ce qui entraîne la sélection rapide de souches polyrésistantes.

III.4. MECANISMES BIOCHIMIQUES DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES [11, 101]

III.4.1. Diminution de la perméabilité et efflux actif

➤ Diminution de la perméabilité

Ce mécanisme qui existe que chez les bacilles à Gram négatif est utilisé par ceux-ci pour empêcher l'antibiotique de pénétrer dans la cellule. Une diminution de la perméabilité résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines. C'est chez *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Klebsiella* spp et *Pseudomonas aeruginosa* que ce mécanisme a le plus d'importance. Une ou plusieurs modifications des porines sont à l'origine d'une résistance acquise aux β -lactamines, aux Quinolones, au Chloramphénicol, aux Sulfamides, au Triméthoprime et aux Tétracyclines.

➤ Efflux actif

L'efflux repose sur une pompe insérée dans la membrane et est en mesure d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.

III.4.2. Modification de la cible des antibiotiques

La modification de la cible se produit lorsqu'un antibiotique donné ne peut plus se lier à la cible sur laquelle il agit habituellement. Il faut comprendre ce phénomène comme deux structures qui s'imbriquent parfaitement l'une dans l'autre en temps normal, mais dont la liaison est compromise lorsqu'une résistance apparaît.

L'impossibilité d'interaction avec la cible relève de plusieurs mécanismes entre autres [63]:

- apparition d'une nouvelle cible.
- cible modifiée par une enzyme.
- protection de la cible.
- augmentation du nombre de cibles anormales.
- disparition de la cible.

III.4.3. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques

Elle a été l'un des premiers mécanismes de résistance détecté. Ces 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 et les antibiotiques de la famille des Macrolides, Lincosamides et Streptogramines.

IV. LES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES EN THERAPEUTIQUE ANTI-INFECTIEUSE

L'étude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques d'une souche bactérienne responsable d'une infection est indispensable à la bonne conduite du traitement de celle-ci. Lors d'une infection mineure, l'antibiothérapie peut être simplement guidée par l'antibiogramme de la souche isolée. Cependant l'association d'antibiotiques peut être légitimée pour plusieurs raisons.

IV.1. LE BUT DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES [62,66]

Bien que l'urgence thérapeutique puisse être considérée comme un argument valable à la prescription d'une association, sa justification dernière passe par la réalisation *in vitro* sur la souche incriminée, des techniques d'études spécifiques. Les principales raisons bactériologiques à la mise en œuvre d'associations d'antibiotiques sont:

➤ Elargir le spectre antibactérien

Ce qui permet de traiter en première intention une infection sévère. Dans ce cas l'association de deux antibiotiques à spectre d'activité complémentaire sera instaurée après avoir effectué les prélèvements nécessaires au diagnostic. Elle pourrait être modifiée éventuellement en fonction des résultats bactériologiques obtenus ; Ou encore pour traiter une infection plurimicrobienne où un seul antibiotique ne peut pas être actif sur l'ensemble de la population bactérienne; c'est le cas notamment des infections à localisation ouverte (broncho-pulmonaire, digestive ou gynécologique).

➤ Obtenir un effet synergique pour renforcer la bactéricidie

La gravité de l'infection, qu'elle soit liée à un terrain particulièrement compromis, ou à un germe particulièrement résistant, ou à un site particulièrement difficile d'accès, peut nécessiter un renforcement et/ou une accélération de la vitesse de la bactéricidie. Dans de telles situations, les Aminosides démontrent une importante activité lorsqu'elles sont associées à une β -lactamine ou à une Fluoroquinolone. Les résultats thérapeutiques sont le plus souvent corrélés à l'action de l'association étudiée *in vitro*, sur la souche bactérienne à l'origine du syndrome infectieux.

Les effets synergiques sont plus souvent attendus lorsque la souche est sensible à chacun des deux antibiotiques de l'association, ou lorsqu'elle est de sensibilité

intermédiaire à l'un d'entre eux. Mais ces effets peuvent aussi être obtenus lorsque la souche est sensible à l'un des antibiotiques et résistante à l'autre. Ils sont rares lorsque la souche est résistante aux deux antibiotiques. En revanche, les effets antagonistes mis en évidence *in vitro* sont rarement démontrés en thérapeutique.

➤ **Prévenir l'émergence des mutants résistants**

Les facteurs favorisant l'émergence des bactéries résistantes sont dépendants soit de l'espèce bactérienne soit de l'antibiotique utilisé. Certains antibiotiques (Fosfomycine, Acide fusidique, Rifamycine, Quinolones) dont les mécanismes de résistance sont le plus souvent de déterminisme chromosomique, sont l'objet d'une fréquence de mutation élevée vers la résistance. Cette résistance s'exprimera d'autant plus rapidement par l'émergence de mutants résistants au cours même de la thérapeutique, que la concentration bactérienne au site de l'infection sera importante. L'utilisation de ces antibiotiques ne peut se concevoir qu'en association. Deux phénomènes apparaissent:

Certains bacilles à Gram négatif, surtout rencontrés dans les infections nosocomiales, sont naturellement producteurs d'une céphalosporinase de déterminisme chromosomique inductible. Celle-ci est habituellement produite en faible quantité dans l'espace périplasmique et son taux augmente considérablement sous l'effet des β -lactamines inductrices, comme dit précédemment. Ce phénomène est à l'origine de la résistance dite naturelle des souches, aux Aminopénicillines, aux Céphalosporines de première génération, et parfois de deuxième génération.

Certaines souches, sous l'effet de la pression sélective exercée par les β -lactamines, font l'objet d'une mutation au niveau du système de régulation de la synthèse de céphalosporinase; elle est alors synthétisée à haut niveau, de façon constitutive, c'est à dire même en l'absence d'antibiotique. Ces souches sont alors résistantes à l'ensemble des β -lactamines, y compris les Céphalosporines de troisième génération.

Les conséquences de ces phénomènes de résistance permettent d'expliquer de nombreux échecs thérapeutiques sur des bactéries initialement sensibles.

L'administration concomitante d'un Aminoside, d'une Quinolone pourrait permettre de limiter l'émergence de souches produisant des Céphalosporines inductibles, susceptibles de se déréprimer. Il faut dans tous les cas éviter d'associer deux β -lactamines sensibles aux β -lactamases. De même, il faudra éviter deux β -lactamines dont l'une est connue comme inductrice et l'autre sensible aux céphalosporinases.

Cependant il faut savoir que la bithérapie n'est pas une garantie absolue dans la prévention de l'émergence de mutants résistants, même s'il existe *in vitro* une synergie entre les deux antibiotiques associés.

➤ **Diminuer la toxicité des médicaments**

Il consisterait à baisser la dose de chacun des antibiotiques à associer afin de baisser la toxicité de ceux-ci. Cependant cet objectif reste parfois illusoire en thérapeutique puisque chacun des antibiotiques doit être utilisé aux doses préconisées par l'AMM.

IV.2. LE CHOIX DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES ET LEURS REGLES D'UTILISATION [62]

IV.2.1. Critères de choix des associations d'antibiotiques

Le choix des antibiotiques entrant dans une association s'effectue en fonction de la nature du germe, plus précisément des résultats de l'antibiogramme standard, de la localisation de l'infection, de leur capacité à diffuser dans le foyer infectieux, de la voie d'administration souhaitée mais aussi des risques toxiques et des effets secondaires liés à l'état du malade. Le crible imposé par ces différents paramètres limite le plus souvent ce choix à quelques couples seulement. La connaissance de travaux généraux antérieurs sur le comportement en association de groupes d'antibiotiques ou molécules restreint et guide l'éventail des possibilités offertes.

IV.2.2. Règles d'utilisation des associations d'antibiotiques

En pathologie infectieuse, pour qu'une association soit considérée comme rationnelle, il faut qu'elle réponde à trois conditions. La première, bactériologique, doit s'employer à démontrer l'effet synergique *in vitro* de l'association sur la souche responsable de l'infection. La seconde, pharmacologique, doit définir le mode d'administration et la posologie des deux molécules pour une meilleure diffusion au sein du foyer infectieux. La troisième, anatomo-clinique doit prouver *in vivo*, la supériorité de l'association face à une simple monothérapie avec l'un quelconque des antibiotiques. Des schémas d'utilisation pratiques ont été proposés par Jawetz et Gunnisson qui séparent les antibiotiques en deux groupes:

les antibiotiques bactériostatiques dans les conditions normales d'utilisation comme les Phénicolés, les Cyclines et les Macrolides.

les antibiotiques bactéricides sur les germes en phase quiescente comme les Aminosides ou les Polypeptides et ceux qui agissent seulement en phase de multiplication comme les β -lactamines ou la Vancomycine.

Dans ces conditions trois règles générales d'associations peuvent être stipulées:

l'association de deux antibiotiques bactéricides provoque le plus souvent une synergie, ou une addition simple mais jamais un antagonisme.

l'association de deux antibiotiques bactériostatiques ne détermine ni synergie, ni antagonisme, mais le plus souvent l'addition ou l'indifférence.

l'association d'un antibiotique bactériostatique avec un antibiotique bactéricide entraîne des effets variables selon le mode d'activité de ce dernier. S'il est bactéricide en phase quiescente, l'association entraîne une addition, s'il est bactéricide en phase de croissance uniquement, elle aboutit à un antagonisme.

Comme la plupart des lois, celle de Jawetz et Gunnisson présente des exceptions, que voici :

les associations Triméthoprime-Sulfamide sont synergiques alors que ces deux antibiotiques sont bactériostatiques.

les associations Macrolide-Chloramphénicol ou Macrolide-Lincosamide ou Macrolide-Macrolide sont antagonistes alors que tous ces antibiotiques sont bactériostatiques.

Ces préceptes généraux, aussi intéressants qu'ils soient, cernent mal le comportement spécifique des différentes espèces bactériennes. Cependant ces lois sont un guide destiné à éviter les erreurs grossières notamment celles conduisant à des associations antagonistes comme l'association d'une β -lactamine avec une Tétracycline ou avec un Macrolide ou avec un Phénicolé.

IV.3. DEFINITION DES INTERACTIONS DANS UNE ASSOCIATION

Les effets antibactériens des associations d'antibiotiques sont généralement définis par les quatre possibilités d'interactions suivantes:

La synergie

L'effet est significativement supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration. Divers mécanismes peuvent expliquer les interactions synergiques.

Synergie des associations β -lactamines et Aminocyclitolides, liée à une augmentation de la perméabilité de la paroi bactérienne aux Aminocyclitolides.

Synergie des β -lactamines possédant des sites différents de fixation aux PLP: Ampicilline, Pivmécillinam;

Synergie par compétition d'affinité pour une enzyme de type β -lactamase: Pénicilline ou Ampicilline et Cloxacilline, Amoxicilline et Acide Clavulanique;

Synergie par inhibition séquentielle d'une même voie métabolique: Sulfaméthoxazole et Triméthoprime.

L'addition

L'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration que dans l'association.

L'indifférence

L'activité de l'un des antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre.

L'antagonisme

L'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des antibiotiques. Son activité est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique pris indépendamment. Les effets antagonistes peuvent résulter des interactions suivantes:

- l'association Chloramphénicol et Macrolides entraîne une compétition de ces deux molécules pour le même site de fixation sur la sous-unité 50S du ribosome.
- l'association Aminosides et Tétracyclines ou Chloramphénicol, dont l'antagonisme serait lié à l'inhibition du transport actif de l'Aminoside dans la bactérie.
- Certaines associations de β -lactamines sont antagonistes lorsque l'une des β -lactamines est inductrice d'une β -lactamase, c'est le cas pour la Céfoxitine et la Ceftazidime ou le Céfamandole.

In vitro la caractérisation de ces interactions dépend de la précision des méthodes utilisées. C'est pourquoi les effets indifférents et additifs traduisant une faible interaction n'y sont pas toujours différenciés.

IV.4. METHODES D'ETUDE DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES [38, 72, 82, 87, 105]

Il existe plusieurs méthodes d'études des associations d'antibiotiques pouvant être regroupées en deux catégories: les techniques d'étude par diffusion et les techniques d'étude par dilution en milieu liquide.

IV.4.1. Les techniques d'étude par diffusion

Deux bandes de papier buvard chargées d'antibiotiques A et B sont disposées en angle droit sur un milieu gélosé préalablementensemencé par flottage avec la bactérie à tester. Après incubation à 37°C, nous obtenons une zone d'inhibition linéaire parallèle à chaque bande. L'angle formé par l'intersection de ces zones d'inhibition revêt divers aspects permettant de définir l'interaction des molécules A et B associées.

Une variante de la technique précédente est appelée « transfert sur cellophane»: deux bandes de papier filtre imprégnées d'une solution d'antibiotique sont disposées en angle droit sur un milieu gélosé nonensemencé. Après diffusion des antibiotiques, les bandes sont enlevées et on dispose sur la gélose une cellophane préalablementensemencée avec la souche bactérienne. Au cours de l'incubation, les bactéries se multiplient directement sur la cellophane sauf dans les endroits où les concentrations en antibiotiques inhibent la croissance. Il est ainsi possible d'observer l'effet bactériostatique de l'association sur la souche bactérienne. La cellophane est ensuite transférée sur une gélose dépourvue d'antibiotique et après une nouvelle période d'incubation on note la croissance des bactéries survivantes. La croissance ou l'absence de croissance dans les zones de diffusion et d'intersection après transfert permet d'évaluer l'activité bactéricide de chaque antibiotique et de leur association.

IV.4.2. La technique E-test® [57]

Le test de l'Epsilon ou E-test® est une méthode de diffusion en gélose pour la réalisation des tests de sensibilité aux antibiotiques. Une bande plastique recouverte d'un gradient continu de la concentration d'antibiotiques et d'une échelle d'interprétation est placée à la surface d'une gélose inoculée avec la bactérie à tester. La boîte est ensuite incubée pendant une nuit. Une zone d'inhibition de la croissance bactérienne, de forme elliptique sera formée autour de la bandelette E-test®. La concentration minimale inhibitrice sera ensuite lue à l'intersection de la zone avec la bande. Pour l'étude des associations d'antibiotiques par cette méthode, les bandelettes E-test® sont placées en formant un angle de 90 degrés sur une gélose déjà inoculée avec la bactérie à l'intersection de leur CMI respectifs pour l'organisme. Après incubation une zone d'inhibition sera formée et permettra de définir les interactions dans une association.

IV.4.3. Les techniques d'étude par dilution en milieu liquide

IV.4.3.1. Technique simplifiée pour la pratique clinique

Une même quantité de bouillonensemencé avec la bactérie à étudier à une concentration de l'ordre de 10^6 germes par ml est répartie dans une série de tubes à hémolyse disposés selon un « schéma triangulaire ». Dans chaque tube, l'adjonction de disques imprégnés d'antibiotiques, en quantité convenable, permet d'obtenir les concentrations désirées des antibiotiques à étudier, isolément et en association. Ces concentrations sont comprises dans des limites humorales efficaces établies pour chacun des antibiotiques. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la numération des germes survivants, dans chaque tube ne présentant pas de pousse visible, permet de déterminer l'effet bactériostatique et l'action bactéricide des antibiotiques isolés et de leur association. Le pourcentage de germes survivants est déterminé par simple comparaison de la

densité des colonies survivantes aux antibiotiques à la densité des colonies obtenues avec l'inoculum initiale (témoin inoculum).

IV.4.3.2. La technique de « l'Echiquier » [82]

C'est la technique que nous avons utilisée dans le cadre de l'étude que nous avons menée. C'est une méthode qui permet de quantifier les interactions de deux antibiotiques A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentration de chacun de ces deux antibiotiques. Les concentrations de A et B utilisées représentent habituellement une progression géométrique de raison 2, des dilutions de 1,5 peuvent être nécessaires, pour une quantification plus précise des interactions. Ainsi les différentes concentrations de chaque antibiotique A et B sont associées entre elles deux à deux. Chaque concentration d'un antibiotique est associée à chacune des concentrations de l'autre antibiotique. Après ensemencement avec la bactérie à étudier et incubation à 37°C, les concentrations pour lesquelles se produisent une inhibition de la croissance bactérienne c'est-à-dire l'effet bactériostatique sont notées et les interactions définies avec des calculs.

V. LE CONTROLE DE QUALITE [28]

La fiabilité des résultats obtenus est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. Le domaine de la qualité utilise un vocabulaire spécifique qu'il est important de maîtriser pour tout biologiste. Pour cela il convient de se reporter aux définitions de la norme ISO 8402 version 1994 et du Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale pour les termes suivants:

Qualité: l'aptitude d'un produit, d'un procédé ou d'un service rendu, à satisfaire les besoins exprimés et implicites de l'utilisateur.

Contrôle de qualité: Ensemble des procédures mises en œuvre dans un laboratoire, en vue de permettre un contrôle de qualité des résultats des analyses au fur et à mesure de leur exécution.

Validation : Opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes et tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

Echantillon de contrôle : Échantillon adapté à la méthode utilisée et destiné à apprécier l'exactitude et la précision des résultats.

Autres critères de qualité

Les autres critères de qualité d'un test diagnostique sont les suivants :

la fiabilité : le résultat est-il correct ?

la reproductibilité : obtient-on le même résultat lorsqu'on répète le test ?

la rapidité: le test est-il suffisamment rapide pour être utile ?

le rapport coût-avantage : le coût du test est-il raisonnable au regard des avantages qu'il présente pour la communauté ?

VI. QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION [7, 37, 56, 70]

VI.1. CORRELATION ET DROITE DE REGRESSION

VI.1.1. Notion de corrélation

La corrélation consiste à mesurer le degré d'association existant entre deux caractères. Pour calculer le coefficient de corrélation entre 2 variables, cela revient à résumer la liaison qui existe entre les variables à l'aide d'une droite. On parle alors d'un ajustement linéaire.

Pour calculer les caractéristiques de cette droite, il faut faire en sorte que l'erreur que l'on commette en représentant la liaison entre nos variables par une droite, soit la plus petite possible. Le critère formel le plus souvent utilisé, mais pas le seul possible, est de minimiser la somme de toutes les erreurs effectivement commises au carré. On parle alors d'ajustement selon la méthode des moindres carrés ordinaires. La droite résultant de cet ajustement s'appelle une droite de

régression. Plus la qualité globale de représentation de la liaison entre nos variables par cette droite est bonne, et plus le coefficient de corrélation linéaire associé l'est également. Il existe une équivalence formelle entre les deux concepts.

$$r = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N\sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

VI.1.2. Droite de régression

Dans les cas où le diagramme de dispersion montre l'existence d'une relation linéaire, on désire déterminer la droite qui décrira le mieux cette relation.

Cependant, le choix de cette droite dépend d'un critère qu'il faudra fixer. Le critère mathématique est celui des moindres carrés. Selon ce critère, on cherche à minimiser la somme des carrés des écarts entre les valeurs estimées et les valeurs observées de la variable dépendante.

En formule la droite de régression sera donnée par :

$$y' = ax + b$$

Avec :

x = la valeur de la variable indépendante

y' = la valeur estimée de la variable indépendante

b = l'ordonnée à l'origine

a = la pente

VI.2. LIMITE DE DETECTION

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart type de précision, mesuré sur le blanc. Si le nombre de valeur $LD = 30$, la valeur de 3 est retenue pour k .

$$LD = S \times k$$

LD = limite de détection

S = écart-type

K = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

VI.3. PRECISION

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactério-virologie de l'Hopital Aristide le Dantec ; un des premiers Centre Nationaux Hospitaliers Universitaires (CNHU) de Dakar et au laboratoire de Bacteriologie-Virologie fondamentale appliquée de l'UCAD II.

I. MATERIEL

I.1. SOUCHES BACTERIENNES

Les souches ont été choisies parmi celles préalablement identifiées et conservées au laboratoire à une température de -20°C. Nous avons utilisé des souches de référence:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

I.2. MATERIEL DE LABORATOIRE

I.2.1. Le matériel pour l'étude de la sensibilité

Le matériel que nous avons utilisé pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques est le suivant :

- des boîtes de pétri
- des écouvillons stériles
- des tubes à hémolyse
- de l'eau physiologique stérile
- une pince
- des disques imprégnés d'antibiotiques : Piperacilline, Colistine, Ampicilline, Sulfametoazole + piriméthamine, Cefepime , Pefloxacine , Cefoxitine, Lexofloxacine, Chloramphénicol, Imipeneme, Aztreonam, Amikacine, Amoxicilline +Acide Clavulanique, Tobramicyne, Ceftriaxone.

- des bandelettes E-test® imprégnées des antibiotiques suivants: Ceftriaxone, Amoxicilline, Cefotaxime, Ciprofloxacine, Levofloxacine

I.2.2. Le matériel pour la réalisation des associations d'antibiotiques

Pour réaliser les associations d'antibiotiques, nous avons utilisé les antibiotiques suivants: Ceftriaxone (CRO), Amikacine (AMK), Ampicilline (AMP), Gentamicine (GEN), Ciprofloxacine (CIP).

Nous avons ensuite eu besoin du matériel suivant:

- des plaques de microtitration à 96 puits et leur couvercle : Ce sont des plaques de microtitration CORNING stériles à conditionnement unitaire et à usage unique. Elles nous ont permis d'incuber l'ensemble des antibiotiques incorporé dans l'AM3 et l'inoculum bactérien.
- un répliqueur : Il nous a permis de transvaser le deuxième antibiotique dans la microplaque après avoir mis le premier
- un plateau en fer inoxydable afin d'y disposer les plaquesensemencées prêtes à être incubées dans l'étuve à 37°C
- un miroir-plan qui nous a permis de visualiser le changement de coloration, ou le trouble lors d'une culture positive
- des tubes NUNC qui ont été utilisés pour la conservation des souches et des solutions mères d'antibiotiques à - 20 ou -80°C
- des tubes coniques et tubes à hémolyse stériles de 10 ml : Ils nous ont permis de faire les dilutions d'antibiotiques
- une pipette automatique simple manuelle délivrant des volumes de 20 à 200µl
- une pipette multiple délivrant des volumes de 20 à 200µl
- des embouts stériles
- des bacs à canaux

- de matériel divers à savoir : portoirs, seringues de 10cc, filtres de 22µm, bec bunsen, anse de platine, bécher rempli d'eau de javel, papier buvard, pH mètre, étuve à 37°C avec sa sonde

I.3. MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

I.3.1. Milieux de culture

I.3.1.1. L'Antibiotic Medium 3 (AM3)

Nous avons utilisé ce milieu pour réaliser les associations d'antibiotiques. Nous y avons incorporé 17,5g de poudre déshydratée d'AM3 et au besoin 20ml de rouge de phénol à 1% et 2g de glucose pour 500ml et nous avons ajusté le pH à 7. Nous rappelons que le rouge de phénol est un indicateur coloré dont la zone de virage se situe aux environs de la neutralité. Il vire au jaune pour un pH inférieur à 6,2 et au rouge pourpre pour un pH supérieur à 8. Le glucose contenu dans le milieu est quant à lui consommé par les bactéries appartenant aux Entérobactéries entraînant une acidité et un virage du milieu en cas de pousse. Cependant pour *Pseudomonas aeruginosa*. Le rouge de phénol n'a pas été ajouté au milieu car cette bactérie ne fermente pas le glucose contrairement aux Entérobactéries par conséquent un virage de l'indicateur au jaune ne pouvait être observé. La pousse est notée par un simple trouble du milieu.

Une fois le pH du milieu ajusté, la stérilisation est effectuée à l'autoclave entre 115 – 120°C pendant 40 minutes. Ensuite le milieu est conservé à 4°C.

I.3.1.2. Autres milieux de culture (voir annexes)

D'autres milieux ayant servi à l'isolement à l'antibiogramme et au contrôle des souches ont également été utilisés :

- gélose Mueller-Hinton
- Eosine Méthylène Blue (EMB)
- gélose trypto-caseine soja
- Tous les milieux sont autoclavés selon le protocole précédant.

I.3.2. Réactifs

I.3.2.1. Solutions tampons

Les solutions tampons avec leur composition, qui ont été utilisées sont les suivantes :

Tampon Phosphate pH8		Tampon Phosphate pH6	
Phosphate monosodique	0,0524g	Phosphate monosodique	8g
Phosphate dipotassique	1,6730g	Phosphate dipotassique	2g

Pour chaque tampon, les différentes quantités pesées sont dissoutes dans 100ml d'eau distillée stérile. Le pH est ajusté selon les besoins avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1N ou de la soude NaOH. Ces tampons sont ensuite autoclavés, comme pour les milieux de culture à 120°C pendant 40 minutes puis conservés au réfrigérateur à 4°C.

I.3.2.2. Solutions mères d'antibiotiques

Concernant la préparation des solutions mères d'antibiotiques, il faut noter que certaines poudres d'antibiotiques ne sont pas pures. Le fabricant, en tenant compte des degrés d'impureté a indiqué l'activité spécifique de la poudre. De ce fait deux variantes d'une même formule nous ont permis de déterminer soit la masse de poudre soit le volume de solvant à utiliser :

$$\text{Masse (g)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration désirée } (\mu\text{g/ml})}{\text{Activité spécifique } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Masse (g)} \times \text{Activité spécifique } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentration désirée } (\mu\text{g/ml})}$$

La masse de poudre ainsi déterminée est diluée soit dans un tampon, soit dans de l'eau distillée selon les antibiotiques. Les solvants et diluants utilisés pour la confection de chaque solution mère d'antibiotique sont représentés dans le **TABLEAU II**.

TABLEAU II : Solvants et diluants des antibiotiques [27]

Antibiotiques	Solvants	Diluants
Ciprofloxacine	Eau distillée	Eau distillée
Gentamicine	Eau distillée	Eau distillée
Amikacine	Eau distillée	Eau distillée
Ampicilline	Tampon phosphate pH8	Tampon phosphate pH6
Ceftriaxone	Eau distillée	Eau distillée

La quantité de poudre ou de solvant une fois obtenue, a permis de préparer la solution mère d'antibiotique de concentration finale égale à 10,240mg/ml. Celle-ci est homogénéisée, filtrée, aliquotée puis congelée à -80°C avant son utilisation.

II. ASSURANCE QUALITE

II.1. CONTROLE DES SOUCHES

Par mesure de sécurité, la réidentification des souches bactériennes est réalisée avant chaque manipulation. Le schéma habituel pour l'identification des souches bactériennes au laboratoire est utilisé. En effet après réisolement sur des géloses ordinaires, un examen à l'état frais est effectué puis une coloration de Gram. Enfin nous avons utilisé, pour l'identification, des galeries classiques complétées par des minigalleries pour les Entérobacteries.

II.2. CONTROLE DES MILIEUX

Avant d'utiliser chaque milieu de culture, il a fallu s'assurer de sa qualité. Ainsi nous avons effectué un contrôle de la qualité, de la stérilité et de l'efficacité de chaque milieu. S'assurer de la stérilité d'un milieu est nécessaire avant toute utilisation. Pour ce faire un volume équivalent à 2ml de celui-ci est prélevé en tube stérile, puis sans inoculum, il est incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Le milieu est considéré comme stérile s'il y a eu absence de pousse.

Quant à l'efficacité du milieu, elle se traduisait par la capacité de celui-ci à virer, témoignant d'une pousse. Pour cela il est ensemencé avec des souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 puis placé à l'étuve à 37°C. S'il y'a pousse le milieu est considéré comme efficace.

II.3. CONTROLE DE QUALITE

Afin de valider la qualité de nos résultats, nous avons effectué un contrôle de qualité sur les souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Nous avons déterminé les CMI pour différents antibiotiques grâce à la technique de l'E-test® décrite précédemment dans les généralités et nous les avons comparées aux intervalles de CMI acceptable.

II.4. ANTIBIOGRAMME DE CONTROLE

Pour valider l'exactitude de nos résultats, nous avons effectué des contrôles à l'aide d'un antibiogramme standard avant chaque manipulation.

II.4.1. Principe

Un antibiogramme consiste à mettre en contact un panel d'antibiotiques avec une bactérie. Il permet de savoir comment une bactérie donnée réagit à un antibiotique grâce aux diamètres d'inhibition de la croissance. L'antibiogramme permet de

mesurer aussi la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne. Il permet donc de jauger l'efficacité d'un antibiotique. Le résultat pratique étant la classification de la bactérie dans l'une des catégories suivantes vis-à-vis de l'antibiotique : Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R).

II.4.2. Technique (selon recommandations CA-SFM)

Nous avons effectué l'antibiogramme sur un milieu gélosé Mueller Hinton. Une suspension d'opacité correspondant à 0,5 sur l'échelle de Mc Farland à partir d'une culture de 24heures de la bactérie à étudier est d'abord préparée. Elle est ensuite diluée au $1/10^{\text{em}}$ puisensemencée sur la gélose pour l'antibiogramme. L'ensemencement est fait au moyen d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne diluée préparée auparavant. Cet écouvillon est passé sur toute la surface de la gélose afin de s'assurer d'une bonne distribution de l'inoculum bactérien. Des disques de papiers buvard imprégnés des antibiotiques à tester sont ensuite déposés à la surface du milieu gélosé au moyen d'un distributeur. Enfin le tout est incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

II.4.3. Lecture et interprétation

Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition (en millimètres) pour chaque antibiotique, correspondant à une absence de culture est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe. Dans ce cas les interprétations qui peuvent être faites sont les suivantes :

- si le diamètre mesuré est inférieur à celui correspondant au diamètre critique supérieur; la souche est Résistante.
- si le diamètre mesuré est supérieur à celui correspondant au diamètre critique inférieur ; la souche est Sensible.
- si le diamètre mesuré est compris entre ceux correspondant aux diamètres critiques ; la souche est de sensibilité Intermédiaire.

III. METHODE

Le pouvoir synergique des différentes associations d'antibiotiques peut être visualisé et quantifié au laboratoire par la technique que nous avons utilisé à savoir celui de «l'Echiquier». Cette dernière permet d'évaluer le pouvoir bactériostatique et bactéricide des antibiotiques mis en association sur une bactérie donnée. Plusieurs étapes sont nécessaires pour ce faire.

III.1. DETERMINATION DES CMI EN MILIEU LIQUIDE PAR LA METHODE DE DILUTION

Pour tester le pouvoir synergique des associations d'antibiotiques sur une bactérie donnée, il était nécessaire de connaître les CMI respectifs de chaque antibiotique vis-à-vis de la bactérie afin de centrer sur les gammes de concentrations à associer. La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance visible à l'œil nu. Nous avons alors déterminé les CMI des souches pour chaque antibiotique par la méthode de dilution en milieu liquide. Nous avons préparé dans une série de tubes à hémolyse une gamme de concentrations croissantes de l'antibiotique à tester. Une même quantité d'un inoculum bactérien, avec une opacité correspondant à 0,5 sur l'échelle de Mc Farland est incorporée dans chaque tube. Le tout est enfin incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. Au lendemain le tube avec la plus faible concentration qui empêche une pousse visible de la bactérie à l'œil nu est relevé. Cette concentration correspond à la CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la bactérie testée. Les CMI et profils de sensibilité obtenus en milieu liquide sont comparés à ceux de l'antibiogramme standard afin de valider la qualité de nos résultats. Les antibiotiques testés sur chacune des bactéries sont les suivants : Ampicilline, Ceftriaxone, Ciprofloxacine, Gentamicine, Amikacine.

III.2. APPRETEMENT DES MICROPLAQUES DE SENSIBILITE

Le schéma carré permet l'étude la plus complète de l'association de deux antibiotiques car il met en évidence deux gammes de dilution serrée de chacune des molécules de façon à ce que l'une quelconque des concentrations d'un antibiotique se trouve combinée avec toutes les concentrations de l'autre et inversement. Il est nécessaire que soit connue la CMI de chaque antibiotique sur la bactérie surtout s'il s'agit de bactérie résistante à étudier afin de centrer sur ces valeurs respectives chacune des gammes de dilution.

Ainsi soit l'association d'antibiotiques A et B sur une souche bactérienne X, différentes étapes sont nécessaires pour réaliser cette association.

III.2.1. Préparation des solutions d'antibiotiques

Arbitrairement, la plus forte concentration testée de l'antibiotique A est fixée à 16 fois la CMI de A sur la souche X et la plus forte concentration de l'antibiotique B fixée à 8 fois la CMI de B sur la même souche. Deux solutions en AM3 de chaque antibiotique sont alors préparées : une première titrée à 4 fois la concentration maximale à étudier (soit 64 fois la CMI pour l'antibiotique A et à 32 fois pour l'antibiotique B) et l'autre à 2 fois la concentration maximale à étudier (soit 32 fois la CMI pour l'antibiotique A et à 16 fois la CMI pour l'antibiotique B).

III.2.2. Préparation des gradients de concentration dans la microplaque

100µl de bouillon AM3 sans antibiotique sont distribués dans toutes les cupules à l'aide de la pipette multiple excluant la rangée A et la colonne 1.

100µl de la solution d'antibiotique A à 4 fois la concentration maximale désirée sont déposés dans les cupules de H à B de la colonne 12. Le contenu des cupules de la colonne 12 est alors dilué de 2 à 2 jusqu' à la colonne 2.

La gamme de dilution de l'antibiotique B est préparée dans le réplicateur de la même façon en excluant la rangée A et la colonne 1. Le dépôt s'est effectué dans les cupules de la rangée H et s'étage de H en B en dilution.

Une fois terminées ces opérations de dilution, le contenu du réplicateur est transféré dans la microplaque. Les gammes de concentrations de l'antibiotique B se mélangent à celles de A. Après vidange complète du réplicateur, chaque cupule de la microplaque contient un volume final de 200 μ l.

Les puits de la colonne 1 et de la rangée A sont ensuite remplis avec 200 μ l de bouillon AM3. Puis 200 μ l de l'antibiotique B à deux fois la concentration finale maximale sont déposés dans la cupule H de la colonne 1 ou s'est effectué une dilution de raison 2 jusqu'à la cupule B. Les 200 μ l en excès sont rejetés.

Il a est procédé de la même sorte avec l'antibiotique A sur la rangée A de la cupule 12 jusqu'à la cupule 2.

La cupule A 1 restée libre reçoit 200 μ l de bouillon AM3 sans antibiotique et sert de témoin de culture.

Ainsi dans les 96 puits de la microplaque, chacune des dilutions de l'un des antibiotiques est réparti seul ou en association avec chacune des dilutions de l'autre antibiotique. Les gammes de concentration sont réalisées selon une progression géométrique de raison 2 et le volume final dans chaque cupule est de 200 μ l. La **figure 1** résume l'ensemble des opérations

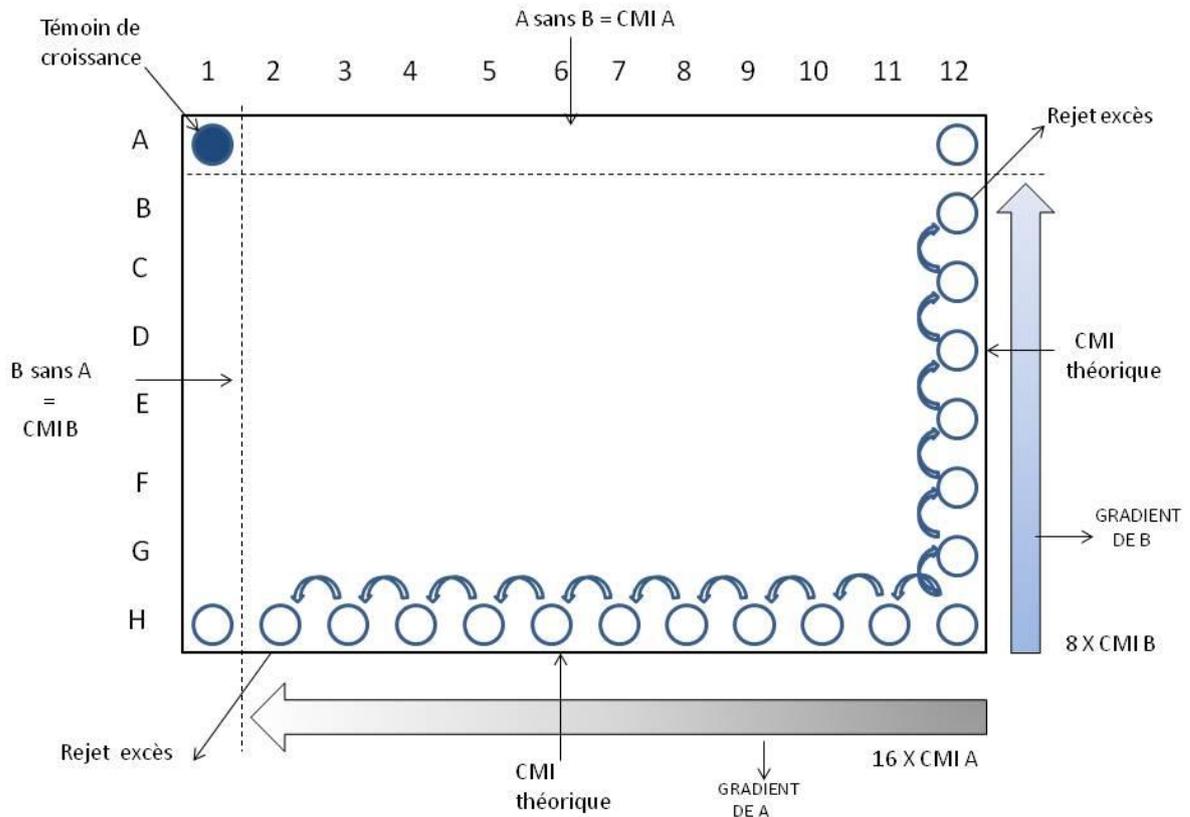


Figure 1 : Représentation schématique de la microméthode échiquier: préparation des gradients de concentration dans la plaque

Ainsi le pouvoir synergique des associations d'antibiotiques suivantes a pu être évalué sur les bactéries choisies :

➤ **Escherichia coli**

- Ampiciline – Gentamicine : AM – GEN
- Ceftriaxone – Gentamicine : CRO – GEN
- Ceftriaxone – Amikacine : CRO – AMK
- Ceftriaxone – Ciprofloxacine : CRO – CIP

➤ **Pseudomonas aeruginosa**

- Ceftriaxone – Amikacine : CRO – AMK
- Ceftriaxone – Ciprofloxacine : CRO – CIP
- Ciprofloxacine – Amikacine : CIP – AMK
- Ciprofloxacine – Gentamicine : CIP – GEN

III.2.3. Préparation de l'inoculum et ensemencement des plaques

L'inoculum est préparé en réalisant une suspension de 4 à 5 colonies bien isolées au moyen d'une anse de platine, obtenues à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h. Cette suspension de germes est préparée extemporanément à partir d'eau physiologique de manière à obtenir une suspension d'opacité équivalente à 0,5 Mac Farland soit une concentration finale de 10^7 Unités Formant Colonies/ml (UFC/ml) de la souche à étudier sous un volume de 50 ml. Afin d'approcher le mieux possible de la concentration désirée,

L'inoculum obtenu est par la suite transvasé dans les bacs à canaux. L'ensemencement est réalisé grâce à la pipette multiple avec un volume de 20 μ l dans chacune des 96 puits de la microplaque. Une fois l'ensemencement effectué, les plaques sont incubées à 37°C pendant 18h à 24h.

III.3. RESULTATS ET INTERPRETATION

III.3.1. Lecture

La pousse est appréciée en fonction des bactéries étudiées. Lorsqu'il s'agit d'une Entérobactérie ; le glucose contenu dans le milieu est consommé par les bactéries, se traduisant par un phénomène d'acidification du milieu avec virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune. Lorsqu'il s'agit par contre de la bactérie non fermentaire, l'indicateur coloré n'est pas incorporé dans le milieu de culture ; la pousse se traduit par un simple trouble du milieu.

III.3.2. Interprétation

Dans chaque rangée et dans chaque colonne, les plus faibles Concentrations Inhibitrices (CI) de chaque antibiotique sont relevées et rapportées à la CMI, ce qui permet de définir un index FIC (pouvoir bactériostatique de l'association) = CI/CMI des deux antibiotiques en association qui égal à :

$$\text{FIC index} = \text{FIC A} + \text{FIC B} = \frac{\text{CI(A) en combinaison avec B}}{\text{CMI A}} + \frac{\text{CI (B) en combinaison avec A}}{\text{CMI B}}$$

Cet index est calculé dans chaque rangée, mais seul le FIC index le plus bas est considéré comme caractéristique de l'association. Pour que l'association soit considérée comme synergique, il faut que le FIC index soit inférieur ou égal à 0.75.

D'un point de vue pratique, nous concevons que sur le plan pharmacocinétique, deux antibiotiques associés et synergiques conservent plus longtemps leur activité antibactérienne au niveau du foyer infectieux ou l'acquièrent lorsqu'ils diffèrent in situ d'une concentration inférieure à leur CMI. A noter qu'un index FBC (pouvoir bactéricide de l'association) peut être calculé de la même façon avec les concentrations bactéricides et permet de mesurer le pouvoir bactéricide de l'association.

Une représentation graphique de l'activité de l'association d'antibiotiques dite ISOBOLOGRAMME peut être faite. Elle traduit l'expression graphique de la fonction index FIC. C'est une courbe d'activité antibactérienne obtenue en portant en abscisse FIC (A) et en ordonnée FIC (B). Elle représente également le résultat obtenu en microplaque. En cas de synergie et d'addition l'isobologramme prend une forme plus ou moins concave se rapprochant de l'origine. En cas d'indifférence et d'antagonisme, l'isobologramme tend à s'éloigner de la droite de démarcation addition-indifférence joignant FIC (A)= 1 à FIC (B) = 1, selon une courbe de plus en plus convexe **Figure 2**. Le

logarithme des concentrations inhibitrices peut également être utilisé à la place des valeurs de FIC et donne le même profil.

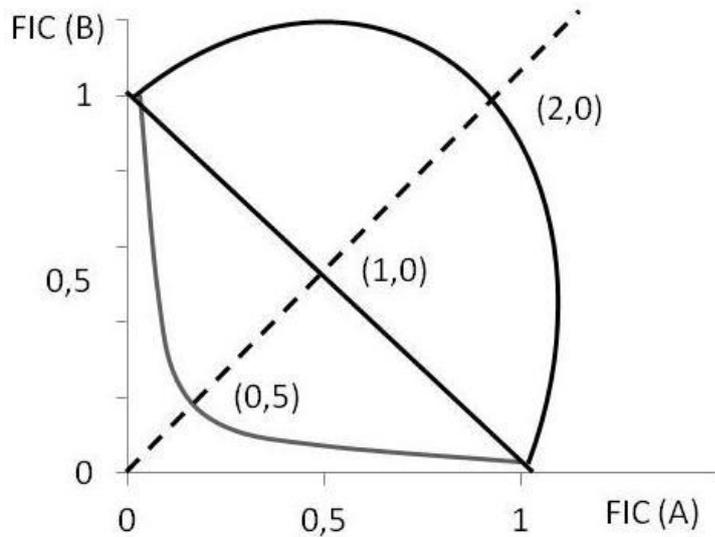


Figure 2 : Traduction graphique de l'index FIC ISOBOLOGRAMME

Pour chaque souche testée les variables sont déterminées et permettent de définir les interactions. Ainsi l'association est dite :

<i>Synergique totale</i>	: FIC index $\leq 0,5$
<i>Synergique partielle</i>	: $0,5 < \text{FIC index} \leq 0,75$
<i>Additive</i>	: $0,75 < \text{FIC index} \leq 1$
<i>Indifférente</i>	: $1 < \text{FIC index} \leq 2$
<i>Antagoniste</i>	: FIC index > 2

IV. RESULTATS DES CONTROLES

IV.1. TESTS DE STERILITE

IV.1.1. Milieux de culture

Au bout de 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, nous n'avons constaté aucune pousse de bactéries sur chaque milieu de culture que nous avons eu à utiliser. Nous avons pu en conclure qu'ils étaient stériles et pouvaient être utilisés. Il en était de même pour le milieu AM3 dont l'incubation avant utilisation a montré une absence de virage de l'indicateur coloré et de trouble attestant de sa stérilité.

IV.1.2. Tampons

Le même constat a été fait sur les tampons après 18 à 24h d'incubation à l'étuve, il y'avait une absence de trouble qui attestait qu'ils étaient stériles et pouvaient par conséquent être utilisés.

IV.2. TEST D'EFFICACITE

Au bout de 18 heures d'incubation d'un échantillon du milieu AM3 testé par les souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) à l'étuve à 37°C, un changement de coloration du rouge au jaune et/ou un trouble ont été observés. Ceci nous a permis de dire que le milieu était efficace.

IV.3. RESULTATS CONTROLE DE QUALITE

Le contrôle des souches de référence a pu être effectué avant chaque manipulation et dans les mêmes conditions afin de valider la qualité de nos travaux. Nous avons alors déterminé la CMI d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 vis-à-vis de quelques antibiotiques avec la technique de l'E-test ® et nous les avons comparés aux valeurs des

limites acceptables. Les résultats obtenus sont consignés dans le **TABLEAU III** et **TABLEAU IV**.

TABLEAU III : Résultats CMI par la méthode Etest®

Escherichia coli ATCC 25922

Antibiotiques	Résultats CMI (µg/ml)	Limites acceptables CMI (µg/ml)	Interprétation
AMC	4	2 – 8	S
Ceftriaxone	0,064	0,03 - 0,12	S
Cefotaxime	0,064	0,03 - 0,12	S
Ciprofloxacine	0,008	0,004 - 0,015	S
Levofloxacine	0,012	0,008 - 0,06	S

TABLEAU IV : Résultats CMI par la méthode Etest®

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Antibiotiques	Résultats CMI (µg/ml)	Limites acceptables CMI (µg/ml)	Interprétation
Ceftriaxone	64	64 - 128	S
Cefotaxime	32	-	-
Ciprofloxacine	0,5	0,25 – 1	S
Levofloxacine	2	0,5 – 4	S

R : Résistante ; **S** : Sensible ; **I** : Intermédiaire (-) : Indéterminé

IV.4. ANTIBIOGRAMME DE CONTROLE

L'antibiogramme de contrôle a été réalisé pour chaque souche et les résultats sont consignés dans les **TABLEAU V** et **TABLEAU VI**. Ils représentent le profil de sensibilité des deux souches en fonction de l'antibiotique testé.

TABLEAU V: Résultats antibiogramme de contrôle

Escherichia coli ATCC 25922

Antibiotiques	Diamètres d'inhibition (mm)	Intervalles cibles (mm)	Interprétation
Ampicilline	20	16 - 22	S
Ceftriaxone	30	29 - 35	S
Levofloxacin	29	29 - 37	S
Imipenème	30	26 - 32	S
Amikacine	22	21,5 - 28	S
Gentamicine	24	22 - 26	S
Ciprofloxacine	34	31 - 38	S

TABLEAU VI: Résultats antibiogramme de contrôle

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Antibiotiques	Diamètres d'inhibition (mm)	intervalles cibles (mm)	Interprétation
Ceftriaxone	30	-	S
Levofloxacin	23	19 - 26	S
Imipenème	24	20 - 28	S
Amikacine	23	18 - 26	S
Gentamicine	18	15,5 - 22,5	S
Ciprofloxacine	34	29 - 36,5	S

Les deux souches testées étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques.

V. ETUDE DE L'ASSOCIATION DES ANTIBIOTIQUES SUR LES SOUCHES BACTERIENNES

V.1. DETERMINATION DES CMI ET PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES POUR CHAQUE ANTIBIOTIQUE

Pour déterminer les CMI des souches choisies vis-à-vis de chaque antibiotique nous avons utilisé la technique en macro méthode. Elle est nécessaire avant la réalisation de l'association afin de centrer sur les valeurs de CMI. Surtout lorsqu'il s'agit de souches résistantes ayant des valeurs de CMI élevées. Cependant cette technique ne permet pas de savoir si une souche a une sensibilité intermédiaire à un antibiotique donnée. Les critères d'interprétation de la sensibilité des souches aux différents antibiotiques sont consignés dans le **TABLEAU VII** et les résultats pour chaque bactérie dans le **TABLEAU VIII**.

TABLEAU VII: Critères d'interprétation de la sensibilité selon les antibiotiques

Antibiotiques	Concentrations critiques ($\mu\text{g/ml}$)	
	Sensibles	Résistantes
Ceftriaxone	≤ 4	≥ 32
Gentamicine	≤ 4	≥ 8
Amikacine	≤ 8	≥ 16
Ampicilline	Inconstante	≥ 16
Ciprofloxacine	≤ 1	≥ 2

TABLEAU VIII: Sensibilité des souches vis-à-vis des différents antibiotiques utilisés

Antibiotiques Souches testées	Concentrations Minimales Inhibitrices (µg /ml)				
	AMP	GEN	CRO	AMK	CIP
<i>Escherichia coli</i>	4	4	0,125	16	0,030
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1	64	4	1

V.2. PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES AUX ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES

Nous avons ensuite déterminé le profil de sensibilité aux associations d'antibiotiques de chaque souche grâce à la technique de « l'échiquier ». Il convient de rappeler que la valeur d'une association d'antibiotique est quantifiée par l'index FIC qui mesure l'effet bactériostatique des antibiotiques.

$$\text{FIC index} = \text{FIC A} + \text{FIC B} = \frac{CI(A) \text{ en combinaison avec B}}{CMIA} + \frac{CI(B) \text{ en combinaison avec A}}{CMIB}$$

Les différentes interprétations d'une association d'antibiotiques sont :

Synergie totale : lorsque le FIC index est inférieur ou égal à 0,5

Synergie partielle : lorsque le FIC est supérieur à 0,5 et inférieur à 0,75

Addition : lorsque le FIC index est supérieur ou égale à 0,75 mais inférieur ou égal à 1

Indifférence : lorsque le FIC index est supérieur à 1 mais inférieur ou égal à 2

Antagonisme : lorsque le FIC index est supérieur à 2.

V.2.1. Sensibilité d'*Escherichia coli* aux différentes associations

Nous avons testé plusieurs associations d'antibiotiques sur cette souche et les résultats obtenus sont consignés dans les **TABLEAUX IX, X, XI** et **XII**. Nous avons également tracé les isobogrammes pour chaque association.

TABLEAU IX: Sensibilité d'*Escherichia coli* vis-à-vis de l'association Ampicilline - Gentamicine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
8	2	2	0.5	2,05	Antagonisme
4	1	1	0.25	1,25	Indifférence
2	1	0,5	0.25	0,75	Synergie
2	0.5	0.5	0.12	0,62	Synergie

Cette association s'est avérée active sur la souche puisque nous avons obtenu une synergie partielle.

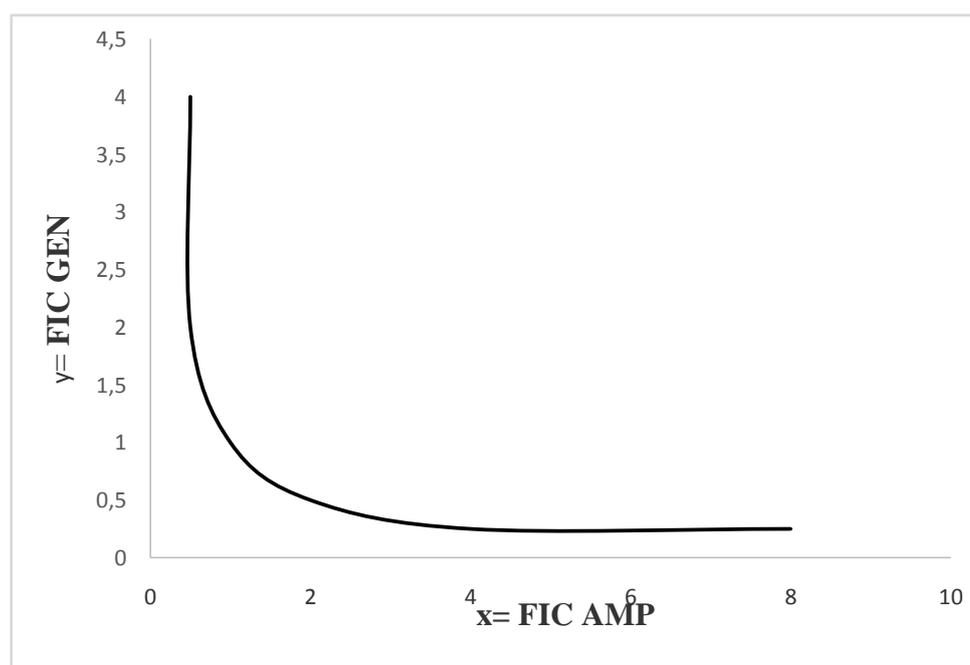


Figure 3 : Courbe de synergie partielle de l'association AMP-GEN sur *Escherichia coli* $y = -1,037\ln(x) + 1,8125$

TABLEAU X: Sensibilité d'*Escherichia coli* vis-à-vis de l'association Ceftriaxone – Gentamicine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,125	0,50	1	0,125	1,120	Indifférence
0,125	1	1	0,250	1,250	Indifférence
0.03	4	0.24	1	1.24	Indifférence
0 ,06	2	0.48	0,5	0,98	Addition

Une addition est notée pour l'association Ceftriaxone-Gentamicine voir même une indifférence. Puisque nous relevons trois combinaisons de concentration qui donnent une indifférence.

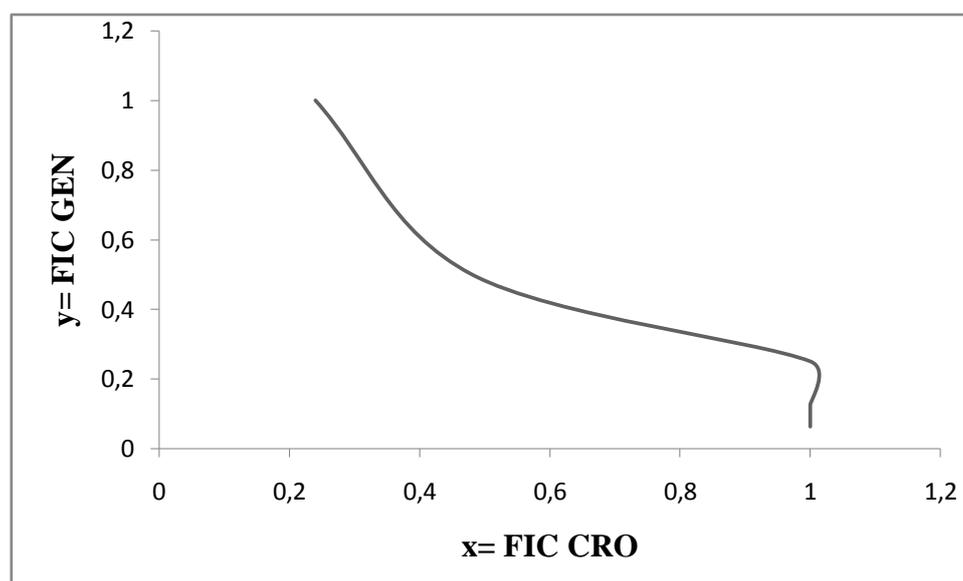


Figure 4: Courbe d'addition de l'association CRO-GEN sur

$$Escherichia coli y = -0,583\ln(x) + 0,1356$$

TABLEAU XI: Sensibilité d'*Escherichia coli* vis-à-vis de l'association Ceftriaxone – Amikacine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,015	16	0,120	1	1,12	Indifférence
0,030	8	0,240	0,500	0,74	Synergie
0,060	4	0,480	0,250	0,74	Synergie
0,060	2	0,480	0,125	0,60	Synergie

L'association Ceftriaxone-Amikacine quant à elle nous donne une Synergie partielle comme pour la première. Elle peut à priori être considérée comme active sur cette souche bactérienne.

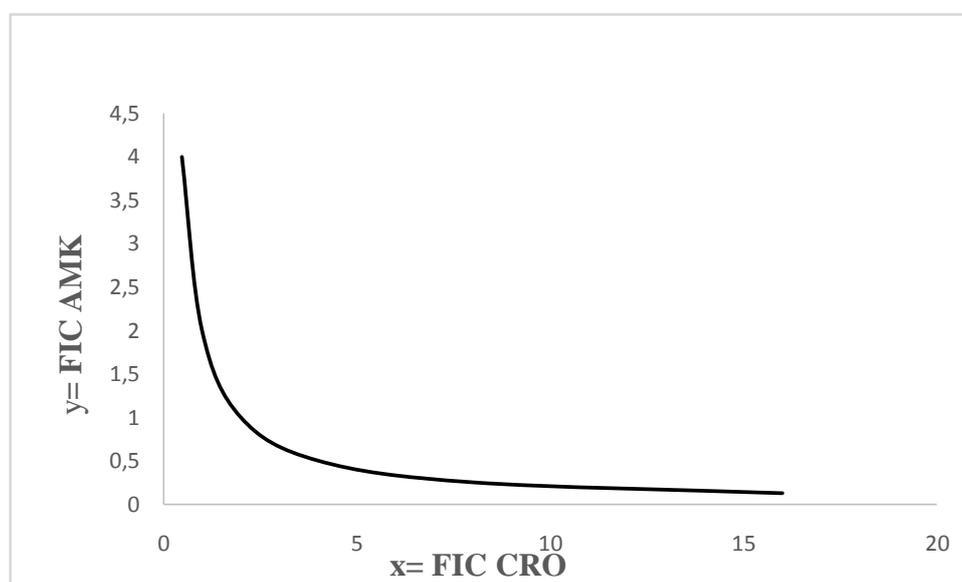


Figure 5 : Courbe de synergie partielle de l'association CRO-AMK sur *Escherichia coli* = $-1,031\ln(x) + 2,3776$

TABLEAU XII: Sensibilité d'*Escherichia coli* vis-à-vis de l'association Ceftriaxone – Ciprofloxacine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,060	0,0037	0,48	0,12	0,60	Synergie
0,030	0,0075	0,24	0,25	0,49	Synergie
0,015	0,0150	0,12	0,50	0,72	Synergie

Parmi les quatre cette association semble être la plus active sur la bactérie puisque nous obtenons une synergie totale. Elle pourrait en effet être préconisée en première intention contre *Escherichia coli*.

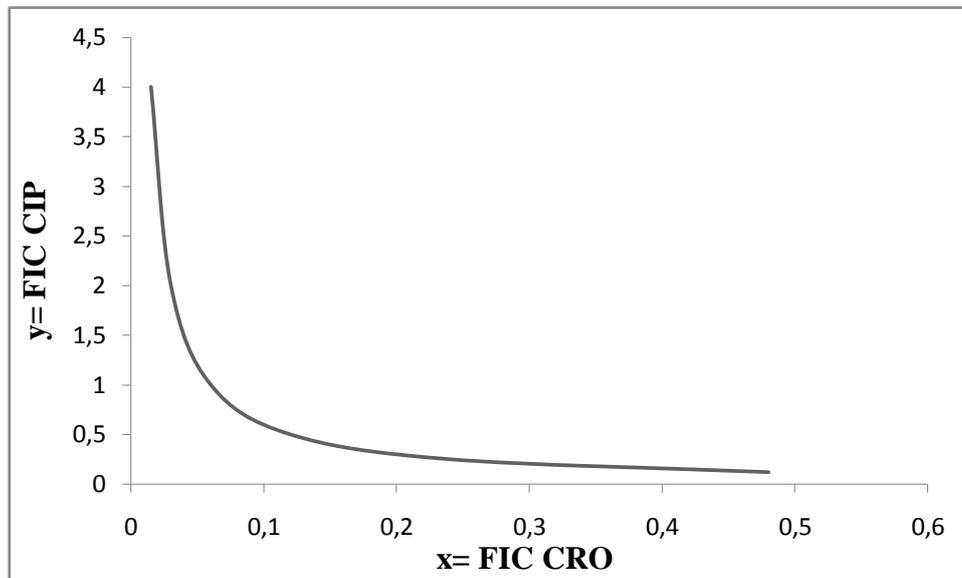


Figure 6: Courbe de synergie totale de l'association CRO-CIP sur *Escherichia coli* $y = -1,037 \ln(x) - 1,2457$

La souche d'*Escherichia coli* que nous avons testée était sensible aux différentes associations que nous avons réalisées. Toutes les associations montraient une synergie partielle voir totale ; les associations β -lactamines et Aminocyclitolés ainsi que β -lactamines et Quinolones. Elles peuvent être considérées à priori comme très actives sur la bactérie. Seule l'association Ceftriaxone-Gentamicine montrait une addition.

V.2.2. Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux différentes associations

Nous avons également testé plusieurs associations d'antibiotiques sur cette souche et les résultats obtenus sont consignés dans les **TABLEAUX XIII, XIV, XV et XVI**.

TABLEAU XIII: Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* de vis-à-vis de l'association Ceftriaxone-Amikacine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
8	0,5	0,1250	0,125	0,250	Synergie
8	1	0,1250	0,250	0,375	Synergie
4	2	0,0625	0,50	0,562	Synergie
2	4	0,0 312	1	1,031	Indifférence

Contrairement à la souche précédente, Cette association s'est avérée très active sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une synergie totale.

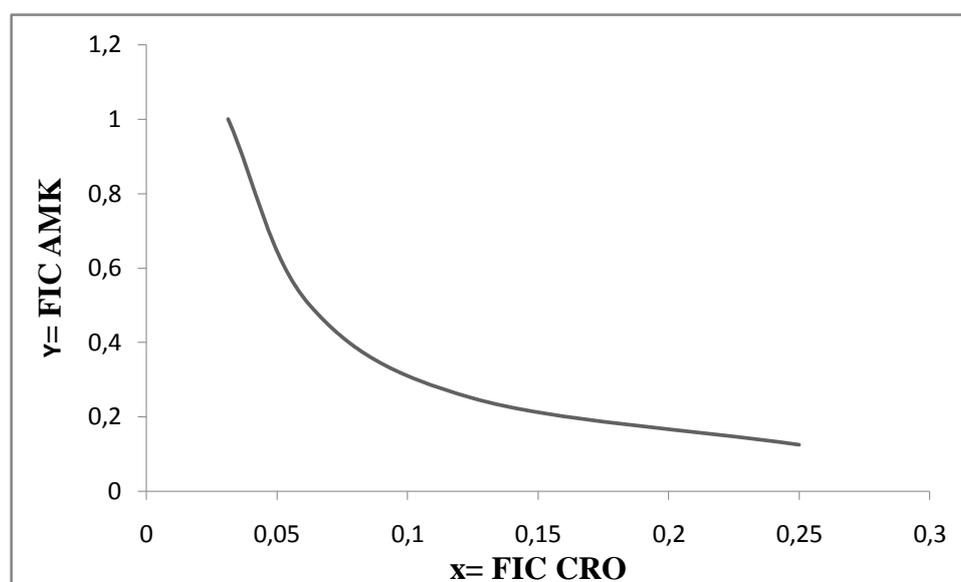


Figure 7: Courbe de synergie totale de l'association CRO-AMK sur *Pseudomonas aeruginosa* $y = -0,415\ln(x) - 0,5371$

TABLEAU XIV: Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'association Ceftriaxone-Ciprofloxacine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
32	0,125	0,5	0,125	0,625	Synergie
8	0,250	0,125	0,25	0,375	Synergie
4	0,50	0,062	0,50	0,562	Synergie
2	1	0,031	1	1,031	Indifférence

L'association Ceftriaxone-Ciprofloxacine montre une synergie totale sur cette souche comme pour la précédente. Elle pourrait être considérée comme l'association de choix pour les bacilles à Gram négatifs.

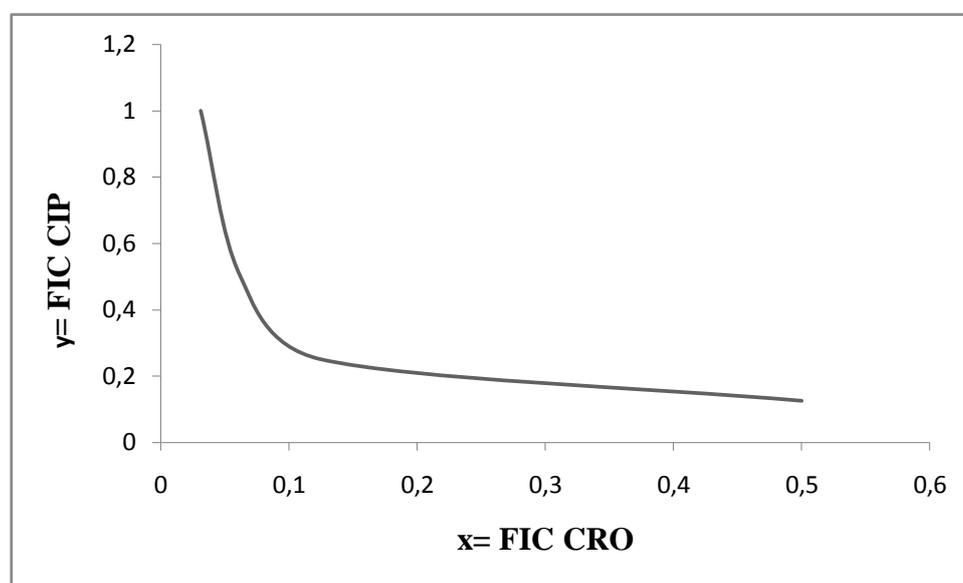


Figure 8: Courbe de synergie totale de l'association CRO-CIP sur

$$Pseudomonas aeruginosay = -0,293\ln(x) - 0,1921$$

TABLEAU XV: Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'association Ciprofloxacine-Amikacine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,5	0,5	0,5	0,125	0,625	Synergie
0,5	1	0,5	0,25	0,75	Addition
0,25	2	0,25	0,5	0,75	Addition
0,125	4	0,125	1	1,125	Indifférence

Pour cette association nous notons une synergie partielle. Donc elle peut être considérée comme relativement active sur la souche bactérienne.

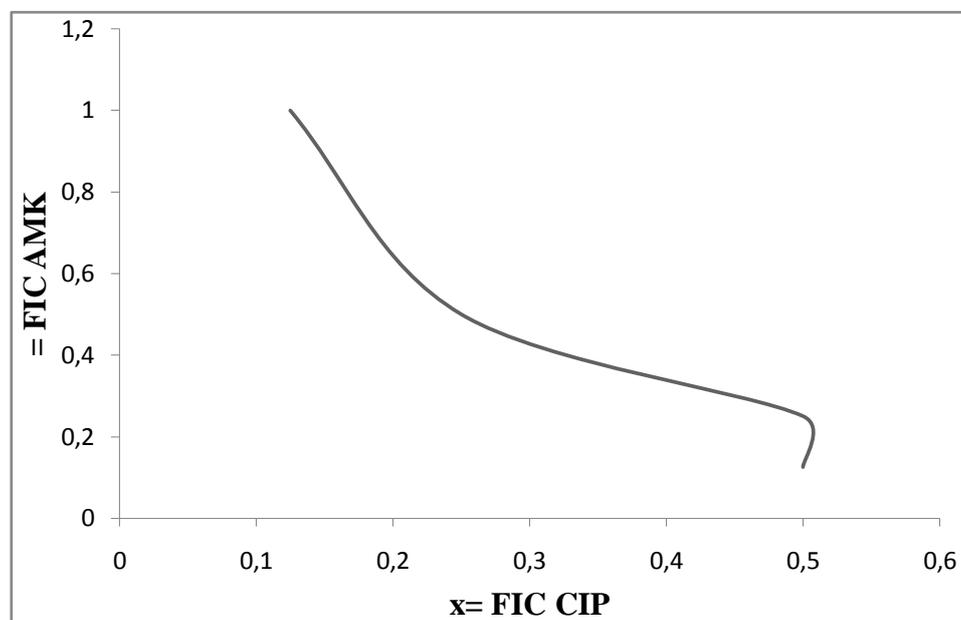


Figure 9: Courbe de synergie partielle de l'association CIP-AMK sur *Pseudomonas aeruginosa* = $-0,574\ln(x) - 0,2273$

TABLEAU XVI: Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'association Ciprofloxacine-Gentamicine

CI (A)	CI (B)	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
1	0,125	1	0,125	1,125	Indifférence
1	0,25	1	0,25	1,125	Indifférence
0,5	0,50	0,5	0,5	1	Addition
0,015	1	0,015	1	1,015	Indifférence

Cette association nous donne au mieux une addition. Elle peut à priori être considérée comme pas très active sur la souche.

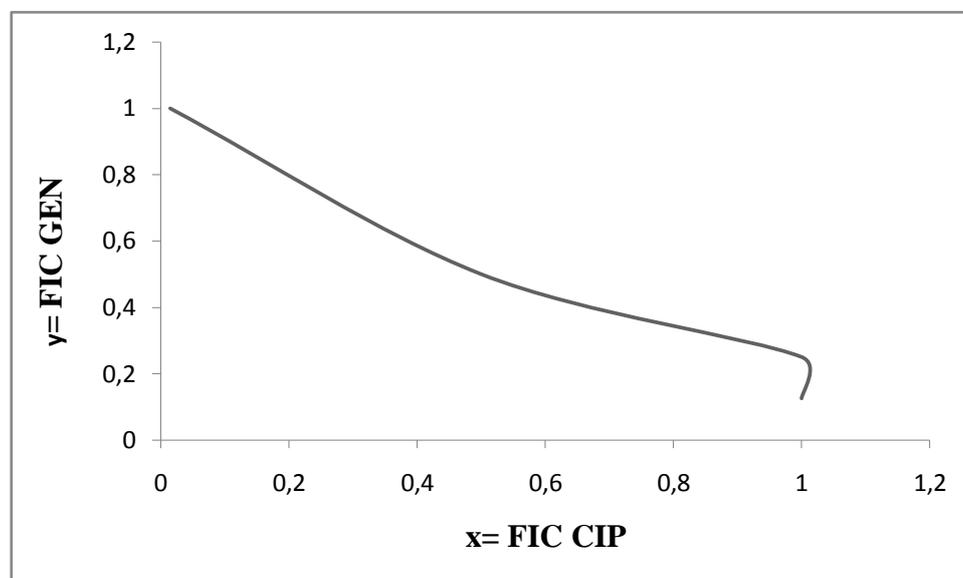


Figure 10: Courbe d'addition de l'association CIP-GEN sur *Pseudomonas aeruginosa* $y = -0,186 \ln(x) + 0,2416$

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* que nous avons testée était sensible aux différentes associations que nous avons réalisées. Toutes les associations montraient une synergie à l'exception de l'association Ciprofloxacine-Gentamicine qui montrait une Addition. Toutefois seules les associations Ceftiaxone-Amikacine et Ceftriaxone-Ciprofloxacine pouvaient être considérées

comme des associations de choix pour la bactérie puisqu'on obtenait une synergie totale ; effet recherché. Ainsi nous pouvons dire qu'associer une Cephalosporines de 3^{em} génération à l'Amikacine ou à une Fluoroquinolone comme la Ciprofloxacine est un schéma thérapeutique judicieux pour cette bactérie.

VI. LA VALIDATION DE LA METHODE

La deuxième partie de notre étude a consisté à valider la méthode d'étude des associations d'antibiotiques dite « échiquier » ou microméthode. Puisque nous avons travaillé sur des souches de référence. Nous avons dans un premier temps déterminé les CMI des deux souches vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques par la méthode E-test®. Nous avons comparé les valeurs obtenus aux valeurs cibles pour les souches de références fournies dans CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) 2014. Les résultats sont consignés dans le **TABLEAU XVII**. Nous avons par la suite déterminé le coefficient de corrélation entre les valeurs de CMI obtenues par E-test® et les valeurs de CMI cibles.

La droite de régression fournit une idée schématique de la relation entre deux variables. Pour faire la prédiction, il s'agira simplement de substituer la valeur donnée à x dans l'équation de régression et de calculer la valeur de y'.

Pour cela nous avons tracé la droite la plus représentative de l'ensemble qui est donnée par l'équation où a et b sont des constantes déterminées par les formules suivantes :

$$y' = ax + b$$

$$b = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{\sum y}{N} - a \frac{\sum x}{N}$$

x et y sont des variables :

x= valeurs CMI cibles ou
valeurs CMI par E-test

y= valeurs de CMI par E-test ou
valeurs de CMI par échiquier

Ce qui nous a permis de calculer un coefficient de corrélation entre les deux variables, r de formule :

$$r = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N\sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

r = coefficient de corrélation; xi = données observées

a = pente de la droite; b = ordonnée à l'origine

N = nombre de paires (x ; y) utilisées pour calculer la droite de concordance.

Critères d'interprétation de «r » et de « a »

r = 0,2 à 0,4 : Corrélation faible ou quasi absence de corrélation.

r = 0,4 à 0,6 : Corrélation moyenne.

r = 0,6 à 0,8 : Bonne corrélation.

r = 0,8 : Corrélation élevée.

r = 1 où -1 : Corrélation parfaite

a = 0 : pas de corrélation

a < 0 : proportionnalité inverse

a > 0 : corrélation positive

TABLEAU XVII : Résultats CMI par E-test® comparés aux valeurs cibles

Souches bactériennes	Antibiotiques	Résultats CMI E-test® (µg/ml)	Valeurs cibles CMI (µg/ml)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AMC	4	4
	Ceftriaxone	0,064	0.06
	Cefotaxime	0,064	0.06
	Ciprofloxacine	0,008	0.008
	Levofloxacine	0,012	0.015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ceftriaxone	64	-
	Cefotaxime	32	-
	Ciprofloxacine	0,5	0.5
	Levofloxacine	2	2

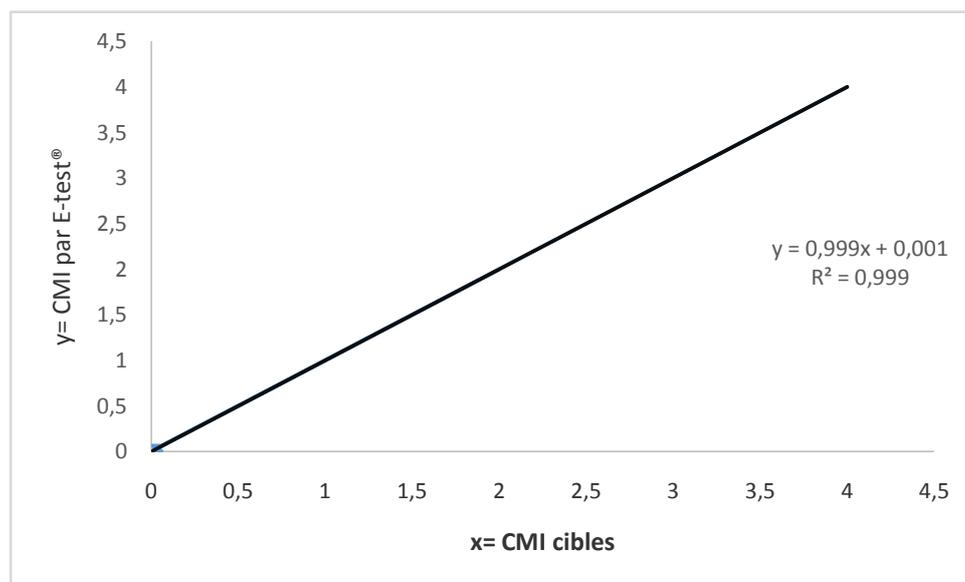


Figure 11:Corrélation entre CMI par E-test et CMI cibles

La corrélation entre les valeurs de CMI obtenues par E-test® et les valeurs de CMI cibles est élevée. L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme de $y' = 0,9995x + 0,0012$, avec $r = 0,99$. La valeur de **a**, pente de la droite est supérieure à zéro donc la corrélation est positive. Ce qui montre que la technique E-test® que nous avons utilisée peut être considérée comme technique de référence.

Nous avons ensuite comparé la microméthode d'étude des associations d'antibiotiques « échiquier » utilisée dans cette étude avec la méthode E-test® de référence en utilisant les valeurs de CMI obtenues avec chacune des méthodes **TABLEAU XVIII**. Nous avons comme précédemment déterminé la corrélation entre les deux méthodes avec le coefficient de corrélation.

TABLEAU XVIII : Valeurs de CMI obtenues avec les deux méthodes

Souches bactériennes	Antibiotiques	CMI par « échiquier » (µg/ml)	Résultats CMI E-test® (µg/ml)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ciprofloxacine	0.03	0,008
	Ceftriaxone	0.125	0 ,064
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ciprofloxacine	1	0,5
	Ceftriaxone	64	64

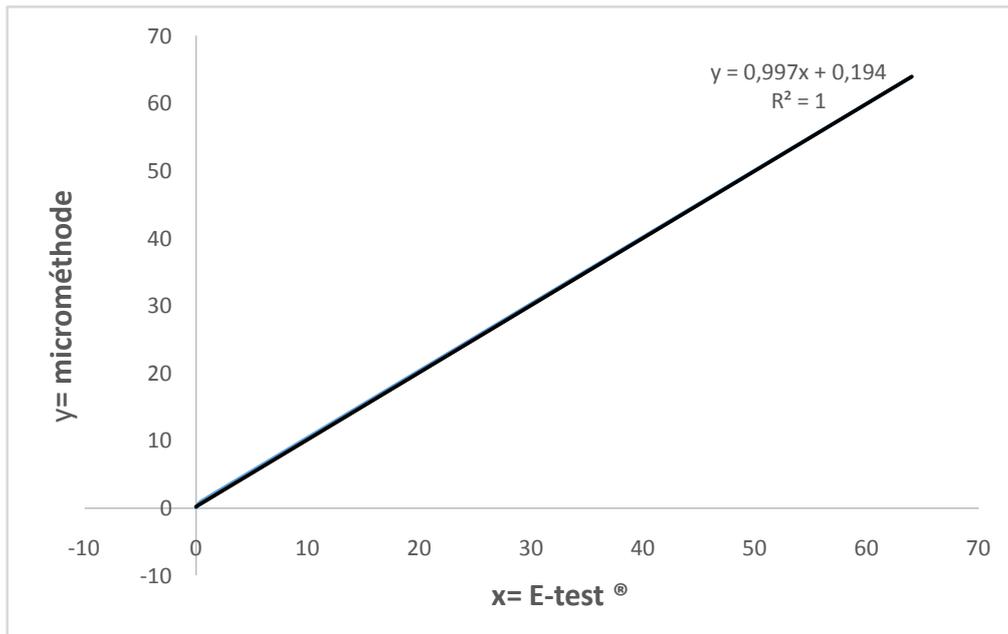


Figure 12 : Corrélation entre E-test® et « échiquier »

La corrélation entre les valeurs de CMI obtenues par E-test® et les valeurs de CMI obtenus par la technique en microméthode « échiquier » est presque parfaite. L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme de $y' = 0,997x + 0,1942$, avec $r = 1$. La valeur de **a**, pente de la droite est supérieure à zéro donc la corrélation est positive. Ce qui montre que la microméthode « échiquier » que nous avons utilisé est valide pour l'étude des associations d'antibiotiques.

VII. DISCUSSION

Afin d'étudier les associations d'antibiotiques sur les bactéries à Gram négatif, nous avons utilisé la méthode dite de « l'échiquier ». Avec cette technique toute concentration d'un antibiotique est associée à chacune des concentrations de l'autre. Après ensemencement avec la bactérie à étudier et incubation à 37°C, les concentrations avec lesquelles se produisent une inhibition de la croissance bactérienne sont notées et les interactions définies avec des calculs. Les résultats sont exprimés d'une part pour la bactériostase par le FIC index et d'autre part pour la bactéricidie par le FBC index. Cette technique permet non seulement de quantifier les concentrations inhibitrices (CI) mais aussi les concentrations bactéricides (CB) de chaque antibiotique en association. Nous avons pu tester un certain nombre d'associations sur deux bactéries ; une Entérobactérie et un bacille à Gram négatif non fermentaire. Les antibiotiques à associer ont été choisis à partir des nombreuses études consultées et qui leur attribuaient un effet synergique et bactéricide. Notre discussion sera donc axée sur les résultats obtenus expérimentalement en testant les associations d'antibiotiques et la validation de la méthode.

VII.1. LES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES

L'objectif principal recherché lors de la mise en œuvre d'une association d'antibiotique est d'obtenir un effet synergique. En effet l'action combinée des deux antibiotiques lors de ce type d'interaction permet de renforcer la bactéricidie au foyer infectieux, d'élargir le spectre antibactérien, d'éviter la sélection de mutants résistants, de réduire le risque d'échec thérapeutique et par dessus tout de réduire la dose de chacun des antibiotiques à administrer. C'est pourquoi le choix des associations d'antibiotiques est très important. En effet toutes les molécules associées sont connues pour avoir au moins un effet bactériostatique voir bactéricide en plus d'une synergie d'action sur les bactéries choisies.

VII.1.1. LE CHOIX DES BACTERIES

Au cours des dernières décennies, la plupart des espèces bactériennes ont acquis une résistance à l'égard d'un ou plusieurs antibiotiques. Ces germes sont retrouvés en collectivité mais beaucoup plus en milieu hospitalier et sont responsables d'infections sévères. Un certain nombre de ces espèces dont la résistance est particulièrement préoccupante pour la santé publique ont été recensées. On y retrouve des Entérobactéries notamment *Escherichia coli* productrices de β -lactamases à spectre élargi mai aussi *Pseudomonas aeruginosa* avec ses mécanismes de résistance aussi divers que variés. Cette dernière est de plus responsable de la plupart des infections nosocomiales. Toutes ces données ont motivé le choix porté sur ces deux bactéries au cours de notre étude.

VII.1.2. LE CHOIX DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES

Le mécanisme d'action et la cible des antibiotiques sont des critères importants dans le choix des combinaisons d'antibiotiques. Les associations étudiées contiennent des molécules qui ont toutes des mécanismes et sites d'actions différents au niveau de la bactérie. Cette mesure permet de limiter la sélection de mutants résistants d'autant plus que les Fluoroquinolones utilisés seuls présentent un risque plus élevé d'entraîner des mutants résistants. Selon Nassif et Al 1987, on obtiendrait un effet synergique lorsque l'on associait deux antibiotiques bactéricides. C'est le cas des β -lactamines associés aux aminosides ou aux Quinolones. D'autres études comme celle de Bambeke et Al. en 1999, montrent de plus que les β -lactamines sont des antibiotiques temps dépendant alors que les Aminosides et Quinolones sont doses dépendantes d'où l'intérêt de les associer sur des souches multirésistantes parce qu'ils conservent plus longtemps leur action au site d'action. C'est pourquoi nous avons choisi

d'associer les β -lactamines d'une part aux Aminosides et d'autre part aux Fluoroquinolones mais aussi d'associer les Fluoroquinolones aux Aminosides.

VII.1.3. ASSOCIATION BETA-LACTAMINES-AMINOSIDES

Elle est très utilisée en thérapeutique anti-infectieuse, puisque les β -lactamines facilitent la pénétration des Aminosides dans la bactérie favorisant leur accès à leur cible [68, 92]. Cependant le choix du groupe d'antibiotiques est fonction du germe. Deux catégories d'associations efficaces sur de nombreux germes ont été souvent citées dans la littérature [35]. La recherche de l'efficacité thérapeutique croissante a néanmoins conduit à associer tous les groupes de β -lactamines jusqu'au Céphalosporines avec les Aminosides.

VII.1.3.1. Association Pénicilline-Aminoside

Dans ce cas nous avons choisi d'associer l'Ampicilline à la Gentamicine sur *Escherichia coli*. Cette association est indiquée comme celle de choix contre *Staphylococcus aureus* multirésistant [2, 27]. Mais elle peut aussi être utilisée sur les Entérobactéries et surtout *Escherichia coli*. L'action synergique des deux antibiotiques a été démontrée depuis longtemps par plusieurs études [41, 51]. Celle que nous avons réalisée montrait une synergie partielle avec un FIC index qui est égal à 0,62. En effet nous avons obtenu en association des concentrations inhibitrices qui étaient inférieures aux CMI respectives de chaque antibiotique sur la bactérie. Ce qui confirme les résultats obtenus précédemment par les auteurs. Toutefois la synergie totale qui est l'effet recherché n'est pas obtenue ici. Cela pourrait être dû à un mauvais choix de concentrations à associer. C'est pourquoi il serait judicieux de déterminer des concentrations théoriques à associer qui nous donnerait potentiellement un effet synergique et de vérifier cette action *in vitro*.

VII.1.3.2. Association Céphalosporines de troisième génération Aminosides

La recherche permanente d'efficacité thérapeutique a conduit à associer les Céphalosporines à de nombreux antibiotiques. L'utilité d'associer les Céphalosporines de troisième génération aux Aminosides a été démontrée par plusieurs études. En effet une synergie en plus d'une bactéricidie est notée lorsqu'on associe ces deux groupes d'antibiotiques sur les Entérobactéries [81, 86, 93]. Il y'a également une forte probabilité de synergie sur des bactéries du genre *Pseudomonas aeruginosa*[53, 73]. Nous avons choisi d'associer la Ceftriaxone à l'Amikacine sur les deux groupes de bactéries à Gram négatif durant notre étude. Nous avons obtenu un FIC index de 0,6 pour *Escherichia coli* correspondant à une synergie partielle et de 0,375 pour *Pseudomonas aeruginosa* ; une synergie totale. Ce qui confirme que ces deux groupes d'antibiotiques peuvent être utilisés sur ces deux bactéries. Même si l'association Ceftriaxone-Amikacine s'est montrée moyennement active sur *Escherichia coli* son efficacité sur d'autres Entérobactéries a été démontré [27, 93]. Une synergie et une forte activité bactéricide est également noté en substituant la Gentamicine à l'Amikacine dans ce type d'association sur d'autres souches comme *Salmonella Typhi* ou *Proteus mirabilis*[68], même si durant cette étude, nous n'avons obtenu qu'une addition sur *Escherichia coli*.

VII.1.4. ASSOCIATION BETA-LACTAMINES- QUINOLONES

Devant l'émergence des bactéries résistantes à la fois aux Quinolones et aux β -lactamines, la recherche de l'élargissement du spectre a conduit à associer aux Quinolones, les β -lactamines. Les Quinolones de deuxième génération ont montré une efficacité lorsqu'elles sont associées aux Céphalosporines de troisième génération. Nous avons constaté durant nos travaux, qu'avec l'association Ceftriaxone-Ciprofloxacine, nous obtenons un FIC index de 0,49

pour *Escherichia coli* et de 0,5 pour *Pseudomonas aeruginosa* ; donc une synergie totale pour les deux souches. Ce qui signifie qu'avec une baisse des concentrations inhibitrices de sorte qu'elles soient inférieures aux CMI respectives, on obtenait une activité supérieure à la somme des activités de chacun des antibiotiques pris isolément. Confirmant alors que l'association de ces deux groupes d'antibiotiques pourrait être de choix en première intention aussi bien sur les Entérobactéries que sur *Pseudomonas aeruginosa*[72, 82, 97]. Il serait même plus judicieux d'associer la Ceftazidime ou l'Imipénème à la Ciprofloxacine sur *Pseudomonas aeruginosa* puisque ces deux molécules se sont avérées être très efficaces et montrent une forte activité en plus d'une synergie d'action. Dans les infections sévères à *Pseudomonas aeruginosa* de type fibrose cystique cette dernière association serait celle préconisée en première intention [14, 82].

A noter que la Colistine reste une alternative thérapeutique non négligeable malgré sa toxicité.

VII.1.5. ASSOCIATION QUINOLONES-AMINOSIDES

Nous avons entrepris de tester l'association Ciprofloxacine-Amikacine et Ciprofloxacine-Gentamicine sur *Pseudomonas aeruginosa*. Mais ces deux associations ont été moins actives que les précédentes puisque l'on obtenait qu'une synergie partielle et une addition. Toutefois une activité intéressante avec ce type d'association a été notée sur des bactéries du genre *Salmonella* [61].

VII.2. VALIDATION DE LA METHODE D'ETUDE DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES

L'unanimité ne s'est pas encore faite sur les règles d'association des antibiotiques ni sur leur méthode. Plusieurs techniques sont utilisées, néanmoins celle dite de « l'échiquier » reste la technique de choix pour étudier les associations d'antibiotiques sur les bactéries.

Nous avons utilisé la méthode de « l'échiquier » pour étudier quelques associations d'antibiotiques sur des souches de bacilles à Gram négatif et nous avons obtenu les résultats décrits plus hauts. Cependant Toute méthode d'analyse doit être validée pour prouver qu'elle correspond bien à l'usage pour lequel, elle est prévue. Pour cela nous avons utilisé la droite de régression qui est un diagramme de dispersion qui montre l'existence d'une relation linéaire en vue d'une prédiction. Nous avons tenté d'abord d'établir une relation entre les CMI obtenues par la méthode E-test® et les CMI cibles pour les souches de références, données par la Société Française de Microbiologie.

Nous avons obtenu une droite de corrélation $y' = 0,9995x + 0,0012$. La valeur de **a** obtenu était supérieure à zéro, la corrélation donc positive. A partir de cette droite a été établi un coefficient de corrélation **r = 0.99** très élevée.

Nous avons ensuite tenté d'établir une relation entre les CMI obtenues par la technique en microplaque « échiquier » lors d'associations d'antibiotiques sur les mêmes souches de référence avec celles obtenues par la technique E-test®.

Nous avons obtenu une droite de corrélation $y' = 0,997x + 0,1942$. La valeur de **a** obtenu était supérieure à zéro ; la corrélation positive. A partir de cette droite a été établi un coefficient de corrélation **r = 1** parfaite.

La valeur des coefficients de corrélation trouvée permet de dire que nos droites sont plutôt fiables. Elle permet également de dire que la relation entre les méthodes tend vers la linéarité dans la mesure où les coefficients de corrélation **r** sont parfaits.

Nous avons pu en conclure que la méthode E-test® est une technique de référence pour déterminer les CMI des antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes. Mais aussi que la technique de « l'échiquier » est une méthode valide pour étudier les associations d'antibiotiques *in vitro* puisque l'on obtenait des CMI assez proches de celles obtenues par E-test®. La corrélation positive entre les deux méthodes a été démontré par plusieurs auteurs [57, 74].

VII.3. AVANTAGES ET LIMITES DE LA METHODE

La technique de « l'échiquier » reste la méthode la plus complète pour étudier les associations d'antibiotiques à temps fixe. En effet elle consiste à étudier différentes concentrations d'antibiotiques seules et association sur la bactérie et de déterminer les plus faibles qui entraînent une inhibition de la croissance.

Cependant elle est la plus fastidieuse à mettre en œuvre. Elle ne se réalise pas en routine et est plutôt réservée à des laboratoires spécialisés. De plus, il existe des difficultés techniques rencontrées au cours des travaux liées à la standardisation de l'inoculum, à la précision des volumes transférés, à la composition des milieux utilisés, au transfert d'antibiotiques particulièrement important lorsque les tests sont réalisés sur des bactéries à CMI élevée. Enfin, Il faut noter que toutes les bactéries ne peuvent être étudiées en milieu liquide et il est parfois indispensable de revenir à la méthode d'étude en milieu gélosé.

VII.4. PERSPECTIVES

La technique de « l'échiquier » étant difficile à mettre en œuvre en microbiologie de routine □ nous suggérons l'utilisation de la méthode dite du « Triangle ». Cette technique permet l'étude de plusieurs antibiotiques et de leurs associations deux par deux selon un schéma triangulaire. Pour ce faire une gamme de trois à quatre concentrations qui sont égales à $1/4 \times \text{CMI}$, $1/2 \times \text{CMI}$, $1/3 \times \text{CMI}$ sont choisies pour chaque antibiotique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survivants pour chaque antibiotique seul et pour les différentes associations : les associations bactéricides correspondent à celles ne laissant pas plus de 0,01 % de survivants. De ce fait il est plus simple d'évaluer l'action bactéricide de deux antibiotiques sur une souche sans avoir à tester toute une panoplie de concentrations. Une fois les antibiotiques à associer choisis, et les CMI connues on teste directement les gammes de concentrations décrites plus hauts pour voir si elles entraînent une inhibition de la croissance bactérienne.

Cette technique pourrait simplifier l'étude des associations d'antibiotiques car elle permettrait non seulement de réduire les combinaisons de concentration à associer mais aussi le temps consacré à les étudier.

CONCLUSION

La découverte des antibiotiques a révolutionné la lutte contre les maladies infectieuses surtout dans celles sévères. Cependant leur utilisation à grande échelle a favorisé l'apparition de bactéries devenues de plus en plus résistantes.

Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce phénomène

- Le mécanisme d'adaptation des germes pathogènes à leur environnement
- L'émergence d'espèces inhabituellement pathogènes
- L'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (infection à VIH, traitement avec des immunosuppresseurs...)
- L'automédication
- Le non respect des protocoles d'antibiothérapie par le malade et parfois par le clinicien
- L'instauration d'un traitement antibiotique en l'absence probable d'antibiogramme

Toutes ces données imposent désormais la mise en place d'une antibiothérapie efficace. Les associations d'antibiotiques ont toujours été utilisées dans le but :

- de renforcer la bactéricidie au foyer infectieux
- d'élargir le spectre antibactérien
- d'éviter la sélection de mutants résistants
- de réduire le risque d'échec thérapeutique

Cependant la résistance bactérienne et l'élargissement du spectre ne constituent plus des arguments suffisants pour l'utilisation d'association d'antibiotiques en thérapeutique. Aujourd'hui plusieurs facteurs justifient la mise en place d'une bithérapie voir même d'une trithérapie:

- le type de germe : chez des bacilles à Gram négatif du genre *Pseudomonas*, du fait de leur faible sensibilité il y'a nécessité d'avoir recours à une association.
- le terrain : chez des patients fébriles, immunodéprimés (corticothérapie, chimiothérapie...), souffrant d'insuffisance rénale ou de neutropénie, une association d'antibiotiques est recommandée

➤ la pathologie :

- dans les pneumopathies survenant tardivement au cours d'un séjour en réanimation, l'utilisation d'une association pour couvrir l'ensemble des probabilités s'avère justifiée
- dans les méningites et abcès du cerveau, les associations sont largement pratiquées afin d'améliorer la bactéricidie dans des foyers difficiles d'accès.
- dans les infections de la peau et des tissus mous devant la gravité locale ou générale, la rapidité d'extension des lésions, l'impossibilité sur l'aspect clinique d'affirmer la nature du germe responsable de l'infection, le traitement probabiliste comporte habituellement une association d'antibiotique
- dans les sepsis sévères d'origine indéterminée où de nombreux agents pathogènes sont potentiellement impliqués, le traitement avec une association d'antibiotiques est généralement prescrit

Enfin il s'agit surtout de diminuer les effets secondaires liés à la toxicité des antibiotiques en réduisant les doses à administrer lors d'une association.

Malgré toutes ces données qui justifient l'utilisation d'associations d'antibiotiques en thérapeutique, leurs études n'ont pas connu un grand essor et l'unanimité ne s'est pas encore faite sur les techniques à utiliser.

C'est ainsi que nous nous sommes proposé d'étudier des associations d'antibiotiques sur deux souches de bacilles à Gram négatif en utilisant une technique que nous avons également voulu valider.

Pour cela nous avons choisi deux bacilles à Gram négatif suivant :

- une Entérobactérie : *Escherichia coli* ATCC 25922
- un bacille à Gram négatif non fermentaire : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

La recherche de la sensibilité par la détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) a été utilisée pour étudier le comportement des souches vis-à-vis d'antibiotiques bactéricides qui étaient les suivants :

- Béta-lactamines : Ampicilline et Ceftriaxone
- Aminosides : Gentamicine et Amikacine
- Quinolones : Ciprofloxacine

Les Béta-lactamines sont des antibiotiques temps-dépendant avec une nécessité de répéter les doses au bout d'un certain temps alors que les Quinolones et les Aminosides sont des antibiotiques concentration-dépendant : (activité dépendant du pic de concentration *in vivo*). D'où l'intérêt de les associer parce qu'ils conservent plus longtemps leur activité au foyer infectieux. De plus les Béta-lactamines facilitent l'accès des Aminosides à leur cible de par leur action sur la paroi bactérienne.

L'activité *in vitro* des associations a été évaluée par la bactériostase et la bactéricidie en utilisant la technique de « l'échiquier »

Il découle de cette étude que :

- L'association Ceftriaxone-Amikacine était active sur les deux souches. Nous avons obtenu une synergie totale pour *Pseudomonas aeruginosa* et une synergie partielle pour *Escherichia coli* avec des concentrations inhibitrices qui étaient inférieures aux CMI respectives de chaque antibiotique.
- L'association Ceftriaxone-Gentamicine avec une addition semblait être moins active que la précédente pour *Escherichia coli*. Puisque nous avons obtenu des concentrations inhibitrices qui étaient presque égales aux CMI des antibiotiques utilisés seuls.
- Quant à l'association Ceftriaxone-Ciprofloxacine, elle semblait être la plus active de toutes puisqu'on obtenait une synergie totale sur les deux bactéries avec une activité *in vitro* qui était supérieure à la somme de chacun des deux antibiotiques pris isolement.

La combinaison Céphalosporine de troisième génération et Fluoroquinolone pourrait être préconisée en première intention dans le traitement des infections à bacilles Gram négatif.

L'ensemble des travaux d'associations d'antibiotiques que nous avons mené sur les souches bactériennes avait pour but de valider la méthode d'étude. Pour cela nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux d'une technique de référence utilisée lors du contrôle qualité et qui nous donnait des résultats satisfaisants. Une relation linéaire acceptable entre les deux méthodes a pu être établie et la corrélation était presque parfaite avec un coefficient de corrélation $r=1$.

Les normes d'assurance qualité ont été respectées à toutes les étapes de nos manipulations en passant par le contrôle des appareils utilisés, des milieux de culture, des réactifs et des souches de référence.

Au décours de ces travaux, nous pouvons donc dire que notre méthode est une technique valide pour l'étude des associations d'antibiotiques.

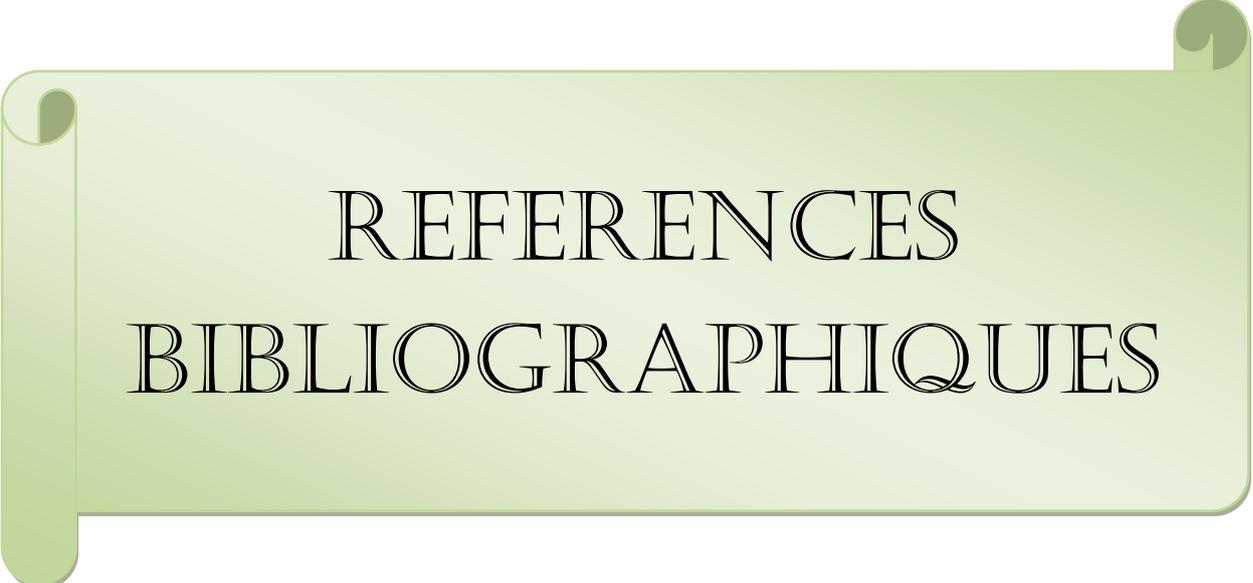
Par ailleurs, dans une perspective de rendre la recherche plus exhaustive, il aurait été intéressant d'apprécier la répétabilité ainsi que la reproductibilité de la méthode mais également d'explorer l'effet du changement de certains paramètres tel que le pH, la température, le temps d'incubation ou l'effet de l'inoculum bactérien.

La technique de « l'échiquier » présente l'avantage d'être la plus complète pour étudier des associations d'antibiotiques. Cependant elle reste fastidieuse et pas applicable en microbiologie de routine.

Aujourd'hui devant l'ampleur de l'évolution des résistances aux antibiotiques, des pathologies qui altèrent les mécanismes de défense du système immunitaire le rendant plus susceptible aux infections et devant la lenteur du développement de nouvelles classes d'antibiotiques, il est nécessaire d'avoir recourt à une technique de routine pour étudier les associations d'antibiotiques. Celle dite du

triangle est très prometteuse et gagnerait à être standardisé et validée dans de prochaines études.

De tels procédés mis en place dans les laboratoires de biologie médicale permettraient d'assurer la qualité des traitements dispensés.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. AARON S.D., FERRIS W., HENRY D.A., SPEERT D.P., and MACDONALD N.**
Multiple Combination Bactericidal Antibiotic Testing for Patients with Cystic Fibrosis Infected with *Burkholderia cepacia*
Am. J Respir. Crit Care Med, 2000, **161**(6): 2241-45

- 2. ANCA M., RAPUNTEAN G.H., CHEREJI R., OROS N., CERNEA M.**
In vitro synergic effects of beta-lactams and aminoglycosides combinations on *Staphylococcus genus* strains
Bulletin UASVM, Veterinary Medicine, 2008 **65**(1): 309-14

- 3. ANSART S., NICOLAS X., PENNEC Y.L, GARRE M.**
Quand utiliser une fluoroquinolone systémique ?
Revue MT, 2005, **11**(1) : 14-17

- 4. AUBOYER et AL**
Association d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgical et en chirurgie
Conférence d'experts, 1999: 1-7

- 5. AVRIL J., MONTEIL H., DABERNAT H., DENIS F.**
Bactériologie clinique.
Edition ELLIPSES, 2000 : 171-295

- 6. AZELE FERRON R. et Cie**
Bactériologie médicale à l'usage des étudiants de médecine :
12^{ème} édition, 1983 : 11-126

7. BAKHOUM I.M.N.S.

« Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne »

Thèse Pharmacie Dakar, 2004 n°8

8. BARRY A.L., CRAIG A., NADLER H., RELLER B.L., SANDERS C., SWENSON J.M.

Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline

NCCLS, 1999, **19**(18): 1-29

9. BEAUDREAU L., GALARNEAU L.A., GOURDEAU M.

Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de Carbapénèmase dans les milieux de soins aigus de Quebec

Institut Nationle de santé publique de Quebec, 2010 : 3-4

10. BERGMAN M., NYBERG S.T., HUOVINEN P., PAAKKARI P., HAKANENA.J.,

Association between Antimicrobial Consumption and Resistance in *Escherichia coli*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, **57**(3): 912-17

11. BEVILACQUA S.

« Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy Essai d'intervention contrôlé »

Thèse Nancy Université 2011

- 12. BLOMBERG B., JUREEN R., MANJI K.P., TAMIM B., DAVIS S.M., MWAKAGILE D.M., URASSA W.K., FATAKI M., MSANGI V., TELLEVIK M.G., MASELLE S.Y., LANGELAND N.**

High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania

Journal of Clinical Microbiology, 2005, **43**(2): 745-49

- 13. BOOKER B.M., STAHL L., SMITH P.F.,**

In Vitro Antagonism with the Combination of Vancomycin and Clindamycin against *Staphylococcus aureus*

The Journal of Applied Research, 2004,**4**(3): 385-95

- 14. BOSSO J.A., BARBARA A., SAXON B.A., AND MATSEN J.M.**

In Vitro Activities of Combinations of Aztreonam, Ciprofloxacin, and Ceftazidime against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* from Patients with Cystic Fibrosis

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990, **34**(3): 487-88

- 15. BRADFORD P.A.**

Extended-Spectrum Beta- Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat

Clinical Microbiology Review, 2001, **14**(4) : 933-51

- 16. BRICHA S., OUNINE K., OULKHEIR S., EL HALOUI N.E., ATTARASSI B.**

Facteurs de virulence liés à *Pseudomonas aeruginosa*

Revue Tunisienne d'Infectiologie 2009, (2): 7-14

- 17. BRISSE S., FEVRE C., PASSET V., ISSENHUTH-JEAN J.S.,
TOURNEBIZE R., DIANCOURT L., GRIMONT P.,**
Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary
Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization
Plos One, 2009, **4**(3): 1-14
- 18. BULGER R.J., NIELSON K.**
Effect of different media on “in vitro” studies of antibiotic combinations
Applied microbiology, 1968, **16**(6): 890-95
- 19. BURGEL P.R., KANAAN R.**
Traitement de l’infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa*
multirésistant dans la mucoviscidose, comment progresser ?
Rev. Mal. Resp. 2010, **27**: 411-13.
- 20. BUSH K.**
Classification of β -Lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1989, **33**(3): 271-76
- 21. BUSH K., JACOBY G.A., AND MEDEIROS A.A.**
A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation
with Molecular Structure
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, **39**(6): 1211-33
- 22. CHACHANIDZE V., CURBELO-IRIZARRY A., ASHCRAFT D.,
PANKEY D.**
In Vitro Synergy of Levofloxacin plus Piperacillin/Tazobactam against
Pseudomonas aeruginosa
Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2009: 1-5

23. CHAUDHARY U., AGGARWAL R.

Extended spectrum β -lactamases (esbl) an emerging threat to clinical therapeutics

Indian Journal of Medical Microbiology, 2004, **22**(2): 75-80

24. CHOPRA I., ROBERTS M.

Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance

Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, **65**(2): 232-60

25. CORMICAN M.G., STEVEN A., MARSHALL S.A., JONES R.N.

Detection of Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the E-test ESBL Screen

Journal of clinical microbiology, 1996, **34**(8):1880-84

26. COURVALIN P.

La résistance bactérienne aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques

Bull. Acad. Vét, France, 2008, **161**(1):7-12.

27. DAOU E.

Standardisation d'une méthode d'étude *in vitro* de différentes associations d'antibiotiques sur des souches bactériennes multirésistantes

Thèse de pharmacie, DAKAR, 2008 n°89

28. DIOP C.

Contrôle de qualité des antituberculeux majeurs utilisés par le Programme National de lutte contre la Tuberculose (PNT).

Thèse de pharmacie, Dakar 2001 n° 5

29. D'ERNEVILLE M.M.

Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des bacilles à Gram négatif

Thèse de pharmacie, Dakar 2008 n° 106

30. DRAME B.

Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des Entérobactéries : Intérêts thérapeutiques.

Thèse de pharmacie, Dakar 2001 n°86

31. DUVAL J., SOUSSY C.J.

Abrégé de l'antibiothérapie

4^{ème} édition Masson, Paris, 1977-1990 : 75-100

32. EDWARDS P. H., EWING W.H.

Identification of the *Enterobacteriaceae*

Ed Burges Minneapolis MN, 1972

33. EUZEBY J.P.

Résistance bactérienne aux antibiotiques

Abrégé de bactériologie générale et médicale

www.bacteriologie.net/generale/resistanceantibiotiques.html

(Consulté le 11/06/2014)

34. FARMER J.J.

Biochemical identification of new species and biogroup of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens

Journal of clinical Microbiologie, 1985, 21(1): 46-76

35. FASS R.J.

Comparative in Vitro Activities of, Beta-Lactam-Tobramycin Combinations Against *Pseudomonas aeruginosa* and multidrug resistant Gram negative Enteric Bacilli

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1982, **21**(6): 1003-6

36. FAURE K., KIPNIS K., GUERY B.

Prise en charge des pneumonies liées à *Pseudomonas aeruginosa*.

Rev. Tun. Infectiol., 2008, **2**(1): 1-8

37. FEINBERG M.

L'assurance qualité des laboratoires agro-alimentaires et pharmaceutiques.

Editions TEC et DOC, 1998: 309

38. FOWERAKER J.E., LAUGHTON C.R., BROWN D.F., BILTON D.

Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute Infective Exacerbations in Cystic Fibrosis

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, **53**(11): 4809-15

39. GAUTIER V.

Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement

Mémoire EHPE France 2007

40. GEORGE W.L.

In Vitro antibacterial activity of the combination of Clindamycin and Ceftazidime

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984, **25**(5): 657-58

41. GLAUSER M.P., LYONS J.M., BRAUDE A.L.

Synergism of Ampicillin and Gentamicin against obstructive pyelonephritis due to *Escherichia coli* in rats

Journal of Infectious Diseases, 1979 **139**(2): 133-140

42. GOH C.Y., NG S.B., EVERETT M., AND VENTE A.

Investigation of *In Vitro* Antagonistic and Synergistic Effects of Fluroxacin in combination with Other Antibiotics

MerLion Pharmaceuticals, Berlin, Germany 51^e IAAC Chicago 2011

43. GUEYE C.

Contribution au contrôle de qualité des médicaments génériques dans les centres de santé de Dakar

Thèse Pharmacie Dakar, 1996 n°71

44. GYLLENBERG H.G., GYLLENBERG M., KOSKI T., LURID T., SCHINDLER J., AND VERLAAN M

Classification of Enterobacteriaceae by minimization of stochastic complexity

Microbiology, 1997, **143** :721-732

45. GUEYE O.

Utilisation de quelques méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif

Thèse Pharmacie Dakar 2007 n° 36

46. GUILLOT J F.

Bases moléculaires et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactérienne

Ann Rech Vét 1990, **21**; 1-11

47. GUTMANN L.

Mécanisme de résistance non-enzymatique aux bêta-lactamines et épidémiologie de la résistance

Médecine et Maladies Infectieuses, 1986, **16**(11):655-60

48. HALL B.G., AND BARLOW M.

Revised Ambler classification of beta-lactamases

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, **55**(6): 1050-51

49. JEHL F., CHOMARIAT M., WEBER M., GERARD A.

De l'antibiogramme à la prescription

Edition BIOMERIEUX, 2003, **2** : 30-37

50. JOLY B., REYNAUD A.

Entérobactéries: Systématique et méthodes de diagnostic

Monographies de microbiologie Editions médicales internationales, 2003;1-100

51. KIM D-M., LYM Y., JIN JANG S., HAN H., KIM Y., CHUNG C.H., HONG P.

In Vitro efficacy of the combination of Ciprofloxacin and Cefotaxime against *Vibrio vulnificus*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984, **49**(8): 3489-91

52. KIM K.S.

Comparison of Gentamicin and Kanamycin alone and in Combinaison with Ampicillin in experimental *Escherichia coli* bacterimia and meningitidis

Pediatr Res, 1985, **19**(11): 1152-55

53. KURTZ T., WINSTON D.J., BRUCKNER D.A., AND MARTIN W.J.

Comparative in vitro synergistic activity of new Beta-Lactam antimicrobial agents and Amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1981, **50**(2): 239-43

54. LAWLOR M.S, HSU J., RICK P.D., AND MILLER V.L.

Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model

Molecular Microbiology, 2005, **58**(4):1054-73

55. LE CLERCQ R. AND COURVALIN P.

Bacterial Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin antibiotics by target modification

Antimicrobial agents and Chemotherapy, 1991, **35**(7):1267-72

56. LEHIR E., BILLET A., CARDENNE M., EUZENA A., FAUSSATA I.

Guide pour l'élaboration du manuel qualité d'une entreprise de fabrication de médicaments: rapports d'une commission SF

STP Pharma Pratiques, ISSN 1997, (5): 1157-97

57. LEWIS R.E., DIEKEMA D.J., MESSER S.A., PFALLER M.A., KLEPSE M.E.

Comparison of E-test, Chequerboard dilution and Time Kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, **49**(2): 345-51

58. LOBO M.C. AND MANDELL G.L

The Effect of Antibiotics on *Escherichia coli* Ingested by Macrophages
Exp Biol Med 1973, **142**: 1048-50

59. LOZNIIEWSKI A., RABAUD C.

Résistance bactérienne aux antibiotiques
CCLIN Sud-Est 2010 : 1-4

**60. MACGOWAN A.P., WOOTTON M., HEDGES A.J., BOWKER K.E.,
HOLT H.A., and REEVES D.S.**

A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative β -Lactam, Aminoglycoside and Fluoroquinolone
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996, **38**(2): 193-203

61. MANDAL S., DELA MANDAL M., KUMAR PAL N.

Combinaison effect of Ciprofloxacin and Gentamicin againsts clinical isolates of *Salmonella enteric* Serovar *Typhi* with reduced susceptibility to Ciprofloxacin
Jpn. J. Infect. Dis. 2003, **56**: 156-57

62. MARMONIER A.A.

Conclusions aux techniques d'études des antibiotiques
Bactériologie médicale techniques usuelles SIMEP, 1987: 296-89

63. MICHEL F., BOYADJIEV I., MARTIN C.

Principes généraux d'une antibiothérapie en réanimation

Les essentiels ELSIEVER Masson 2006 ; 481- 94

http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca06/html/ca06_37/ca06_37.htm(consulté le 12/06/2014)

64. MICHEL-BRIAND Y.

Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries

l'Harmattan 2009 ; 41-44

65. MIRABAUD M. I.

Entérobactérie à Béta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie

Thèse 2003, Genève

66. NASSIF X. MARMONIER A.A., CARBONELLE B.

Etude de l'activité bactéricide des associations binaires d'antibiotiques

Bactériologie médicale techniques usuelles SIMEP, 1987 : 253-59

67. NDIAYE A.O.K.

Les Entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre élargi

Thèse Pharmacie Dakar, 2005 n°37

68. NDOYE IDRISSE

Evaluation de l'activité bactéricide de différentes antibiotiques isolés et en association sur des souches bactériennes isolées au CHU de Dakar

Thèse Pharmacie DAKAR 1994 n°84

69. NEISS K.

La résistance bactérienne : nouvelle guerre froide

Le Médecin du Québec, 2002, **37**(3) : 41-49

70. NIANG O.

Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Thèse de pharmacie, Dakar 2003 n° 60

71. NORDMANN P., MAMMERI H.,

Résistance plasmidique aux quinolones

Antibiotiques, 2007, **9**(4); 246-53

72. NWORU C.S., AND ESIMONE C.O.

Comparative Evaluation of Three *in Vitro* Techniques in the Interaction of Ampicillin and Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2006, **5**(2): 605-11

73. OIE S., FUKUI Y., YAMAMOTO M., MASUDA Y., KAMIYA A.,

In vitro antimicrobial effects of Aztreonam, Colistin, and the 3-drug combination of Aztreonam, Ceftazidime and Amikacin on metallo β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*

BMC Infectious Diseases, 2009, **9**(123):1-5

74. PFALLER M.A., MESSER S.A., BOLMSTRÖM A., ODDSC., REX J.

Multisite reproducibility of the E-test MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates.

Journal of clinical Microbiologie, 1996,**34**(7): 1691-93

75. PAGES J.M.

« Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques »

Médecine sciences, 2004, **20**(3) : 346-51.

76. PAGES J.M., GARNOTEL E.

Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif

Revue française des laboratoires, 2003, **352** : 57-63

77. PATERSON D.L., BONOMO R.A.

Extended-Spectrum Béta-Lactamases: a Clinical Update

Clinical microbiology reviews 2005 **18**(4): 657-86

78. PHILIPPON A., LABIA R., AND JACOBYG.

Extended-Spectrum Béta-Lactamases

Antimicrobial agents and chemotherapy, 1989, **33**(8):1131-36

79. POTTUMARTHY S., SMITH MOLAND E., JURETSCHKO S., SWANZY S.R., THOMSON K., AND FRITSCHKE T.R.

NmcA Carbapenem hydrolyzing Enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America

Emerging Infectious Diseases, 2003, **9**(8): 999-1001

80. POULOS C.D., MATSUMURA S.O., WILLEY B.M., LOW D.E., MCGEER A.

In Vitro Activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, **39**(10): 2220-23

**81. PUERTO A.S., FERNANDEZ J.G., CASTILLO J.L., PINE M.J.S,
ANGULO G.P.**

In vitro activity of β -lactam and non β -lactam antibiotics in extended-spectrum β -lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli*
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2006, **54**: 135–139

82. RAND K., HOUCK H.J., BROWN P., AND BENNEWT D.

Reproducibility of the Microdilution Checkerboard method for antibiotic synergy
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993, **37**(3): 613-15

**83. RAWAT D., HASAN AZRA S., CAPOOR M.R, SARMA S, NAIR D.,
DEB M, PILLA P., AND AGGARWAL P.**

In vitro evaluation of a new Cefixime-clavulanic acid combination for Gram-negative bacteria
Southeast Asian j. trop. Med. public health, 2009 **40**(1): 131-39

84. RICHMOND M.H., SYKES R.B.

The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role
Advan Microb Physiol, 1973, **9**: 31-88

85. SABIN C.

« La lectine PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* : Structure, affinité et spécificité pour des ligands naturels et glycomimétiques »
Thèse Université de Grenoble 2006

86. SAFDAR N., HANDELSMAN J.O., MAKI G.D.

Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis

Infectious Diseases, 2004, **4**: 519-27

87. SAHUQUILLO ARCE J.M, E. GAINZA1 E.C., BRUSOLA1 A.G, ESTÉVEZ R.O., CANTÓN E., GOBERNADO Y.MD M

In vitro activity of Linezolid in combination with Doxycycline, Fosfomycin, Levofloxacin, Rifampicin and Vancomycin against Methicillin-susceptible *staphylococcus aureus*

Rev Esp Quimioterap, 2006, **19**(3): 252-47

88. SANDERS C., BARRY A.L., WASHINGTON J.A., SHUBERT C., MOLAND E.S., TRACZEWSKI M.M., KNAPP C., AND ROSS MULDER R.

Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL Test

Journal of clinical microbiology, 1996, **34**(12): 2997-3001

89. SCHAECHTER M., MEDOFF G., EISENTEIN B., ASSOUS M.V.

Bases biologiques de l'action antibactérienne

Microbiologie et pathologies infectieuses, 1999: 86-87

90. SECK R.

Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires

Thèse Pharmacie Dakar 2005 n°1

**91. SERVICE DE BACTERIOLOGIE FACULTE DE MEDECINE
PIERRE ET MARIE CURIE**

Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigeantes
Bactériologie DCEM1 2002-2003; 61-75

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.html>(consulté le 12/06/2014)

92. SEYE G.N.K.

« Etude *in vitro* de l'activité d'associations d'antibiotiques sur des souches bactériennes multirésistantes isolées dans les CHU de Dakar »

Thèse Pharmacie DAKAR 1993 n°82

93. SORLOZANO A, GUTIERREZ J, ROMERO J.M., LUNA J., DAMAS M., PIEDROLA M.

Activity *in vitro* of twelve antibiotics against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*

Journal of Basic Microbiology, 2007, **47**: 413-16

94. SPEER B.S., NADJA B. SHOEMAKER N.B., SALYERS A.A.

Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer and Clinical Significance

Clinical microbiology reviews, 1992, **5**(4): 387-99

95. TANG H., KO W. CHUANG Y., CHEN C., CHIANG S.

Cefazolin plus Minocycline against clinical isolate of *Vibrio vulnificus* in vitro and animal studies

Jpn. J. Infect. Dis. 2010, **63** : 16-18

96. TANKOVIC J., SOUSSY C.J.

Mécanisme de résistance aux Fluoroquinolones: données récentes
La lettre de l'infectiologie 1998, **12**(5); 196 - 99

97. TATEDA K., ISHII Y., MATSUMOTO T., YAMAGUCHI K.

Break-point Checkerboard Plate for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*
Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2006 **38**: 268-72

98. TENAILLON O., SKURNIK D., PICARD B., AND DENAMUR E.

The population genetics of commensal *Escherichia coli*
Nature Reviews Microbiology, 2010, **8**: 210-17

99. THABAUT A.

Les antibiotiques anti *Pseudomonas aeruginosa* en 1995 : éléments microbiologiques.
Lettre de l'infectiologue.1995, **10** :14-19

100. TREMBLAY S.

Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques
Mémoire 2007 Quebec

101. VAN BAMBEKE F., TULKENS P.,

Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse
Syllabus national belge de pharmacologie, 2007-2008: 1-134

102. VEBER B., DEMEILLIERS G., AIME I.

Place des Aminoglycosides en anesthésie-réanimation
Conférence d'actualisation Elsevier 1999 : 474-94

- 103. WATANAKUNAKAON C., GLOTZBECKER C.**
Synergism with Aminoglycosides of Penicillin, Ampicillin and Vancomycin against enterococcal group-D *Streptococci* and viridans *Streptococci*
J. med. microbiol. 1977, **10**: 134-40
- 104. WEISS K., LA POINTE J.R.**
Routine Susceptibility testing of four antibiotic combination for Improvement of laboratory guide to therapy of Cystic fibrosis infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, **39**(11): 2411-14
- 105. WHITE R.L., BURGESS D.S., MANDURU M, AND BOSSO J.A.**
Comparison of Three Different in Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E-test
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, **40**(8): 1914-18
- 106. YALA D., MERAD A.S., MOHAMED D., OUAR KORICH M.N.**
Résistance bactérienne aux antibiotiques
Médecine du Maghreb, 2001, **91**: 13-14
- 107. YOSHIKAWA T.T. AND SHIBATA S.A**
In Vitro Antibacterial Activity of Amikacin and Ticarcillin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1978, **18**(6): 997-99

108. ZOGHEIB E., DUPONT H.

Enterobacteries multirésistantes

Conférence d'actualisation. Elsevier SAS ,2005:153-

165http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca05/html/ca05_13/ca05_13.htm#88700 (consulté le 10/06/2014)

109. ZUCKERMAN J.M.

Macrolides and Ketolides: Azithromycin, Clarithromycin, Telithromycin

Infect Dis Clin Am, 2004, **18**: 621–49



ANNEXES

A.M.3 (Antibiotic Medium 3)

USAGE

Ce milieu est utilisé pour réaliser les dilutions d'antibiotiques. Mais aussi comme milieu pour le réalisation des associations d'antibiotiques

COMPOSITION

Pour 500ml AM3

Composants	Quantités	Rôles
Milieu de base	17.5g	Milieu de culture, apport d'acides aminés, vitamines et éléments nutritifs nécessaire à la croissance bactérienne
Extrait de viande 1.5g		
Extrait de levure 1.5g		
D (+) – glucose 1g		
Peptone de gélatine 5g		
Chlorure de sodium 3.5g		
Potassium di-hydrogénophosphate 1.32g		
Di-potassium hydrogénophosphate 3.68g		
Glucose	2g	Source de carbone
Rouge de phénol à 1%	20ml	Indicateur coloré, témoin de la croissance bactérienne
Eau distillée stérile	480 ml	Solvant

(pH final : 7,5)

PREPARATION

- Mettre 17,5g de poudre dans 500ml d'eau distillé.
- Ajouter 2g de glucose anhydre
- Porter à l'ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Ajouter 20ml de rouge de phénol
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15minutes.
- Refroidir

E.M.B (Eosine-bleu de méthylène)

USAGE

Ce milieu est utilisé pour l'isolement des entérobactéries. Il est recommandé lors des analyses des eaux et des produits pathologiques principalement pour différencier *Escherichiacoli* et *Enterobacter*.

COMPOSITION

Peptone bactériologique	10 g
Phosphate dipotassique	2 g
Lactose	10 g
Eosine	0,4 g
Bleu de méthylène	0,065 g
Agar	15 g

(pH final : 6,8 ± 0,2)

PREPARATION

- Mettre 37,5g de poudre dans 1 litre d'eau distillé.
- Porter à l'ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15minutes.
- Refroidir à 60°C et agiter le milieu de façon à oxyder le bleu de méthylène et à dissoudre le précipité qui est un constituant important du milieu.
- Couler en boîte de pétri.

Mise en culture

L'isolement se fait par la méthode des quadrants.

Mueller-Hinton (MH)

USAGE

La gélose de Mueller-Hinton est un milieu solide utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Elle constitue également un excellent milieu de base pour la préparation d'une gélose au sang.

COMPOSITION

Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	10 g

(pH final : 7,4)

PREPARATION

- Mettre 35g de poudre dans 1 litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et répartir en tubes ou en boîtes de Pétri.

Mise en culture

Selon le cas :

- isolement par la méthode des quadrants
- ensemencement en nappe ou par écouvillonnage pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

TRYPTO-CASEINE-SOJA

USAGE

La trypto-caseine-soja est un milieu solide particulièrement bien adapté à la culture des bactéries exigeantes

COMPOSITION

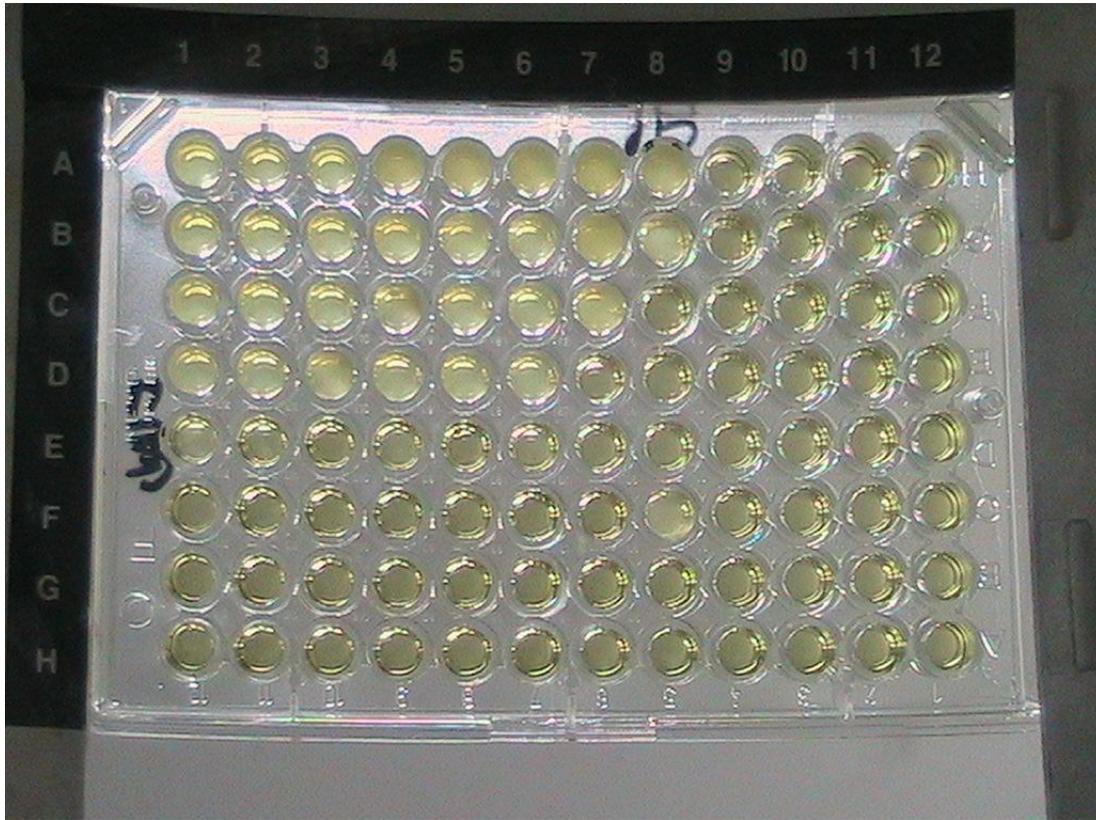
Hydrolisat trypsique de caseine	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g

(pH final : 7,4)

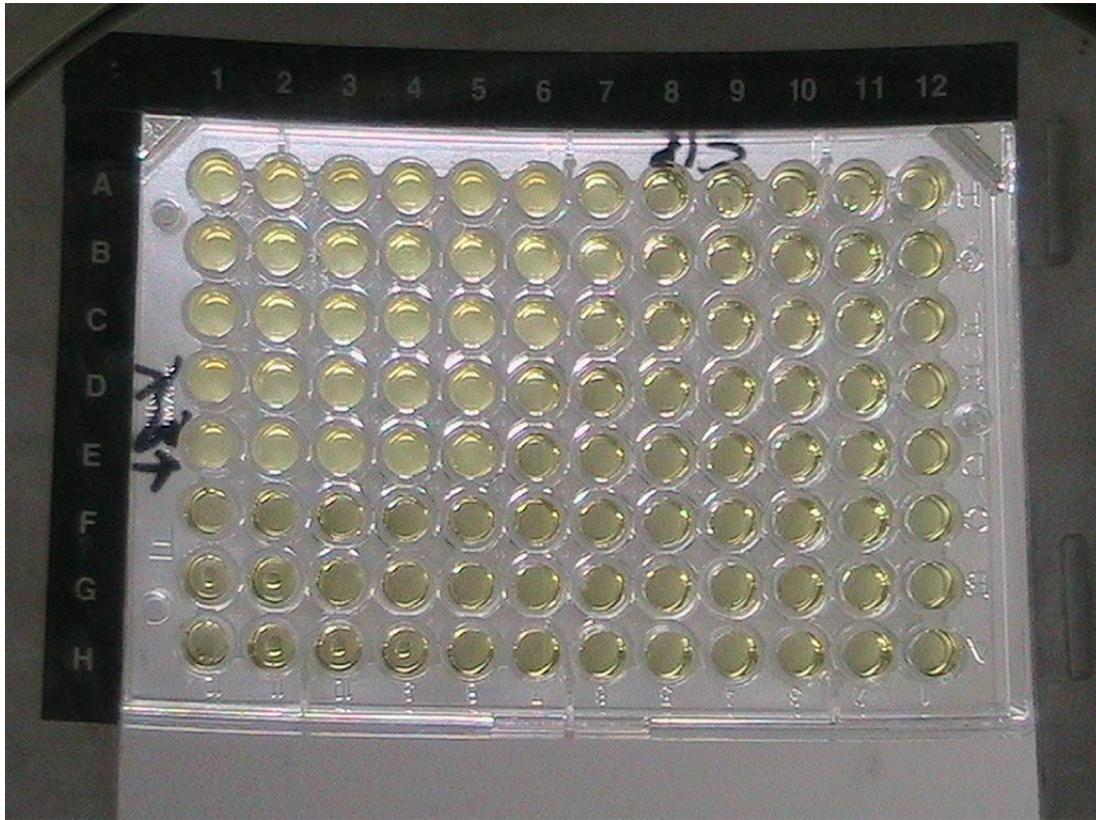
PREPARATION

- Mettre 40g de poudre dans 1 litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à complète dissolution.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

**ILLUSTRATION DE L'ADDITION DE L'ASSOCIATION
CIPROFLOXACINE-GENTAMICINE SUR
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***



**ILLUSTRATION DE LA SYNERGIE PARTIELLE DE
L'ASSOCIATION CIPROFLOXACINE-AMIKACINE SUR
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***



**ILLUSTRATION DE LA SYNERGIE TOTALE DE
L'ASSOCIATION CEFTRIAXONE-AMIKACINE SUR
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***



**ILLUSTRATION DE LA SYNERGIE TOTALE DE
L'ASSOCIATION CEFTRIAZONE-CIPROFLOXACINE SUR
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***



SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ce qui m'ont instruit dans les principes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la sante publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

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

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le Président du jury

Vu :

Le Doyen de.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le Recteur, Président de l'Assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de

Dakar et par délégation

Le Doyen