

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE
ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE**



ANNEE 2004

N° 54

**MICROMETHODE D'ETUDE *IN VITRO* DE LA
SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES
MYCOPLASMES, DES STAPHYLOCOQUES ET DES
ENTEROBACTERIES**

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

**Présentée et soutenue publiquement
le 21 Juillet 2004**

Par

M^{lle} Kène Bougoul SECK

Née le 20 Décembre 1977 à Rufisque (SENEGAL)

MEMBRES DU JURY

<u>Président :</u>	M. Omar	NDIR	Professeur
<u>Membres :</u>	M. Cheikh Saad-Bouh BOYE		Professeur
	M. Mamadou	BADIANE	Maître de Conférences Agrégé
	M. Ahmad Iyane SOW		Maître de Conférences Agrégé
<u>Directeur de Thèse :</u>	M. Cheikh Saad-Bouh BOYE		Professeur

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE



PERSONNEL ADMINISTRATIF DE LA FACULTE

DOYEN	M. Doudou	THIAM
PREMIER ASSESSEUR	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE
DEUXIEME ASSESSEUR	M. Malick	SEMBENE
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS	M. Assane	CISSE

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE ANNEE UNIVERSITAIRE 2003–2004

I. MEDECINE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. José Marie		AFOUTOU	Histologie-Embryologie
M. Mamadou		BA	Pédiatrie
M. Mamadou		BA	Urologie
M Serigne Abdou		BA	Cardiologie
M Fallou		CISSE	Physiologie
M Moussa Fafa		CISSE	Bactériologie-Virologie
M. Abdarahmane		DIA	Anatomie-Chirurgie Générale
M. Baye Assane		DIAGNE	Urologie
M. Lamine		DIAKHATE	Hématologie
M Amadou Gallo		DIOP	Neurologie
M. Bernard Marcel		DIOP	Maladies Infectieuses
* M EL Hadj Malick		DIOP	O-R-L
MmeThérèse MOREIRA		DIOP	Médecine Interne I
M. Raymond		DIOUF	O.R.L
M Sémou		DIOUF	Cardiologie
M Souvasin		DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M. Babacar		FALL	Chirurgie Générale
Mme Sylvie	SECK	GASSAMA	Biophysique
M. Oumar		GAYE	Parasitologie
M. Lamine		GUEYE	Physiologie
M. Momar		GUEYE	Psychiatrie
*M. Serigne Maguèye		GUEYE	Urologie
M. Abdoul Almamy		HANE	Pneumophtisiologie
M. Abdoul		KANE	Cardiologie
M. Nicolas		KUAKUVI	Pédiatrie
M. Victorino		MENDES	Anatomie Pathologique
M. Jean Charles		MOREAU	Gynécologie Obstétrique
M. Bassirou		NDIAYE	Dermatologie
M. Ibrahima Pierre		NDIAYE	Neurologie
*M .Madoune Robert		NDIAYE	Ophtalmologie
M. Mouhamadou		NDIAYE	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
M. Mouhamadou Mansour		NDIAYE	Neurologie
Mme Mbayang	NIANG	NDIAYE	Physiologie
M Pape Amadou		NDIAYE	Ophtalmologie
*M Mamadou		NDOYE	Chirurgie Infantile
M. Youssoupha		SAKHO	Neurochirurgie
Mme Bineta	KA	SALL	Anesthésie-Réanimation
M. Mohamadou Guélaye		SALL	Pédiatrie
M. Niama	DIOP	SALL	Biochimie Médicale

* Associé

§ Détachement

M Abibou	SAMB	Bactériologie-virologie
M Mamadou	SARR	Pédiatrie
§Mme Awa Marie COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M Cheickna	SYLLA	Urologie
M Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M Abdourahmane	SOW	Maladies Infectieuses
M Housseyn Dembel	SOW	Pédiatrie
M Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
M Moussa Lamine	SOW	Anatomie-Chirurgie Générale
M Pape Salif	SOW	Maladies Infectieuses
M Doudou	THIAM	Hématologie
*M Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale
M Pape	TOURE	Cancérologie
M Alassane	WADE	Ophtalmologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Moussa	BADIANE	Radiologie
M. Seydou Boubakar	BADIANE	Neurochirurgie
M. Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie Obstétrique
M. Cheikh Ahmed Tidiane	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M. Jean Marie	DANGOU	Anatomie et Cytologie Patholog.
*M. Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
*M. Massar	DIAGNE	Neurologie
M. Djibril	DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
+M. Issakha	DIALLO	Santé Publique
*M. Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M. Yémou	DIENG	Parasitologie
M. El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M. Saïd Norou	DIOP	Médecine Interne II
M. Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Boucar	DIOUF	Néphrologie
M. Mamadou Lamine	DIOUF	Gastro-Entérologie
M. Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
Mme.Mame Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar	FAYE	Parasitologie
Mme Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologique
*M. Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne
M. Assane	KANE	Dermatologie
M. Mouhamadou	MBENGUE	Gastro-Entérologie
M. Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M. Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Orthopédie-Traumato
M. Issa	NDIAYE	O.R.L
M. Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
M. Alain Khassim	NDOYE	Urologie
M. El Hadji	NIANG	Radiologie
M. Abdoulaye	SAMB	Physiologie
M. Moustapha	SARR	Cardiologie

M. Birama	SECK	Pédopsychiatrie
<hr/>		
+ disponibilité		
* Associé		
M. EL Hassane	SIDIBE	Endocrinologie-Métabolisme Nutrition-
Diabétologie		
*M. Masserigne	SOUMARE	Maladies Infectieuses
M. Ahmad Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
Mme.Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M. Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
M. Omar	SYLLA	Psychiatrie
M. Alé	THIAM	Neurologie

MAITRES-ASSISTANTS

Mme Aïssata	LY	BA	Radiologie
M. EL Hadj Amadou		BA	Ophtalmologie
Mme Mariama	GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M. Momar Codé		BA	Neurochirurgie
M. Moussa		BA	Psychiatrie
Mme. Sokhna		BA / DIOP	Radiologie
M. Boubacar		CAMARA	Pédiatrie
M. El Hadj Souleymane		CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
Mme. Mariama Safiétou	KA	CISSE	Médecine Interne
M. André Vauvert		DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie
M. Ahmadou		DEM	Cancérologie
Mme Anta	TAL	DIA	Médecine Préventive
M Bay Karim		DIALLO	O.R.L
M. Saïdou		DIALLO	Rhumatologie
M. Alassane		DIATTA	Biochimie Médicale
M. Mamadou		DIOP	Anatomie-Cancérologie
M. Saliou		DIOP	Hématologie
Mme. Elisabeth		DIOUF	Anesthésie-Réanimation
Mme Fatou	SENE	DIOUF	Neurologie
M. Saliou		DIOUF	Pédiatrie
Mme Mame Coumba	GAYE	FALL	Médecine Légale
M. Pape Ahmed		FALL	Urologie
M. Oumar		FAYE	Histologie-Embryologie
M. EL Hadj Fary		KA	Clinique Médicale/Néphrologie
M. Oumar		KANE	Anesthésie-Réanimation
*M. Abdoul Aziz		KASSE	Cancérologie
Mme Ndèye Maimouna	NDOUR	MBAYE	Médecine Interne
M. Ismaïla		MBAYE	Médecine du Travail
M. Mamadou		MBODJ	Biophysique
M. Philipe Marc		MOREIRA	Gynécologie

+Mme Coura	SEYE	NDIAYE	Ophtalmologie
*M. Cheikh Tidiane		NDOUR	Maladies Infectieuses
M Ndaraw		NDOYE	Neurochirurgie
M. Oumar		NDOYE	Biophysique
M. Abdou		NIANG	Néphrologie
Mme Suzanne Oumou		NIANG	Dermatologie
M. Abdoulaye		POUYE	Médecine Interne
Mme Paule Aïda	NDOYE	ROTH	Ophtalmologie
Mme Anne Aurore		SANKALE	Chirurgie Générale

* Associé
+ Disponibilité

Mme Anna	SARR	Médecine Interne
M Doudou	SARR	Psychiatrie
M. Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M. Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M. Gora	SECK	Physiologie
M. Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
Mme Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M. Abdourahmane	TALL	O.R.L
M. Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie
M. Silly	TOURE	Stomatologie
Mme Awa Oumar	TOURE / FALL	Hématologie
Mme Hassanatou	TOURE / SOW	Biophysique
Mme Aïssatou Magatte	WANE	Ophtalmologie
M. Issa	WONE	Médecine Préventive

ASSISTANTS

Mlle Agaïcha Tamolette	AIFIDJA	Radiologie
M. Abdoulaye	BA	Physiologie
M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie-Embryologie
Melle Fatou	DIALLO	Biochimie

Médicale

M. Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M. EL Hadj Alioune	LO	Anatomie Organogénèse
M. Papa	NDIAYE	Médecine Préventive
M. Jean Marc Ndiaga	NDOYE	Anatomie
M. Kamadore	TOURE	Médecine Préventive

CHEFS DE CLINIQUE-ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

M. Mamadou Diarra	BEYE	Anesthésie-Réanimation
M. Mamadou Lamine	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M. Abdoulaye	DANFA	Psychiatrie
&Mme Elisabeth FELLER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
Mlle Ndèye Méry	DIA	Maladies Infectieuses
Mme Ramatoulaye	DIAGNE	Pédiatrie
M. Oumar	DIARRA	Chirurgie Générale
M. Babacar	DIAO	Urologie
M. Maboury	DIAO	Cardiologie
M. Madieng	DIENG	Chirurgie Générale
* M. Mamadou Moustapha	DIENG	Cancérologie
M. Charles Bertin	DIEME	Orthopédie-traumatologie
M. Rudolph	DIOP	Stomatologie
M. Serigne Modou KANE	GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
M. Ibrahima	KONATE	Chirurgie Générale
M. Abdoulaye	LEYE	Clinique Médicale
Mme Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M. Amadou Koura	NDAO	Neurologie

* Associé
& Détachement

Mme Marième	NDIAYE	Psychiatrie
Mme Ndèye Nguénare DIOP	NIANG	Dermatologie
M. Gabriel	NGOM	Chirurgie Générale
Mme Fatou Samba D. NDIAYE	SENE	Médecine Interne
M. Idrissa	SENE	O.R.L
Mme Nafissatou Oumar	TOURE	Pneumologie

ATTACHES CHEFS DE CLINIQUE

M. Mamadou	COUME	Médecine Interne I
Mlle Yacine	DIA	Pneumologie
M. Ansoumana	DIATTA	Pneumologie

ATTACHES-ASSISTANTS

Mme. Nafissatou	NDIAYE / BA	Anatomie Pathologique
M. Babacar	FAYE	Parasitologie
Mlle Roughtatou	KA	Bactériologie
*M. Ibrahima	SECK	Médecine Préventive
M. Mohamed M.	SOUMAH	Médecine Légale

*Associé

II. PHARMACIE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. Doudou	BA	Chimie Analytique et Toxicologie
M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
Mme Aïssatou Gaye	DIALLO	Bactériologie-Virologie
+ M. Alioune	DIEYE	Immunologie
M. Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
* M. Babacar	FAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Issa	LO	Pharmacie Galénique
* M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
* M. Omar	NDIR	Parasitologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
M. Mounirou	CISS	Toxicologie
*M. Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
M. Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
Mme Aminata	SALL DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M. Yérim Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie

MAITRES-ASSISTANTS

Melle Issa Bella	BAH	Parasitologie
M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
*M. Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Tandakha NDIAYE	DIEYE	Immunologie
M. Modou	LO	Botanique
Mme. Philomène	LOPEZ / SALL	Biochimie Pharmaceutique
M. Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
Mme. Maguette D.SYLLA	NIANG	Biochimie Pharmaceutique
Mme Rita B.	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

ASSISTANTS

M. William	DIATTA	Botanique
MelleThérèse	DIENG	Parasitologie
M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M. Mor	GUEYE	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Madieye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique

* Associé

+ disponibilité

M. Mamadou	FALL	Toxicologie
Mme Aïssatou	GUEYE / NDIAYE	Bactériologie-Virologie
M. Modou Oumy	KANE	Physiologie Pharmaceutique
M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
M. Guata yoro	SY	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Alassane	WELE	Chimie Physique

ATTACHES

M. Alioune Dior	FALL	Pharmacognosie
Mme Oumou BARRY	KANE	Toxicologie
M. Gora	MBAYE	Physique Pharmaceutique
M. Sarra	NGOM	Pharmacie Galénique

* Associé

III. CHIRURGIE DENTAIRE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. Ibrahima &Mme Ndioro	BA NDIAYE	Pédodontie-Prévention Odontologie Préventive et Sociale
----------------------------	--------------	--

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

*M. Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
Mme Charlotte	FATY NDIAYE	Chirurgie Buccale
M. Malick	SEMBENE	Parodontologie

MAITRES ASSISTANTS

M. Daouda	CISSE	Odontologie Prév. et Sociale
Mme Khady	DIOP / BA	Orthopédie Dento-Faciale
Mme Soukèye	DIA / TINE	Chirurgie Buccale
*M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
Mme Adam Marie A.SECK	DIALLO	Parodontologie
Mme Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M. Malick	FAYE	Pédodontie
Melle Fatou	GAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Abdoul Wahab	KANE	Odontologie Cons. Endodontie
*M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
M. Abdoul Aziz	YAM	Pédodontie-Prévention

ASSISTANTS

M. Abdou	BA	Chirurgie Buccale
Mme Aissatou TAMBA	BA	Pédodontie-Prévention
M. Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire
Mme Farimata youga	DIENG / SARR	Matières Fondamentales
M. Babacar	FAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Daouda	FAYE	Odontologie Prév. et Sociale
M. Cheikh Mouhamadou M.	LO	Odontologie Prév. Sociale
*M. Malick	MBAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
* M. Pape Ibrahima	NGOM	Orthopédie Dento Faciale
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Mouhamed	SARR	Odontologie Cons. Endodontie
M. Babacar	TOURE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

* Associé

ATTACHES

M. Abdoulaye

M. Alpha

M. Oumar Harouna

M. El Hadj Babacar

Mlle Fatou

DIOUF

KOUNTA

SALL

MBODJ

LEYE

Parodontologie

Chirurgie Buccale

Matières Fondamentales

Prothèse Dentaire

O.C.E.

DEDICACES

Au nom d'ALLAH, tout Clément, tout Miséricordieux
Louange à ALLAH, l'Eternel, l'Omniscient, le tout Puissant
Ta miséricorde est sur ceux qui espère de toi
Tu nous as permis de passer ces difficultés avec sérénité
Guide nos pas sur le chemin qu'il nous reste à parcourir
afin que nous demeurions fidèles à tes recommandations
Ouvre nous les portes de ton savoir et de ta
connaissance ; certes tu es l'Omniscient

Amin

In Mémorium

A ma chère mère

Les mots me manquent chère mère.

Comme ton amour et ta tendresse me manquent

Que ne donnerions nous pas pour t'avoir aujourd'hui à nos côtés.

Le vide que ta disparition a laissé en nous restera éternel

Femme travailleuse, infatigable, courageuse, exemplaire, modèle de dévouement et de générosité

Le bonheur de tes enfants a été ta seule préoccupation et leur réussite ton principal souci

Tes souffrances n'ont pas été vaines

Que les portes du Paradis te soient grandes ouvertes

A mon cher père

Quelle tristesse nous ressentons à constater aujourd'hui ton absence

Tu fus un père exemplaire. Ta simplicité, ta modestie, ton humilité et ton honnêteté m'ont beaucoup marqués.

Tu n'avais jamais cessé de nous exhorter au travail.

Aujourd'hui, il ne nous reste qu'à vous affirmer notre gratitude infinie

Que Dieu vous accueille dans son Paradis

A ma tante Daba GUEYE

*Toute notre reconnaissance. Tu as toujours été présente.
Plus qu'une tante, tu as été pour nous une mère et un père.
Sans toi rien de tout cela ne serait arrivé .Ce travail est le fruit de tes multiples sacrifices
Merci pour le soutien moral et matériel que vous n'avez jamais cessé de nous apporter
Nous osons croire que ce modeste travail t'apportera joie et fierté
Que Dieu, le tout Puissant t'accorder longue vie et santé.*

A ma tante Kiné GUEYE

*Pour vos conseils et votre estime, ce travail est le votre .Voyez-y toute notre profonde gratitude.
Puisse notre affection mutuelle se perpétuer .Nous vous souhaitons de réussir sur la bonne voie que tu t'es tracée .Toute ma reconnaissance pour votre soutien.*

A ma sœur adorée Astou

*Ma sœur ,mon amie , ma complice ,ma confidente.
Toute ma reconnaissance pour ton amour ,ta patience, ton soutien à tous les niveaux m'ont donné la force , la persévérance pour mener à bien mes études.
Ce travail est le tien et j'espère t'avoir servi d'exemple .Tu as toujours su me remonter pendant les moments les plus durs.*

A mon grand frère Ibou

Merci pour tout

A Diarra, Mara, Mor, Khadim Et El Hadji.

Je leur dis : le chemin est long mais faisable

A mes oncles et leurs familles :

Je vous suis reconnaissante pour tout le soutien que vous n'avez jamais cessé de m'apporter tout au long de ces années.Merci pour tout.

Au Docteur Mamadou Moustapha Guéye et famille

Merci pour tout le soutien

A mes tantes et leurs familles

A mes cousins et cousines

A mon homonyme Kéne GUEYE et ses parents

A la famille SECK de Cambérène

A toute la famille GUEYE

A la famille SECK de Rufisque

A mes copains copines

Qui sauront sans se voir nommer, trouver ici toute ma sympathie et l'expression de mon attachement. J'espère que le temps et les années ne nous sépareront pas. Que chacun trouve ici, l'expression de mon attachement.

A Abdou Aziz Ndiaye « in memorium »

A mes camarades et Promotion

A mes co-thésards

Rose, Maïmouna, Tening, Rokhaya, Mamy Touré, Mah-Koro, Hafsatou et Ibrahima Sagna

A mes maîtres de l'école primaire Thierno Salif Ndongo

A mes professeurs de CEM Oggo Diop des Parcelles assainies

A mes professeurs du Lycée limamou Laye

A mes professeur de l'UCAD

REMERCIEMENTS

A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec : Madame Thiam, Assane Faye, Diakité, Abdallah, , Gédéon, Alose, El Hadj, Khady Léna, Aïda, Oumar, Djiby

A tout le personnel du laboratoire national de contrôle des médicaments

A tout le personnel de la Pharmacie de HALD

Au Professeur Isaac Jacob Ndiaye et sa femme tata Awa Coulibaly

*A tout le personnel de la Pharmacie du Soleil Levant,
au Docteur Alioune Diouf*

A tante Fama et famille

A Thierno Diallo et sa famille

A monsieur Abdoulaye Ndao : sincères remerciements

A tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail

A notre Maître et Président de jury

Monsieur le Professeur Omar NDIR

Vous nous avez honoré en acceptant spontanément de présider le jury de notre thèse ; vous avez toujours montré un grand intérêt pour tout ce qui touche notre formation.

Vous êtes en cela plus qu'un maître. Veuillez agréer cher Maître nos sincères remerciements.

A notre Maître et Directeur de thèse

Monsieur Le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Vous avez bien voulu nous accepter dans votre laboratoire et vous êtes évertué à nous assurer malgré vos nombreuses occupations un encadrement aussi satisfaisant que possible.

Ce travail vous est personnellement dédié.

A notre Maître et Juge

Monsieur Mamadou BADIANE Maître de conférences agrégées

Votre simplicité, vos qualités humaines, vos qualités de pédagogue, expliquent toute l'admiration que nous éprouvons à votre égard.

Nous vous sommes très reconnaissants pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger à notre jury de thèse.

Veillez accepter l'expression de notre profond respect.

A notre Maître et Juge

Monsieur Ahmad Iyane SOW Maître de Conférences agrégées

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de porter un regard critique sur ce travail nous a profondément touché.

Votre générosité dans l'effort de fournir un enseignement de qualité, votre disponibilité et votre simplicité nous marqueront à jamais.

Trouvez ici l'expression de notre profonde estime.

Liste des Abréviations

ATCC :	American Type Control Culture
E-test :	Epillometer-test
Methi-R :	Methicilline Resistant
Methi-S :	Methicilline Sensible
MH :	Muller Hinton
NCCLS :	National Control Committee Laboratories Standards
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CCI :	Concentration Critique Inférieure
CCS :	Concentration Critique Supérieure
HALD :	Hôpital Aristide Le Dantec
<i>S. aureus :</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>M. hominis :</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>U. urealyticum :</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
GENERALITES.....	3
I/ DEFINITION DES ANTIBIOTTIQUES.....	3
II/ DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE.....	4
II-1 MACROMETHODE D'ETUDE IN VITRO DE LA SENSIBILITE DES ANTIBIOTIQUES.....	4
II-1-1 Définition de la CMI de l'antibiotique	5
II-1-1-1 Méthode par dilution en milieu liquide	6
II-1-1-2 Méthode par dilution en milieu solide.....	6
II-1-2 Méthode par diffusion : méthodes des disques.....	7
II-1-3 E-test.....	8
II-2 MICROMETHODES D'ETUDE <i>IN VITRO</i> DE LA SENSIBILITE DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES	9
II-2-1 Méthode utilisant deux concentrations critiques.....	9
II-2-2 Méthode utilisant une concentration critique	10
II-2-3 Système effectuant une analyse cinétique de la croissance.....	10
II-2-4 Dilution en bouillon	10
II-2-5 Avantages et inconvénients	11
II-2-6 Facteurs influant l'étude la sensibilité aux antibiotiques	11
II-2-2-1 Facteurs extrinsèques.....	11
II-2-2-2 Facteurs liés à la bactérie.....	15
TRAVAIL PERSONNEL	18
I/ MATERIEL ET REACTIFS.....	18
I-1 SOUCHES BACTERIENNES.....	18
I-2 MATERIEL	18
I-3 REACTIFS.....	19
II/ ETUDE DE LA SENSIBILITE.....	20
II-1 PRINCIPE.....	20
II-2 PREPARATION DES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUE.....	21
II-2-1 Solution de stock	21
II-2-1-1 Principe.....	21
II-2-1-2 Définitions.....	22
II-2-1-3 Déshydratation des plaques.....	27
II-2-1-4 Préparation de l'inoculum.....	27
II-2-1-5 L'inoculation de la plaque	28
II-2-1-6 Contrôle de qualité	29
II-2-1-7 Lecture.....	29
II-2-1-8 L'interprétation des résultats	30

RESULTATS	34
I/ MISE AU POINT DE LA MICROMETHODE	34
I-1 STERILITE.....	34
I-2 EFFICACITE DU MILIEU.....	34
I-3 REPRODUCTIBILITE	34
I-4 STABILITE.....	34
I-4-1 Milieu.....	34
I-4-2 Antibiotiques.....	35
I-5 AVANTAGES DE CETTE MICROMETHODE	35
I-6 LES LIMITES DE CETTE MICROMETHODE	35
II/ RESULTATS DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES ETUDIEES PAR NOTRE MICROMETHODE	36
II-1 SENSIBILITE DES SOUCHES DE MYCOPLASMES	36
II-1-1 Sensibilité des souches <i>d'U. urealyticum</i> aux antibiotiques.....	39
II-1-2 Sensibilité des souches de <i>M. hominis</i> aux antibiotiques	40
II-1-3 Distribution phénotype de résistance des mycoplasmes	41
II-2 RESULTATS DE LA SENSIBILITE DE <i>S. AUREUS</i>	42
II-3 RESULTATS DES SOUCHES D'ENTEROBACTERIES.....	45
1- Souches.....	45
2- Antibiotiques utilisés.....	45
3- Profil de sensibilité globale des souches d'entérobactéries étudiées.....	46
4- Phénotypes de résistance et profil de sensibilité des bacilles à Gram (-)...	47
III/ RESULTATS DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES ETUDIEES PAR LA METHODE E-TEST.....	52
III-1 PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES DE <i>S. AUREUS</i> PAR E-TEST..	52
III-2 PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES D'ENTEROBACTERIES PAR E-TEST.....	54
DISCUSSION	56
I/ ETUDE COMPARATIVE DE METHODES DETUDE DE LA SENSIBILITE.....	56
I-1 AU PLAN TECHNIQUE.....	56
I-2 AU PLAN DES RESULTATS.....	56
I-3 LES SOUCHES ETUDIEES.....	58
II/ DISCUSSION PROPREMENT DITE	59
II-1 LES MYCOPLASMES UROGENITAUX.....	59
II-2 <i>S. AUREUS</i>	61
II-3 LES ENTEROBACTERIES	62
CONCLUSION	65
BIBLIOGRAPHIE	69

INTRODUCTION

Les bactéries sont des êtres vivants doués des propriétés diverses parmi lesquelles, la capacité d'élaborer des stratégies à même de s'opposer à l'action des antibactériens.

Pour cela, l'utilisation rationnelle des antibiotiques en clinique humaine devrait nécessairement passer par l'étude *in vitro* de la sensibilité des bactéries pathogènes aux différentes molécules d'antibiotiques. Ceci permettra aux cliniciens d'avoir le choix d'une antibiothérapie de première intention adaptée aux données épidémiologiques locales.

Les différentes techniques utilisées en routine pour l'étude de la sensibilité doivent répondre à plusieurs critères :

- Rapidité d'exécution
- Facilité de réalisation
- Délai de réponse court
- Fiabilité
- Reproductibilité
- Coût peu élevé

Micro CSB a été évalué pour atteindre un certain niveau indispensable à une lutte efficace contre la résistance. Le but de ce travail est de :

- standardiser l'inoculum pour l'étude de la sensibilité
- faire une étude :
 - de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux
 - de la sensibilité des entérobactéries
 - de la sensibilité des *Staphylococcus aureus*

Notre méthode utilise un indicateur coloré (rouge de phénol) pour détecter la croissance des bactéries (assimilant le glucose) contenues dans des cupules de microplaques et en présence de deux concentrations d'antibiotiques : Concentration Critique Supérieure (CCS) et la Concentration Critique inférieure (CCI).

Cette microméthode est une technique à cheval entre la méthode de diffusion et les méthodes automatisées et/ou semi automatisées dont les coûts très élevés ne sont pas à la portée des moyens matériels et financiers dont disposent nos structures.

GENERALITES

I/ DEFINITION DES ANTIBIOTIQUES (2,12,16,24)

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 (ex : Pénicilline G), semi-synthétique (ex : Ampicilline) ou synthétique (ex : chloramphénicol) 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.

Les réactions inhibées par les antibiotiques sont surtout des réactions de synthèse :

- synthèse protéique
- synthèse du peptidoglycane
- synthèse des acides nucléiques
- synthèse des folates

Pour être efficace, l'antibiotique doit satisfaire les trois conditions suivantes :

- ✓ pénétration à l'intérieur de la bactérie ;
- ✓ intervention au niveau d'une cible à l'intérieur de cette bactérie ;
- ✓ l'antibiotique ne doit pas être inactivé par des enzymes pouvant être synthétisées par cette bactérie.

L'action de l'antibiotique se traduit alors soit :

- par des modifications de la croissance : dans ce cas l'antibiotique est bactériostatique
- par des modifications de la capacité de survie : dans ce cas l'antibiotique est bactéricide

II/ LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE

Effectuer un test de sensibilité d'une bactérie suppose disposer d'une souche pure, donc un isolement et une identification de la bactérie incriminée à partir du produit pathologique

II-1 MACROMETHODE D'ETUDE *IN VITRO* DE LA SENSIBILITE DES ANTIBIOTIQUES (1, 28)

La détermination de l'effet bactériostatique et de l'effet bactéricide d'un antibiotique repose sur des faits expérimentaux.

Lorsque l'on met en contact des bactéries avec un antibiotique et que l'on suit la survie bactérienne en fonction du temps, on observe les phénomènes qui diffèrent selon la concentration d'antibiotique :

- Pour les plus basses concentrations (0,5 à 2 μ g/ml), on observe un ralentissement de la croissance bactérienne, mais à tout moment le nombre de bactéries est supérieur ou égal au nombre initial des bactéries : l'antibiotique exerce alors un effet bactériostatique. Cet effet résulte soit:
 - ✓ d'un ralentissement du temps de division bactérienne,
 - ✓ d'un équilibre entre la croissance normale et la destruction des bactéries

- pour des concentrations plus élevées (4,8 à 16µg/ml), on constate une réduction du nombre de micro-organismes au cours du temps : l'antibiotique exerce un effet bactéricide .

Parfois l'action antimicrobienne est partielle , et après une détermination précoce du nombre de bactéries , on observe une reprise de la croissance bactérienne .

Ce phénomène dit de “**rebond**” peut être dû à :

- une instabilité de l'antibiotique *in vitro* ;
- une hétérogénéité de la population bactérienne qui peut comporter un nombre de bactéries génotypiquement plus résistantes que l'ensemble de la population ;
- une induction d'enzymes conférant une résistance des bactéries à l'antibiotique , exemple : bêta-lactamases.

L'action d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut ainsi être caractérisée par sa concentration minimale inhibitrice.

II-1-1 Définition de la CMI d'un antibiotique (1, 24, 28)

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures la multiplication des bactéries (bactériostase). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories « **sensible** », « **résistante** » ou « **intermédiaire** » à l'action d'un agent antibactérien.

Une souche est dite « **résistante** » à un antibiotique, lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vivo* sans utiliser des doses toxiques.

A l'opposé, une souche est dite « **sensible** » à un antibiotique lorsque sa CMI est nettement inférieure à la concentration sanguine après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.

Si la CMI se situe entre ces deux extrêmes, la sensibilité de la souche bactérienne est dite « **intermédiaire** » : les micro-organismes ne pourront pas être atteints avec un antibiotique « **standard** ».

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne est réalisée en recourant à une méthode par dilution, par diffusion ou par élution.

Quelle que soit la méthode utilisée, elle doit être effectuée dans des conditions standardisées :

- milieu de culture adéquat choisi en fonction du germe à tester
ex : milieu de Mueller-Hinton supplémenté en ions (Ca^{2+} et Mg^{2+})
- inoculum bactérien entre 10^5 à 10^6 bactéries/ml.

II-1-1-1 Méthode par dilution en milieu liquide

On distribue dans un premier temps , dans une série de tubes à hémolyse stériles, sous un même volume des concentrations décroissantes d'antibiotique. Puis on ajoute dans chacun des tubes, sous un même volume, une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries /ml. La CMI de l'antibiotique sur la souche est définie comme la faible concentration inhibant après 18 à 24h de contact à 37°C toute croissance bactérienne visible à l'œil.

II-1-1-2 Méthode par dilution en milieu solide

Le principe de la technique en milieu solide est le même que celui de la méthode par dilution en milieu liquide .

Des concentrations croissantes de l'antibiotique sont réalisées et chaque concentration est incorporée à un milieu gélosé.

Des boîtes de Pétri peuvent être ensemencées avec plusieurs souches bactériennes à l'aide d'un ensementeur «multipointe ».

La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la formation de colonies visibles.

C'est la méthode de référence . Elle permet en outre de tester un grand nombre de souches vis à vis d'un même antibiotique (33).

En pratique on utilise la gélose MH. Son épaisseur doit être de 4mm. Pour les micro-organismes exigeants, on utilise des milieux plus riches (gélose au sang).

L'inoculum bactérien est obtenu à partir d'une souche pure et jeune (culture de 18h).

La concentration finale de l'inoculum varie de 10^5 à 10^6 bactéries/ml pour les Anaérobies.

L'ensemencement se fait par inondation ou par écouvillonnage . Cependant, ces deux techniques sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination en « routine » de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. Pour cela, on utilise la méthode par diffusion ou méthode par disques.

II-1-2 Méthode par diffusion : méthode des disques (24,28,39)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie

d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance.

A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après une incubation du milieu de culture (18heures à 37°C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où il existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI.

Pour chaque antibiotique, on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis à vis de la souche étudiée. En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI. Celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des espèces bactériennes différentes.

Il faut signaler que la gélose de Mueller-Hinton doit avoir une épaisseur de 4mm et être séchée avant emploi.

II-1-3 E-test (epsillometer test) (1, 27, 30)

Le E-test est une technique de détermination de la CMI basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone continue de 0,016 à 256mg/l ou 0,002 à 32mg/l en fonction des molécules.

Le E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes de 5mm de large et 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier .

Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec une bandelette qui définit la CMI.

Cette nouvelle méthode de mesure de la CMI présente les avantages des méthodes de diffusion : simplicité, rapidité, large choix des molécules à tester.

Cependant, la mise en place des bandelettes et l'interprétation sont délicates.

II-2 MICROMETHODES D'ETUDE *IN VITRO* DE LA SENSIBILITE DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES

II-2-1 Méthode utilisant deux concentrations critiques

Les concentrations en antibiotique qu'il est possible d'obtenir dans l'organisme se définissent par une zone de taux thérapeutique délimitée par deux valeurs critiques exprimées en $\mu\text{g/ml}$.

- La concentration critique inférieure (CCI) correspond au taux sanguin moyen obtenu aux posologies habituelles.
- La concentration critique supérieure (CCS) correspond au taux sanguin maximal obtenu par l'administration de fortes doses. Avec cette méthode, on peut interpréter directement les résultats de l'antibiogramme.

En effet, on utilise les concentrations critiques supérieures et inférieures fixées par les comités nationaux d'antibiogramme.

Le résultat obtenu est logique :

- La croissance en présence de la plus forte concentration d'antibiotique est le fait de souches résistantes ;

- La croissance en présence de la plus faible concentration est caractéristique des souches intermédiaires.
- L'inhibition de la croissance aux deux concentrations d'antibiotique est spécifique des souches sensibles.

La lecture se fait à l'œil nu.

II-2-2 Méthodes utilisant une concentration critique

Ces méthodes étudient la croissance de la bactérie en présence d'une seule concentration d'antibiotique adaptée pour discriminer les bactéries sensibles des résistantes. Cette concentration n'est pas liée aux concentrations critiques. L'inoculum bactérien est de 10^6 bactéries / ml.

II-2-3 Système effectuant une analyse cinétique de la croissance

L'analyse cinétique de la croissance bactérienne a été la base du premier système d'antibiogramme automatique qui a été commercialisé. Le principe de fonctionnement ne diffère cependant pas fondamentalement des systèmes utilisant une concentration. Les systèmes donnent des réponses précoces et permettent quelques fois l'estimation de la CMI :

- soit en utilisant plusieurs concentrations d'antibiotiques.
- soit en utilisant le calcul spécifique (propre à chaque fabricant).

II-2-4 Dilution en bouillon

Les méthodes de dilution en bouillon MH pour la détermination de la CMI peuvent être réalisées en plaque de microtitration. Cette microméthode est plus adaptée pour la pratique de l'antibiogramme grâce à une automatisation possible.

Les systèmes pour antibiogramme ont trouvé leur place dans les laboratoires de microbiologie.

Leurs performances sont comparables à celle des technologies conventionnelles. Certains permettent aussi l'obtention rapide de résultats, ce qui assure aux biologistes un suivi plus fiable de leurs patients.

II-2-5 Avantages et inconvénients

▪ Avantages

Les microméthodes d'étude de la sensibilité présentent plusieurs avantages. Les évaluations récentes des divers systèmes d'antibiogramme automatique montrent que la concordance avec la CMI (méthode de référence) existe dans plus de 85% des cas. Ce pourcentage de concordance peut varier selon le système. Ces microméthodes ont permis de réduire (en tout cas par certains) les délais de réponse.

▪ Inconvénients

Les microméthodes présentent néanmoins des inconvénients :

- seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes ;
- aucun système actuellement disponible ne mérite au sens strict le qualificatif d'automatique, c'est à dire ne réalise de façon automatique l'ensemble des

phases de la détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques.

II-2-6 Facteurs influant l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

II-2-6-1 Facteurs extrinsèques (24)

L'étude de l'action des antibiotiques n'obéit pas à une loi physique simple aisément formulable par une équation mathématique. Les phénomènes biologiques complexes qui entrent en jeu dépendent de nombreux paramètres pas toujours indépendants. Il est donc important de standardiser les techniques pour une bonne appréciation de l'activité antibiotique. L'observation rigoureuse des règles régissant l'encadrement des différents facteurs s'avère primordiale pour avoir des résultats fiables.

II-2-6-1-1 L'environnement des cultures

- **Température d'incubation**

L'élévation de la température entre 37°C et 42°C entraîne une augmentation progressive de l'activité antibiotique.

- **Atmosphère d'incubation**

- **Aéro-anaérobiose**

Certains antibiotiques sont peu influencés (Ex : Chloramphénicol)

- Le pH

Le pH influence l'activité de presque tous les antibiotiques.

Les antibiotiques très actifs en milieu acide sont Pénicillines, Céphalosporines et Tétracyclines.

Les antibiotiques très actifs en milieu alcalin sont les macrolides, les oligosaccharides.

En pratique, dans les tests de routine d'étude de la sensibilité des souches, on travaille en général à un pH proche du pH physiologique.

• Composition du milieu

- Glucides

Les glucides en augmentant la croissance bactérienne et / ou en modifiant le pH (assimilés) peuvent influencer l'action d'un antibiotique.

- Ions

Selon le cas, ils activent ou amplifient l'action de l'antibiotique et / ou la croissance bactérienne. Exemple : Ca^{2+} ; Mg^{2+}

II-2-6-1-2 L'antibiotique

Les solutions d'antibiotique doivent être préparées et conservées selon des règles bien établies.

Ainsi, les préparations standards ou de référence obtenues directement sont dissoutes dans un solvant approprié et diluées de façon à obtenir les concentrations désirées. Les solvants et diluants utilisés ne doivent pas inhiber l'action de l'antibiotique. Les antibiotiques doivent être conservés selon les directives du

fabriquant en ce qui concerne les poudres ; pour ce qui est des solutions, elles sont conservées en général à -20°C ou à -70°C .

II-2-6-1-3 L'inoculum bactérien

Plusieurs facteurs tiennent à l'inoculum

- Le nombre de bactériesensemencées
- La phase de croissance de la cultureensemencée
- La vitesse de croissance de la bactérie

- **Nombre de bactériesensemencées**

L'importance de ce facteur varie selon l'antibiotique et selon l'hétérogénéité éventuelle de la population bactérienne : si la population est homogène, les variations de la CMI sont assez faibles pour la plupart des antibiotiques. Exemple : entre 10^4 et 10^6 bactéries / ml, la CMI varie du simple au double pour les pénicillines, les macrolides. C'est pourquoi on utilise en général un inoculum de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 bactéries / ml.

Un inoculum faible (10^3 bactéries / ml) augmente la sensibilité alors qu'un fort ($>10^6$ bactéries) la diminue fortement.

- **Phase de croissance de l'inoculum**

La phase de croissance dans laquelle se trouve la culture où est prélevé l'inoculum intervient dans l'activité de l'antibiotique. L'action de l'antibiotique en effet est liée à un certain état du métabolisme bactérien. Exemple : la Pénicilline utilise un inoculum en phase de croissance.

II-2-6-1-4 La lecture

Le temps au bout duquel s'effectue la lecture de même que les procédés d'appréciation (optique ou photométrique) jouent un rôle important dans les tests de sensibilité.

II-2-6-2 Facteurs liés a la bactérie

II-2-6-2-1 Notion de résistance (1, 24, 35)

La résistance bactérienne aux antibiotiques, a en effet deux définitions :

1- une souche est dite « **résistante** » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration qu'il est permis d'atteindre *in vivo*.

2- une souche est dite « **résistante** » lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

II-2-6-2-2 Les types de résistance

Un micro-organisme peut présenter une résistance naturelle ou acquise vis à vis de certains antibiotiques.

- **Résistance naturelle**

Elle correspond à l'insensibilité de la souche sauvage à l'antibiotique considéré. La résistance naturelle est un caractère chromosomique présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce.

La résistance naturelle est une propriété génétique qui sera transmise de génération en génération (sauf mutation).

- Résistance acquise

Au cours de l'utilisation d'un même antibiotique, une souche peut se révéler résistante par une élévation brutale de la CMI ; on parle de résistance acquise.

Elle n'apparaît donc que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible.

La résistance acquise résulte soit :

- d'une mutation chromosomique
- de l'acquisition d'un ou de plusieurs gènes qui rendent la bactérie insensible à l'antibiotique ; on parle de **résistance plasmidique**.

- Mécanismes de la résistance

Production d'enzyme bêta-lactamase

Les bêta-lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle bêta-lactame (structure de base des bêta-lactamines) dont l'hydrolyse entraîne la perte de l'activité antibactérienne. Ces bêta-lactamases sont produites par beaucoup de micro-organismes.

Imperméabilisation de la paroi

La structure de la paroi permet de comprendre le mécanisme d'action des antibiotiques de même que le mécanisme de résistance.

La résistance par imperméabilité de la paroi n'est observée que chez les bactéries à Gram négatif, car leur paroi (du fait de sa structure) empêche

naturellement la diffusion des molécules hydrophobes (mécicilline, cloxacilline, fusidine, érythromycine).

Modification de la cible PLP

Les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), individualisées dans la membrane cytoplasmique des différentes espèces bactériennes, interviennent dans les stades ultimes de la biosynthèse du peptidoglycane.

Une modification de ces pénicillines et / ou une diminution de l'affinité de ces pénicillines par les antibiotiques permettent à certaines bactéries de rester insensibles à l'action d'un antibiotique. Car pour être actif, l'antibiotique doit se fixer sur une cible.

TRAVAIL PERSONNEL

I/ MATERIEL ET REACTIFS

I-1 SOUCHES BACTERIENNES

Nous avons travaillé sur les souches suivantes :

- mycoplasmes urogénitaux (*Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*),
- *Staphylococcus aureus*
- et Entérobactéries.

Ces souches ont été conservées à -70°C .

I-2 MATERIELS

- Micro pipettes de 10 μl , de 100 μl ,
- Embouts
- Four à micro-onde
- Hotte à flux laminaire
- Tubes à essai pour les dilutions
- Filtres
- Seringues
- Déshydratant
- Balance de précision
- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Microplaques

- Papier adhésif
- Support

I-3 REACTIFS

Les réactifs utilisés sont des solvants, des diluants et des antibiotiques qui appartiennent à différentes familles.

I-3-1 Pour l'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux

- Erythromycine
- Clarithromycine
- Doxycycline
- Tétracycline
- Ofloxacin
- Ciprofloxacine

I-3-2 Pour l'étude de la sensibilité des *Staphylocoques aureus*

- Pénicilline G
- Erythromycine
- Doxycycline
- Amoxicilline
- Amikacine
- Chloramphénicol
- Ciprofloxacine

I-3-3 Pour l'étude de la sensibilité des Entérobactéries

- Amoxicilline
- Aztréonam
- Ciprofloxacine
- Amikacine
- Céfixime
- Ampicilline
- Doxycycline

II/ ETUDE DE LA SENSIBILITE

II-1 PRINCIPE

L'étude de sensibilité aux antibiotiques va consister à ajouter au milieu (inoculum) deux concentrations critiques d'un antibiotique donné. Après une incubation de 18 à 24 heures, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

II-2 PREPARATION DES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUE

II-2-1 Solution de stock

II-2-1-1 Principe

Il est basé sur la préparation d'une solution mère 200 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure de l'antibiotique dans le solvant considéré.

Un antibiotique est défini comme :

- une substance généralement synthétisée par un micro-organisme, mais souvent modifiée chimiquement ou même synthétisée entièrement par les chimistes.
- une molécule toxique pour un groupe cible de micro-organismes mais peu toxique pour les cellules eucaryotes supérieures, donc utilisable par voie générale.
- une substance de mode d'action spécifique et actif à des concentrations faibles de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Pour la préparation, les masses à peser dépendent de l'activité des antibiotiques. L'activité d'un antibiotique est la quantité de principe actif en μg contenu dans 1mg de produit.

$\text{Quantité à peser (mg)} = \frac{V \text{ (ml)} \times C \text{ (mg/ml)}}{\text{Activité } (\mu\text{g/mg})}$
--

II-2-1-2 Définitions

- **CCS** : Concentration critique supérieure

La solution mère contient la quantité requise de produit pour obtenir, par une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ avec le diluant approprié et une dilution ultérieure au $1/2$ par le milieu utilisé dans la cupule, la CCS.

- **CCI** : Concentration critique inférieure

Elle a été obtenue pour chaque antibiotique en faisant une dilution de la CCS.

Pour les antibiotiques choisis, les concentrations à préparer sont répertoriées dans les tableaux suivants :

Tableau I : Préparation des solutions d'antibiotique pour l'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux

Antibiotiques	CCI µg/ml (1)	CCS µg/ml (2)	Conc SM g/l (3)	Vol SM (ml)	Assay potency (mg/g) (4)	Masse à peser (mg)	Solvants diluants	Conc ST (CCI) g/l (5)	Conc ST (CCS) g/l (5)	Dilution CCSVCCI (6)	Vol à déshydrater µl (7)
Tétracycline	4	8	16	1	1000	16	Eau distillée	0,08	0,16	1/2	100
Doxycycline	4	8	16	1	1000	16	Eau distillée	0,08	0,16	1/2	100
Erythromycine	1	4	8	2	952	16,8	Eau distillée	0,02	0,08	1/4	100
Clarithromycine	2	8	16	1	984	16	Méthanol, tampon phosphate pH 6,5 : 0,1 M	0,04	0,16	1/4	100
Ofloxacine	1	4	14	1	1000	80 µl	Eau distillée	0,02	0,08	1/4	100
Ciprofloxacine	1	4	8	2	931,6	17,2	Eau distillée	0,02	0,08	1/4	100

- (1) CI : concentration critique inférieure
- (2) CCS : concentration critique supérieure
- (3) SM : solution mère
- (4) Vérifier l'assay potency pour chaque lot de produit pour en déduire la masse à peser selon la formule

La masse d'antibiotique requise est dissoute dans le volume exigé de solvant stérile pour obtenir la concentration de la solution mère qui est ensuite conditionnée en cryotubes est conservée à -70°C , cette solution mère est 100 fois plus concentrée que la STCCS. Il faut diluer donc la solution mère au $1/100^{\text{ème}}$ pour obtenir les STCSS et les STCCI.

ST : solution de travail : diluer les SM au $1/100^{\text{ème}}$ pour réaliser les concentrations des solutions de travail pour CCS et CCI.

- (5) faire en sorte que les volumes de STCCS et STCCI soient égaux ou très proches pour minimiser les pertes.
- (6) déshydrater le même volume à 37°C pendant 24 heures dans les puits des microplaques.

Tableau II : Préparation des solutions d'antibiotiques pour l'étude de la sensibilité de *Staphylococcus aureus*

Antibiotiques	CCI (µg/ml)	CCS (µg/ml)	Conc SM g/l	Vol SM (ml)	Masse à peser (mg)	Solvants diluants	Dilutions CCS / CCI	Cons ST CCS (µg/ml)	Cons ST CCI (µg/ml)	Vol à déshydrater µl
Pénicilline G	0,25	16	3,2	1	3,2	Eau distillée	1/64	32	0,5	80
Ciprofloxacine	1	2	0,4	1	0,4	Eau distillée	1/2	4	2	80
Erythromycine	0,5	1	2	1	2	Eau distillée	1/2	8	2	80
Doxycycline	16	32	6,4	1	6,4	Eau distillée	1/2	64	32	80
Amikacine	4	32	6,4	1	6,4	Eau distillée	1/8	64	8	80
Chloramphénicol	8	16	3,2	1	3,2	Méthanol- eau distillée	1/2	32	16	80
Amoxicilline	4	32	6,4	1	6,4	Tampon phosphate 0,1 M (pH6) eau distillée	1/8	64	8	80

Tableau III : Préparation des solutions d'antibiotique pour l'étude de la sensibilité des Entérobactéries

Antibiotiques	CCI (µg/ml)	CCS (µg/ml)	Conc SM g/l	Vol SM (ml)	Masse à peser (mg)	Solvants-diluants	Dilutions CCS / CCI	Cons ST CCS (µg/ml)	Cons ST CCI (µg/ml)	Vol à déshydrater µl
Amoxicilline	16	32	6,4	1	6,4	Tampon phosphate 0,1 M pH6 eau distillée	1/2	64	32	80
Aztréonam	16	32	3,2	2	6,4	Eau distillée	1/2	64	32	80
Ciprofloxacine	1	2	0,4	1	0,4	Eau distillée	1/2	4	2	80
Amikacine	4	8	1,6	2	3,2	Eau distillée	1/2	16	8	80
Ampicilline	4	16	3,2	1	6,4	Tampon phosphate 0,1 M pH8 eau distillée	1/4	32	16	80
Céfixime	1	2	2	1	2	Tampon pH8 -eau distillée	1/2	4	2	80
Doxycycline	1	2	0,4	1	0,4	Eau distillée	1/2	4	2	80

II-2-1-3 Déshydratation des plaques

Après rinçage à l'eau savonneuse, les plaques sont trempées dans l'alcool 70°C pendant 24 heures. Les plaques sont ensuite séchées et stérilisées au four à micro-onde.

❖ Pour les Mycoplasmes urogénitaux

100 µl du double de la CCS des antibiotiques et 100 µl de la CCI des antibiotiques donnés ont été respectivement distribuées dans les cupules supérieures (C) et inférieures (c) ou opposées (c) correspondantes selon un ordre bien établi.

❖ Pour les *Staphylococcus aureus* et les Entérobactéries

Ce sont 80 µl du double de la CCS d'un antibiotique donné et 80 µl de la CCI qui sont distribuées dans les cupules supérieures et inférieures ou opposées.

Les plaques sont ensuite portées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C.

Les plaques déshydratées et munies d'un support ont été scellées dans des sachets stériles avec un dessiccateur et gardées à l'abri de la poussière.

II-2-1-4 Préparation de l'inoculum

Pour les Mycoplasmes, l'inoculum est préparé à partir des isolats qu'il faudra diluer au 1/100^{ème} en bouillon urée pour *Ureaplasma urealyticum* et en bouillon arginine pour *Mycoplasma hominis* pour obtenir l'inoculum standardisé.

Pour les Staphylocoques et les Entérobactéries, il faut préparer un bouillon MH supplémenté en Ca²⁺ et Mg²⁺.

La formule par litre :

Bouillon MH : 50 g

Glucose : 4 g

Rouge de phénol : 100 mg (ou 5 ml d'une solution à 1%)

Solution de Mg Cl₂ à 25 mg/l : 2,5 ml

Eau distillée qsp : 1000ml

Solution de CaCl₂ à 50 mg/l : 5 ml

pH 7,4 +/- 0,2

Le bouillon contenant le glucose et le rouge de phénol a été autoclavé à 115°C pendant 15mn. Les solutions de MgCl₂ et de CaCl₂ ont été ajoutées au milieu autoclavé après été stérilisées par filtration.

Nous avons préparé une suspension dans de l'eau distillée stérile, nous l'avons ajusté à une opacité équivalente à l'étalon 0,5 Mc FARLAND. Cette suspension a été diluée de façon différente selon le germe :

- Entérobactéries : dilution au 1/1000^{ème} (5µl dans 5 ml de milieu).
- *Staphylococcus aureus* : dilution à 1/100^{ème} (5µl dans 50 ml de milieu).

II-2-1-5 Inoculation de la plaque

✓ Mycoplasmes urogénitaux

Nous avons inoculé 100 µl de cette dilution dans des cupules contenant les antibiotiques et 2 cupules servant de témoin de croissance, c'est-à-dire ne contenant pas d'antibiotique.

✓ *Staphylococcus aureus* et Entérobactéries

80 µl de l'inoculum bactérien sont distribués dans chaque cupule.

Nous avons recouvert la plaque de papier adhésif et incubé pendant 18 à 24 heures sous papier buvard imbibé d'eau pour éviter la déshydratation du milieu.

II-2-1-6 Contrôle de qualité

- Stérilité

Avant son utilisation, le milieu d'étude de la sensibilité est incubé sans inoculum pendant 24 heures à 37°C.

Le milieu est considéré comme stérile s'il y a absence de virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

- Efficacité

Elle se traduit par la capacité du milieu à changer de coloration après test avec des souches de référence. (*E. coli* :ATCC 25922 et *S. aureus* :ATCC 29213)

II-2-1-7 Lecture

Il s'agira de vérifier la croissance ou l'absence de croissance dans les cupules. Cette croissance, avec les CMI des antibiotiques aidant, nous permettra de catégoriser les souches en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes.

II-2-1-8 Interprétation des résultats

L'interprétation se fera en fonction de la CMI de l'antibiotique. La CMI est la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible d'un germe en 18- 24 heures.

Elle est encadrée par deux valeurs qui sont : la concentration critique supérieure (C) et la concentration critique inférieure (c).

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* :

- sensible (**S**),
- résistante (**R**)
- intermédiaire (**I**).

Les souches **S** : sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte. Les concentrations utilisées sont inférieures ou égales à la concentration critique inférieure (c).

Les souches **R** : sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique. Les concentrations utilisées sont supérieures à la concentration critique supérieure (C).

Les souches **I** : sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. La CMI de l'antibiotique testé est comprise entre les deux concentrations critiques.

a) Pour les Mycoplasmes urogénitaux

	$\leq c$ (mg/ml)	$> C$ (mg/ml)	
CMI	CMI	CMI	CMI
Souche sensible	Souche intermédiaire	Souche résistante	
Antibiotiques			
Tétracycline	4	8	
-			
Doxycycline	4	8	
-			
Erythromycine	1	4	
-			
Clarithromycine	2	8	
-			
Ofloxacine	1	4	
--			
Ciprofloxacine	1	4	
-			

b) Pour les *Staphylococcus aureus*

	CMI	$\leq c$ (mg/ml)	CMI	$> C$ (mg/ml)	CMI
	Souche sensible		Souche intermédiaire		Souche résistante
	Antibiotiques				
Pénicilline G	---	0,25	---	-16	---
--					
Ciprofloxacine	---	1	---	2	---
Erythromycine	---	0,5	---	1	---
-					
Doxycycline	---	16	---	32	---
-					
Amikacine	---	4	---	32	---
--					
Chloramphénicol	---	8	---	16	---
--					
Amoxicilline	---	4	---	32	---
-					

c) Pour les Entérobactéries

	CMI	$\leq c$ (mg/ml)	CMI	$> C$ (mg/ml)	CMI
	Souche sensible		Souche intermédiaire		Souche résistante
<u>Antibiotiques</u>					
Amoxicilline	----- 16	↑	----- 32	↑	-----
-					
Aztréonam	----- 4	↑	----- 32	↑	-----
-					
Ciprofloxacine	----- 1	↑	----- 2	↑	-----
--					
Amikacine	----- 4	↑	----- 8	↑	-----
-					
Ampicilline	----- 4	↑	----- 32	↑	-----
Doxycycline	----- 1	↑	----- 2	↑	-----
--					
Céfixime	----- 1	↑	----- 2	↑	-----

RESULTATS

I/ MISE AU POINT DE LA MICROMETHODE

I-1 STERILITE

Le milieu nouvellement préparé fait l'objet d'un test de stérilité, s'il y a virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune dans la cupule « **témoin** » non ensemencée, le milieu est éliminé ou considéré comme non stérile.

I-2 EFFICACITE DU MILIEU

Le milieu considéré comme stérile a été soumis à un contrôle d'efficacité.

Nous avons constaté que les milieux préparés selon les normes décrites dans la deuxième partie, passaient du rouge au jaune en présence des bactéries attaquant le glucose.

I-3 REPRODUCTIBILITE

Ce test de reproductibilité a été effectué avec deux souches de l'ATCC : *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Ces souches ont été testées chaque fois que des solutions d'antibiotique ont été préparées.

I-4 STABILITE

I-4-1 Milieu

Milieu préparé et conservé à 4°C est resté stable pendant longtemps. Les contrôles de stérilité et d'efficacité ont été satisfaisants.

I-4-2 Antibiotiques

Nous avons suivi les directives du fabricant en ce qui concerne la conservation des poudres.

Les solutions mères restent stables à -20°C pendant 6 mois pour la plupart des antibiotiques utilisés en 6 semaines à -20°C pour l'amoxicilline et l'ampicilline.

I-5 LES AVANTAGES DE CETTE MICROMETHODE

- Coût peu élevé
- Miniaturisation : elle permet en effet d'utiliser de petites quantités de produit et réactifs.
- Lecture facile
- Interprétation directe des résultats

I-6 LES LIMITES DE CETTE MICROMETHODE

- La dilution extemporanée des antibiotiques augmente considérablement la durée de la manipulation.
- La méthode mise au point ne permet pas de détecter les phénomènes de synergie ou d'antagonisme.
- Elle est destinée aux bactéries fermentaires (en général), or l'étude n'a porté que sur les entérobactéries, les mycoplasmes urogénitaux et les staphylocoques dorés.
- L'antibiogramme est limité par le nombre de cupules présentes dans la microplaque.

II/ RESULTATS DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES ETUDIEES PAR NOTRE MICROMETHODE

II-1 SENSIBILITE DES SOUCHES DE MYCOPLASMES AUX ANTIBIOTIQUES

Nous avons eu à tester 25 souches dont :

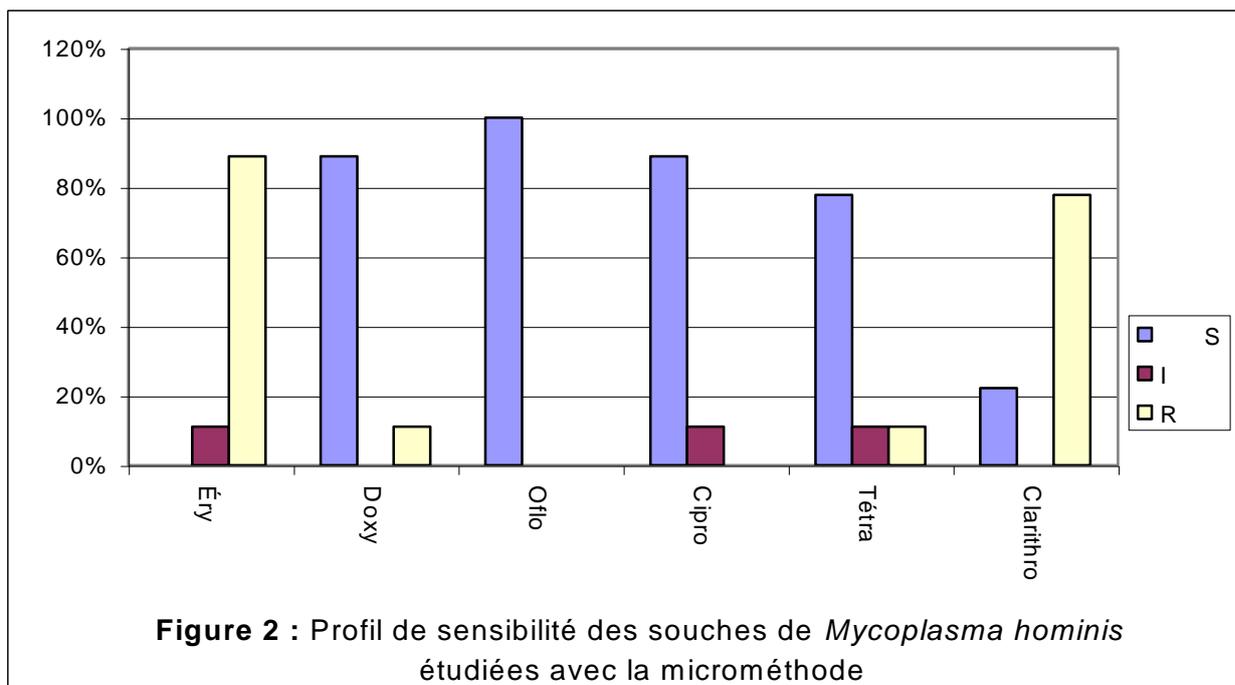
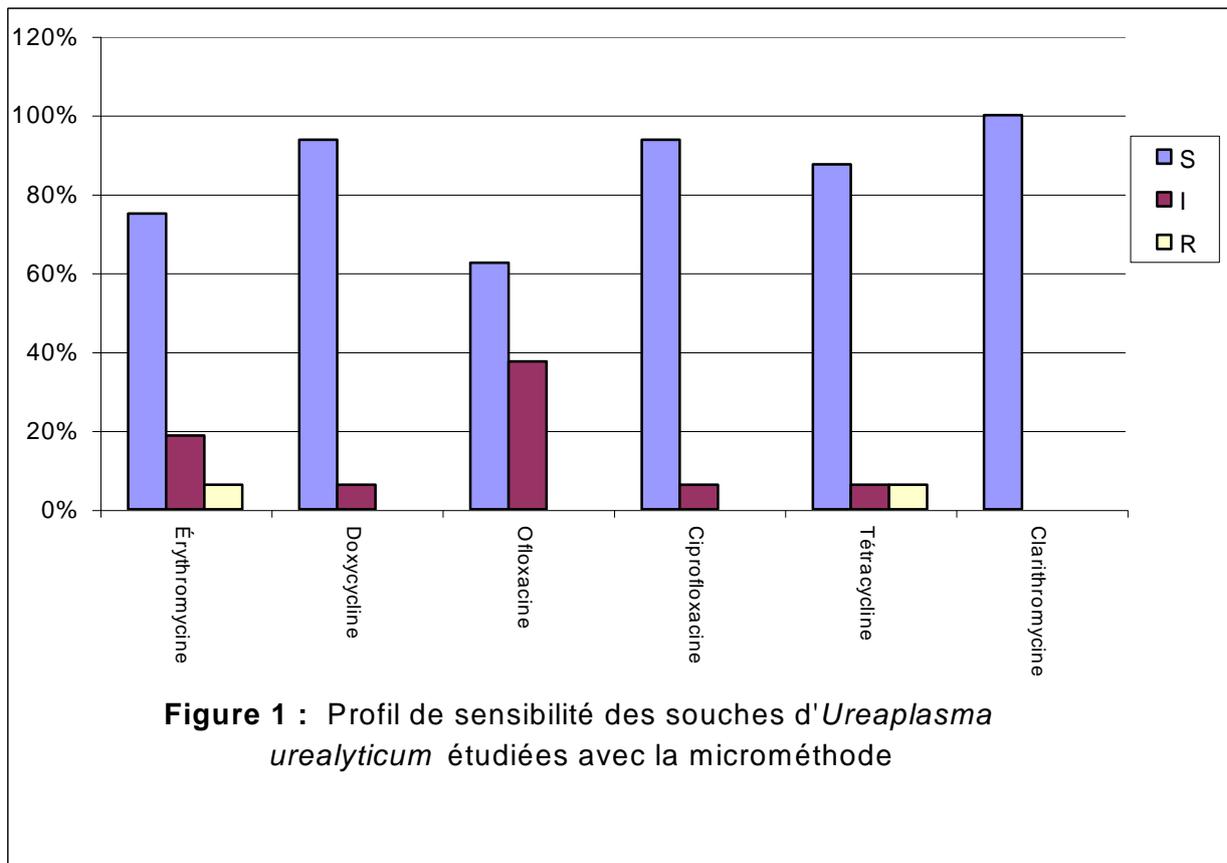
- 16 souches d'*Ureaplasma urealyticum*
- 09 souches de *Mycoplasma hominis*

Les souches ont été sélectionnées du lot de souches identifiées isolées et titrées. Nous avons choisi des isolats dont le titre est supérieur ou égal à 10^5 UCC/ml afin de respecter les normes de l'antibiogramme des mycoplasmes.

Six antibiotiques appartenant à trois familles différentes (les cyclines, les macrolides, les quinolones) ont été testés et pour chacun d'entre eux, nous avons déterminé les concentrations critiques inférieures et supérieures, le nombre et le pourcentage de souches sensibles, intermédiaires et résistantes des mycoplasmes.

Tableau IV : Profil de sensibilité des souches de mycoplasmes

	<i>Ureaplasma urealyticum</i>						<i>Mycoplasma hominis</i>					
	S	%	I	%	R	%	S	%	I	%	R	%
Érythromycine	12	75%	03	18,75%	01	6,25%	00	0%	01	11,10%	08	88,90%
Doxycycline	15	93,75%	01	6,25%	00	0%	08	88,90%	00	0%	01	11%
Ofloxacine	10	62,50%	06	37,50%	00	0%	09	100%	00	0%	00	0%
Ciprofloxacine	15	93,75%	01	6,25%	00	0%	08	88,90%	01	11,10%	00	0%
Tétracycline	14	87,50%	01	6,25%	01	6,25%	07	77,80%	01	11,10%	01	11,10%
Clarithromycine	16	100%	00	0%	00	0%	02	22,20%	00	0%	07	77,80%



II-1-1 Sensibilité des souches d'*Ureaplasma urealyticum* aux Antibiotiques

- **Les quinolones**

Les quinolones étudiées ici sont la ciprofloxacine et l'ofloxacine. Pour la ciprofloxacine, nous avons 93,70% de souches sensibles (15 souches), 6,30% de souches intermédiaires (1 souche) et une résistante nulle.

Quant à l'ofloxacine, 62,50% des souches sont sensibles (10 souches) 37,50% de souches intermédiaires (6 souches) et pas de souches résistantes.

- **Les cyclines**

La doxycycline a les pourcentages suivants : 93,70% de souches sensibles (15 souches) et 6,25% (1 souche) de souches intermédiaires et pas de résistance.

Pour la tétracycline, on a : 87,50% de souches sensibles (14 souches), 6,25% de souches intermédiaires (1 souche) et 6,25% de souches résistantes (1 souche).

On peut dire que la doxycycline a montré une meilleure activité. La doxycycline est 4 fois plus efficace que la tétracycline :

$CMI_{50/90}$ (tétra) = 1 μ g/ml et 2 μ g/ml

$CMI_{50/90}$ (doxy) = 0,25 μ g/ml et 0,50 μ g/ml

Une augmentation de la résistance des mycoplasmes à la tétracycline a été notée. Cette résistance est due à l'acquisition par les mycoplasmes du gène T et (M) qui est un déterminant récemment acquis chez les mycoplasmes.

- **Les macrolides**

L'érythromycine a donné 75% de souches résistantes (12 souches), 18,75% de souches intermédiaires (3souches) et 6,25% de souches résistantes (1 souche).

La clarithromycine est apparue très active sur *Ureaplasma urealyticum* avec un taux de 100% (16 souches).

II-1-2 Sensibilité des souches de *Mycoplasma hominis* aux antibiotiques

- **Quinolones (ciprofloxacine, ofloxacine)**

Nous avons noté une absence de souches résistantes. Nous avons eu 100% de souches sensibles (9souches).

- **Les cyclines**

Les souches de *Mycoplasma hominis* dans l'ensemble ont été sensibles à la Doxycycline et à la tétracycline.

La doxycycline a une meilleure activité (88,90%) (8 souches) par rapport à la tétracycline (77,70%) (7 souches).

Nous avons noté 11,10% de souches résistantes (1 souche) à la tétracycline 11,10% de souches intermédiaires (1 souche).

La doxycycline est 2 à 4 fois plus efficace que la tétracycline.

$CMI_{50/90}$ (tétra) = 0,50 μ g/ml et 8 μ g/ml

$CMI_{50/90}$ (doxy) = 0,125 μ g/ml et 4 μ /ml

- **Les macrolides**

L'érythromycine est inactive sur *Mycoplasma homonis*. Nous avons noté une résistance de 88,90% (8 souches) et les souches intermédiaires ont un pourcentage de 11,10% (1 souche).

Quant à la clarithromycine, nous avons obtenu 77,70% de souches résistantes (7 souches) et 22,30% de souches sensibles (2 souches).

II-1-3 Distribution des phénotypes de résistance des mycoplasmes

- *Mycoplasma hominis*

Nous avons effectué une répartition des phénotypes de résistance aux différents antibiotiques étudiés : tétracycline, doxycycline, ciprofloxacine, érythromycine clarithromycine et ofloxacine

La répartition des phénotypes de résistance des souches de *M. hominis* aux macrolides a montré une plus grande fréquence du phénotype E par rapport au phénotype L.

Une souche a développé le phénotype EL et a été résistante à la tétracycline et à la doxycycline (1TDEL).

- *Ureaplasma urealyticum*

La répartition des phénotypes de résistance des souches de *U. urealyticum* aux macrolides a montré une plus grande fréquence du phénotype L par rapport au phénotype E.

Parmi les 8 souches résistantes à l'érythromycine, nous avons deux qui ont développé le phénotype D (2TDL) et une qui est résistante à la doxycycline et la à tétracycline

II-2 RESULTATS DE LA SENSIBILITE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Nous avons eu à travailler sur 25 souches de *Staphylococcus aureus*. Les souches ont été conservées à -70°C . Les souches se sont toutes révélées Méthi-S

Les souches sont réisolées et ceci nous a permis d'étudier leur sensibilité.

Les antibiotiques utilisés appartiennent à différentes familles. Nous avons :

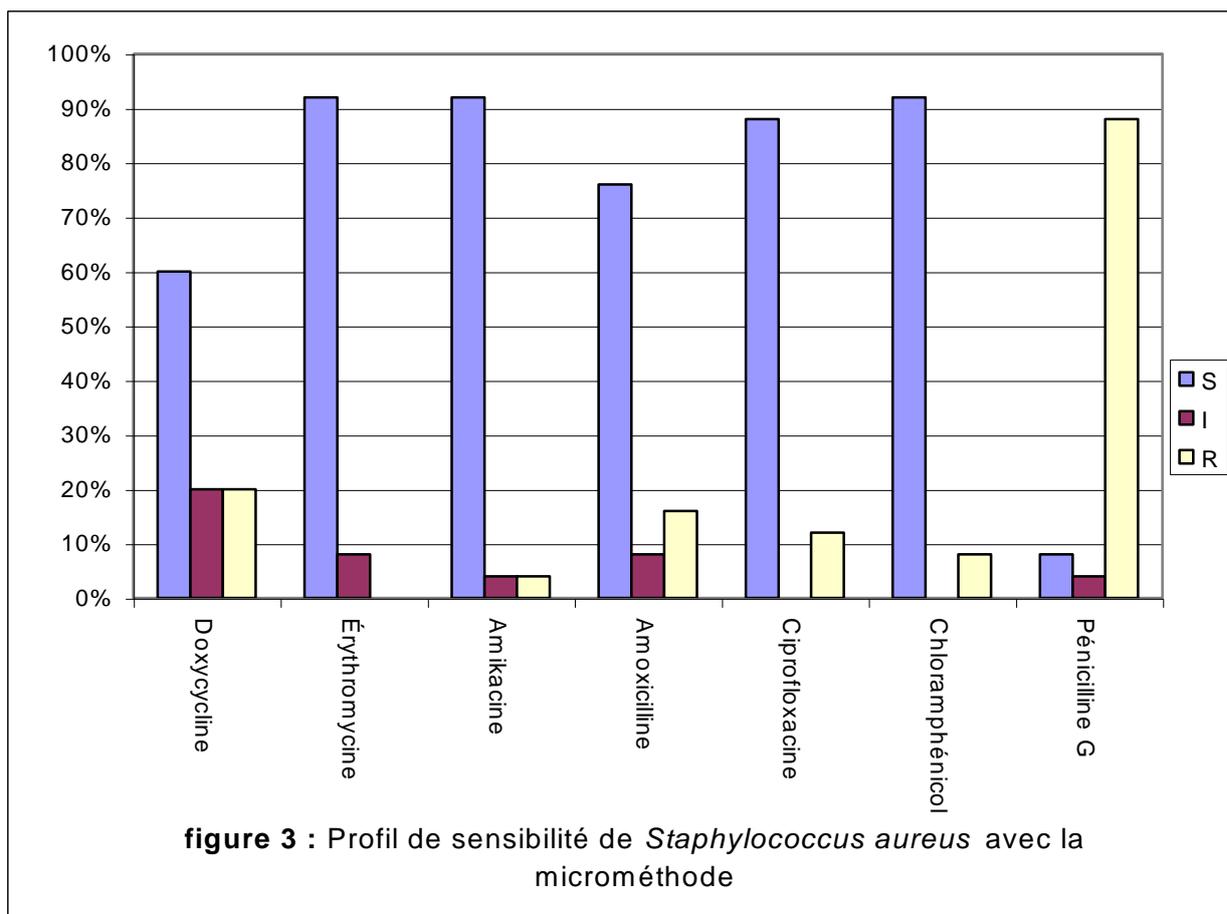
- les aminopénicillines : Amoxocilline

- les aminoside : Amikacine
- les phénicolés : Chloramphénicol
- les macrolides : Erythromycine
- les quinolones : Ciprofloxacine
- les cyclines : Doxycycline
- les Pénicillines : Pénicilline G

Nous avons eu à tester la méthicillino-résistance et toutes les souches se sont révélées méthi-S.

Tableau V : Profil de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus*

	<i>Staphylococcus aureus</i>					
	S	%	I	%	R	%
Doxycycline	15	60%	05	20%	05	20%
Érythromycine	23	92%	02	8%	00	0%
Amikacine	23	92%	01	4%	01	4%
Amoxicilline	19	76%	02	8%	04	16%
Ciprofloxacine	22	88%	00	0%	03	12%
Chloramphénicol	23	92%	00	0%	02	8%
Pénicilline G	02	8%	01	4%	22	88%



- **La pénicilline G**

Nous avons obtenu 88% de résistance ; 4% des souches sont révélées intermédiaires et 8% des souches sont sensibles.

- **L'érythromycine**

L'érythromycine conserve une bonne activité sur nos souches avec une inhibition de 92%.

- **L'amikacine**

Bonne activité avec une sensibilité de 92% . Les souches résistantes et intermédiaires ont des pourcentages de 4% chacun.

- **L'amoxicilline**

76% de sensibilité, 16% de résistance et 2% de souches intermédiaires

- **La ciprofloxacine**

88% de sensibilité, 12% de résistance.

- **Le chloramphénicol**

L'activité de cet antibiotique est bonne avec 92% de sensibilité. La résistance est de 8%.

- **La doxycycline**

Une efficacité de 60% a été notée tandis que le pourcentage des souches résistantes et intermédiaires est de 20%.

II-3 RESULTATS DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES D'ENTEROBACTERIES

Sur les 16 souches avec lesquelles, nous avons travaillé, les espèces testées sont :

1) Souches

Souches	Nombre
<i>Escherichia coli</i>	06
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04
<i>Salmonella typhi I</i>	01
<i>Proteus mirabilis</i>	01
<i>Providencia</i>	01
<i>Proteus vulgaris</i>	01
<i>Citrobacter freundii</i>	01
<i>Enterobacter cloacae</i>	01

Les souches ont été conservées à -70°C . avant leur utilisation, elles ont été réisolées.

2) Antibiotiques utilisés

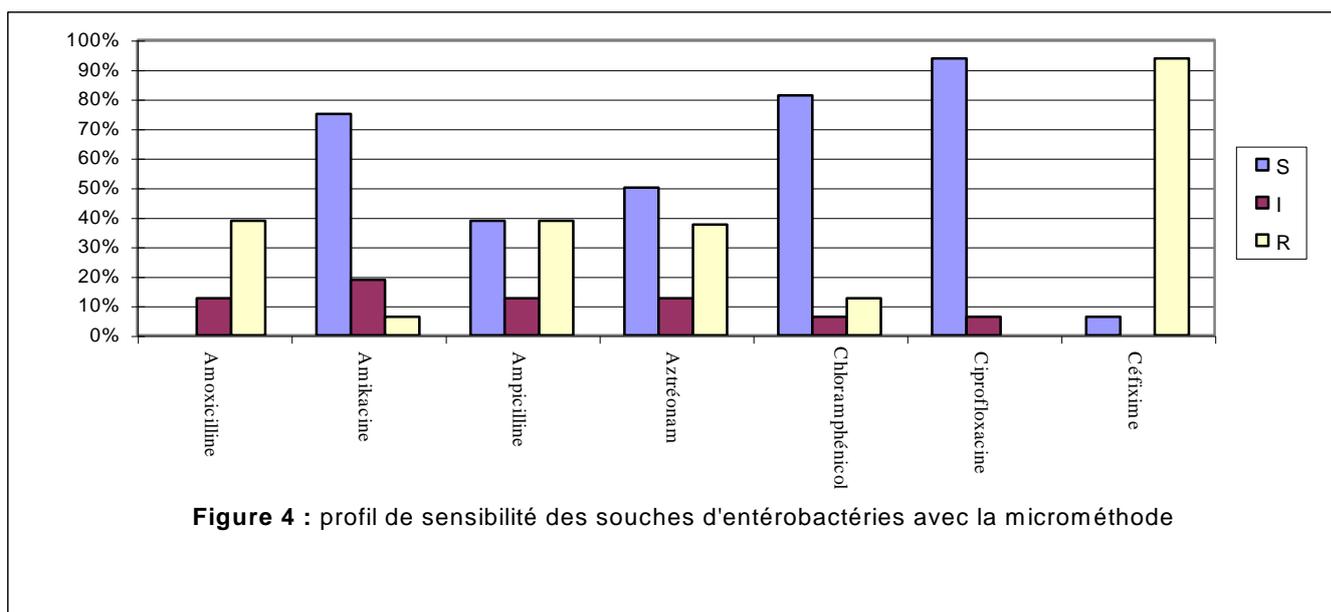
Pour cette étude de sensibilité 7 antibiotiques ont été utilisés :

- Aminopénicillines : amoxicilline, ampicilline
- Quinolones : ciprofloxacine
- Monobactames : aztréonam
- Céphalosporines de 2^{ème} génération : céfixime
- Phénicolés : chloramphénicol
- Aminosides : amikacine

3) Profil de sensibilité global des souches d'Entérobactéries étudiées

Tableau VI : Profil de sensibilité global des souches d'Entérobactéries étudiées

	Entérobactéries					
	S	%	I	%	R	%
Amoxicilline	7	38,80%	2	12,50%	7	38,80%
Amikacine	12	75%	3	18,75%	1	6,25%
Ampicilline	7	38,80%	2	12,50%	7	38,80%
Aztréonam	8	50%	2	12,50%	6	37,50%
Chloramphénicol	13	81,25%	1	6,25%	2	12,50%
Ciprofloxacine	15	93,75%	1	6,25%	0	0%
Céfixime	1	6,25%	0	0%	15	93,75%



Les aminopénicillines telles que l'amoxicilline et l'ampicilline ont montré une sensibilité faible de 38,80% et une résistance de 38,80%.

12,50% de nos souches se sont révélées intermédiaires.

Quant à l'amikacine, le chloramphénicol et la ciprofloxacine leur activité a été bonne avec respectivement 75% ; 81,25% et 93,75% de sensibilité.

La ciprofloxacine n'a montré aucune résistance mais 6,25% des souches se sont révélées intermédiaires.

Quant à la céfixime, elle s'est montrée résistante presque à toutes les souches avec 93,75% comme pourcentage de résistance .

Seuls 6,25% des souches ont été sensibles à la céfixime.

4) Phénotypes de résistance et profil de sensibilité des bacilles à Gram négatif

4-1 Escherichia coli

Les souches ont montré une bonne sensibilité avec l'amikacine, le chloramphénicol et le ciprofloxacine.

Par contre une résistance a été notée avec l'amoxicilline, l'ampicilline, l'aztréonam et le céfixime.

	S	I	R
Amoxicilline	1	1	4
Amikacine	5	0	1
Ampicilline	2	0	4
Aztréonam	2	0	4
Chloramphénicol	5	0	1
Ciprofloxacine	6	0	0
Céfixime	1	0	5

Parmi les 6 souches étudiées 4 sont résistantes à la fois à l'amoxicilline, à l'ampicilline et au céfixime. Nous avons donc une résistance aux aminopénicillines décrivant ainsi le phénotype « pénicillinase haut niveau ou PHN ».

Deux de nos souches sont des souches sauvage.

Tableau VII : Profil de résistance des phénotypes des souches de *E. coli* testées

Antibiotiques Nombre de souches	Amox	Ampi	Amk	Azt	Chloram	Cipro	Céfix
	4						
1							
1							

4-2 *Proteus*

Les souches de *proteus* ne sont pas des phénotypes sauvages car secrétant une pénicillinase et une céphalosporinase.

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Amoxicilline	R	R
Amikacine	I	I
Ampicilline	R	I
Aztréonam	S	S
Chloramphénicol	R	S
Ciprofloxacine	S	S
Céfixime	R	R

4-3 *Salmonella tufhi I*

Cette souche est de phénotype sauvage.

Amoxicilline	S
Amikacine	S
Ampicilline	R
Aztréonam	R
Chloramphénicol	S
Ciprofloxacine	S
Céfixime	R

4-4 *Klebsiella pneumoniae*

Toutes les souches sont résistantes aux aminopénicillines. Il s'agit d'ailleurs d'une résistance naturelle. Nous avons affaire à des souches sauvages.

La ciprofloxacine a agi très efficacement sur les *klebsielles* en inhibant toutes les souches.

Une résistance a été notée avec la céfixime sur toutes les souches.

	S	I	R
Amoxicilline	0	1	3
Amikacine	4	0	0
Ampicilline	0	0	4
Aztréonam	2	1	1
Chloramphénicol	0	0	0
Ciprofloxacine	4	0	0
Céfixime	0	0	4

Tableau VIII : Phénotype de résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées

Antibiotiques Nombre de souches	Amox	Ampi	Amk	Azt	Chloram	Cipro	Céfix
3							
1							

4-5 *Enterobacter cloacae*

La souche est sécrétrice d'une bêta-lactamine à spectre élargi

Amoxicilline	R
Amikacine	S
Ampicilline	R
Aztréonam	S
Chloramphénicol	S
Ciprofloxacine	S
Céfixime	R

4-6 *Citrobacter freundii*

La souche est sauvage donc non productrice de bêta-lactamases

Amoxicilline	S
Amikacine	S
Ampicilline	S
Aztréonam	I
Chloramphénicol	I
Ciprofloxacine	S
Céfixime	R

4-7 *Providencia*

Amoxicilline	S
Amikacine	R
Ampicilline	I
Aztréonam	S
Chloramphénicol	S
Ciprofloxacine	I
Céfixime	R

III/ RESULTATS DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES ETUDIEES PAR LA METHODE E-TEST

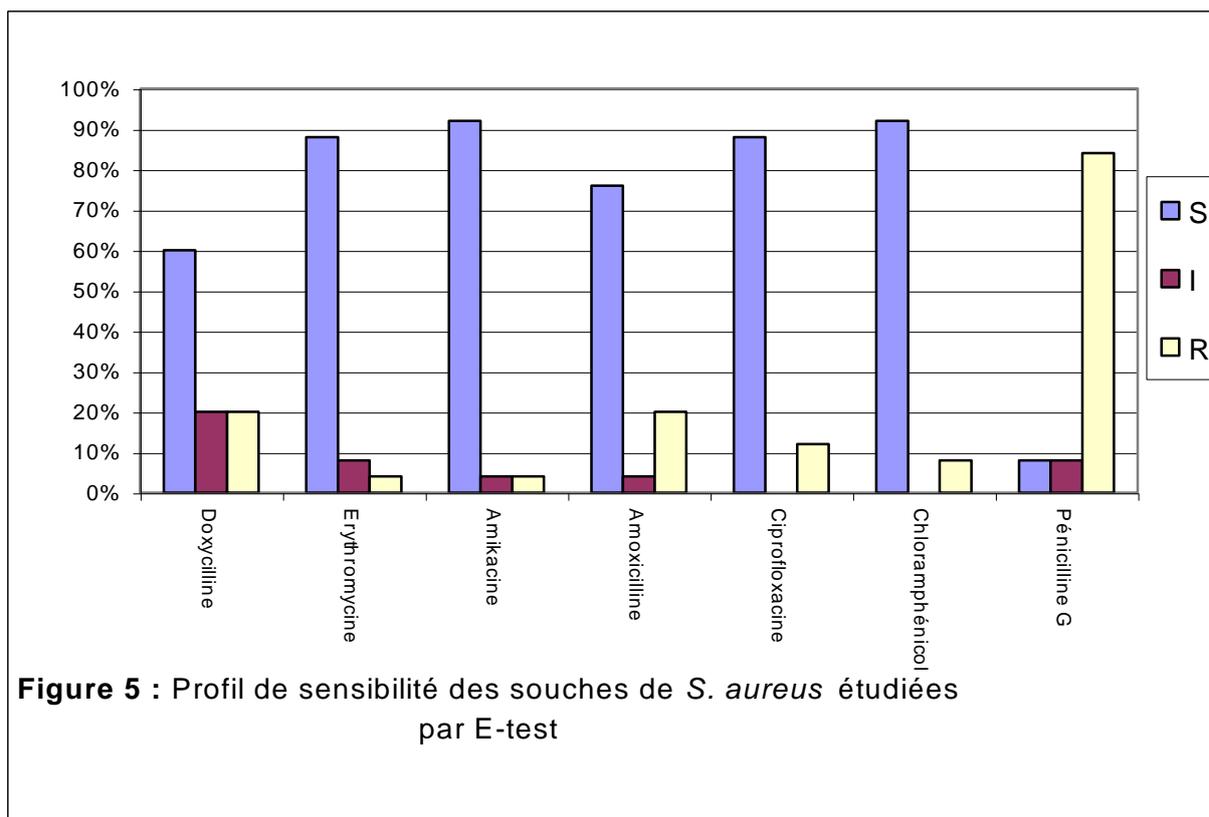
Les souches de *S. aureus* et d'entérobactéries sur lesquelles nous avons travaillé sont des souches dont le profil de sensibilité avait déjà été étudié par E-test.

Dès lors une étude comparée s'impose et ceci afin de s'assurer d'une éventuelle concordance ou discordance.

III-1 PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PAR E-TEST

Tableau VIII : Profil de sensibilité des *S. aureus* étudiées par E-test

Antibiotiques	S	%	I	%	R	%	CMI(µg/ml)
Doxycycline	15	60%	05	20%	05	20%	16 – 32
Erythromycine	22	88%	02	8%	01	4%	0,5 – 1
Amikacine	23	92%	01	4%	01	4%	4 – 32
Amoxicilline	19	76%	01	4%	05	20%	4 – 32
Ciprofloxacine	22	88%	00	0%	03	12%	1 – 2
Chloramphénicol	23	92%	00	0%	02	8%	8 – 16
Pénicilline G	02	8%	02	8%	21	8%	0,25 – 16



L'interprétation de la méthode E-test se fait en fonction des valeurs des CMI des différents antibiotiques.

Une concordance de résultats est obtenue avec les antibiotiques tels que la doxycycline, l'érythromycine, l'amikacine, la ciprofloxacine et le chloramphénicol.

Cependant, des discordances ont été notées avec l'amoxicilline car : cinq de nos souches sont résistantes à l'amoxicilline avec la méthode du E-test et une souche seulement a présenté une résistance intermédiaire alors qu'avec la microméthode nous avons 5 souches qui se sont montrées résistantes et 2 souches intermédiaires, cela veut tout simplement dire qu'une souche qui s'est révélée intermédiaire avec la microméthode, s'est montrée résistante avec le E-test.

La même situation s'est présentée avec la pénicilline G où une souche résistante avec la microméthode s'est révélée intermédiaire avec la méthode du

E-test ; ceci est peut-être dû à la présence d'ions dans le milieu utilisé et aux conditions de conservation des solutions mères d'antibiotique.

III-2 PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES D'ENTEROBACTERIES ETUDIEES PAR E-TEST

Concernant les entérobactéries, nous avons eu le profil de sensibilité par E-test d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*.

Pour *Escherichia coli*, nous avons obtenu avec le E-test, les profils suivants :

Escherichia coli

Antibiotiques	S	I	R
Amoxicilline	1	1	4
Amikacine	4	1	1
Ampicilline	2	0	4
Aztréonam	2	0	4
Chloramphénicol	4	1	1
Ciprofloxacine	6	0	0
Céfixime	1	0	5

Pour les antibiotiques comme l'amoxicilline, l'ampicilline, l'aztréonam la ciprofloxacine et la céfixime le profil de sensibilité des souches est le même avec les deux méthodes (microméthode et E-test).

En ce qui concerne l'amikacine, nous avons eu 4 souches sensibles, une souche intermédiaire et une souche résistante.

Nous avons noté une souche qui s'est révélée intermédiaire par le E-test et sensible avec la microméthode.

Le chloramphénicol a donné 4 souches sensibles et une souche intermédiaire. Alors qu'avec la microméthode nous avons eu 5 souches sensibles.

Ceci s'expliquerait par le fait que nous avons une souche qui s'est montrée sensible avec la microméthode s'est révélée intermédiaire avec la méthode du E-test. Mais les discordances observées au niveau des résultats ne sont pas d'une grande importance et peuvent être qualifiées de discordances mineures.

Klebsiella pneumoniae

Quantité	S	I	R
Amoxicilline	3	1	0
Amikacine	4	0	0
Ampicilline	4	0	0
Aztréonam	2	1	1
Chloramphénicol	4	0	0
Ciprofloxacine	4	0	0
Céfixime	0	0	4

Pour le profil de sensibilité de *Klebsiella pneumoniae*, les résultats ont été concordants à 100% avec les deux méthodes d'étude ; aucune discordance n'a été notée et cela avec des CMI très basses.

DISCUSSION

I/ ETUDE COMPARATIVE DE METHODES DETUDE DE LA SENSIBILITE

L'étude comparative conduit à différents types de remarques aussi bien au plan technique qu'au plan des résultats.

I-1 AU PLAN TECHNIQUE

La réalisation de l'antibiogramme par la microméthode est plus longue que celle du E-test.

En effet, la préparation extemporanée des concentrations critiques est une étape longue et fastidieuse.

Cependant la préparation extemporanée des solutions d'antibiotiques permet d'une part : de choisir minutieusement les antibiotiques à tester et d'autre part, d'assurer une plus grande des antibiotiques utilisés donc une plus grande efficacité.

Au niveau de l'interprétation des résultats, la microméthode permet d'emblée une catégorisation clinique.

I-2 AU PLAN DES RESULTATS

Les souches de référence de *Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ont été testées à la fois par la microméthode et la méthode de E-test.

Staphylococcus aureus ATCC 29213 et *Escherichia coli* ATCC 25922 se sont révélées sensibles à tous les antibiotiques étudiés.

Escherichia coli ATCC 25922

Amoxicilline	S
Amikacine	S
Ampicilline	S
Aztréonam	S
Chloramphénicol	S
Ciprofloxacine	S
Céfixime	S

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Doxycycline	S
Erythromycine	S
Amikacine	S
Amoxicilline	S
Ciprofloxacine	S
Chloramphénicol	S
Pénicilline G	S

Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Escherichia coli* ATCC 25922 leur profil de sensibilité est semblable à celui de la microméthode (sensibles à tous les antibiotiques sélectionnés).

Les résultats de sensibilité obtenus avec les souches de référence par la microméthode et le E-test sont similaires. Leur profil de sensibilité est le même.

I-3 LES SOUCHES ETUDIÉES

En ce qui concerne *Staphylococcus aureus*, aucune discordance n'a été notée. Ceci a permis d'ailleurs d'évaluer notre microméthode grâce au E-test qui est considéré comme la méthode de référence.

Cette comparaison des deux méthodes a été effectuée plusieurs fois afin de s'assurer de la validité de notre microméthode d'étude *in vitro* de la sensibilité des antibiotiques en microplaques.

Une concordance de résultats est obtenue avec les antibiotiques tels que la doxycycline, l'érythromycine, l'amikacine, la ciprofloxacine et le chloramphénicol.

Cependant, des discordances ont été notées avec l'amoxicilline car : cinq de nos souches sont résistantes à l'amoxicilline avec la méthode du E-test et une souche seulement a présenté une résistance intermédiaire alors qu'avec la microméthode nous avons 5 souches qui se sont montrées résistantes et 2 souches intermédiaires, cela veut tout simplement dire qu'une souche qui s'est révélée intermédiaire avec la microméthode, s'est montrée résistante avec le E-test.

La même situation s'est présentée avec la pénicilline G où une souche résistante avec la microméthode s'est révélée intermédiaire avec la méthode du E-test ; ceci est peut-être dû à la présence d'ions dans le milieu utilisé et aux conditions de conservation des solutions mères d'antibiotique.

Pour les entérobactéries, les antibiotiques comme l'amoxicilline, l'ampicilline, l'aztréonam, la ciprofloxacine et la céfixime le profil de sensibilité des souches est le même avec les deux méthodes (microméthode et E-test).

En ce qui concerne l'amikacine, nous avons eu 4 souches sensibles, une souche intermédiaire et une souche résistante.

Nous avons noté une souche qui s'est révélée intermédiaire par le E-test et sensible avec la microméthode.

Le chloramphénicol a donné 4 souches sensibles et une souche intermédiaire. Alors qu'avec la microméthode nous avons eu 5 souches sensibles.

Ceci s'expliquerait par le fait que nous avons une souche qui s'est montrée sensible avec la microméthode s'est révélée intermédiaire avec la méthode du E-test. Mais les discordances observées au niveau des résultats ne sont pas d'une grande importance et peuvent être qualifiées de discordances mineures.

II/ DISCUSSION PROPREMENT DITE

II-1 LES MYCOPLASMES UROGENITAUX

Comme beaucoup d'autres études (**1 ; 22**), *Ureaplasma urealyticum* dont la fréquence avait augmenté ces dernières années était largement prédominant dans la nôtre : 64% de *Ureaplasma urealyticum* contre 36% de *Mycoplasma hominis*.

Les cyclines étaient très utilisés au départ, mais au fil des années, nous avons observé des résistances.

Nos travaux ont donné 6,25 % de résistance à la tétracycline pour *Ureaplasma urealyticum*.

Nos travaux sont comparables avec ceux obtenus dans une étude faite à Madrid où les souches de mycoplasmes ont montré une résistance de 6,6 % à la tétracycline (**18**).

Avec la doxycycline, nous avons remarqué 6,25 % de résistance intermédiaire.

Cependant, *Mycoplasma hominis* présentait respectivement une résistance de 11,10 % et de 11 % à la tétracycline et à la doxycycline.

Les cyclines ont une meilleure activité sur *Ureaplasma urealyticum* et la doxycycline est plus efficace que la tétracycline le groupe d'antibiotiques étant l'un des plus efficaces sur presque toutes les espèces de mycoplasmes, l'augmentation de la résistance des mycoplasmes aux cyclines pose un sérieux problème.

Les quinolones ont en général une bonne activité sur *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*.

La ciprofloxacinine a une meilleure activité sur *Ureaplasma urealyticum* (93,75%) de sensibilité.

L'ofloxacinine est la quinolone qui présente une meilleure activité sur *Mycoplasma hominis*. Cette absence de résistance retrouvée dans notre étude pourrait être due à l'utilisation rare de cette molécule à cause de son coût relativement élevé.

Pour l'érythromycine *Mycoplasma hominis* est quasiment insensible à cet antibiotique avec 11,10 % de souches intermédiaires et 88,90% de résistance. L'inefficacité de ce produit sur les souches de *Mycoplasma hominis* doit être prise en compte car elle est également aussi élevée dans d'autres.

C'est le cas avec les travaux BEBEAR C. et coll. qui ont trouvé 72% de résistance (4).

La clarithromycine est faiblement active sur les souches de *Mycoplasma hominis* avec 22,20 % de sensibilité et 77,8 % de résistance.

Cette clarithromycine a une bonne activité sur les souches de *Ureaplasma urealyticum* avec 100% de sensibilité.

Pour les phénotypes de résistance des mycoplasmes : dans le cas de *Mycoplasma hominis*, on a une prédominance de phénotype E par rapport aux autres familles d'antibiotiques.

Par contre, dans le cas de *Ureaplasma urealyticum* on a une prédominance de Phénotype L.

Les différences d'activité entre familles d'antibiotiques s'expliqueraient par le fait que les facteurs de résistance soient différents d'un antibiotique à un autre.

II-2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La pénicilline G n'est active que sur 8% de nos souches ; ce qui est très faible. Par contre 88% de nos souches sont résistantes à la pénicilline G.

Ces résultats sont superposables à ceux de Wade A. (45) d'après une étude réalisée à l'Hôpital Fann avec 6,25 % ; de Sy K. R. (39) et de Ndir I. (30) à l'Hôpital Le Dantec avec respectivement 8,8 % et 7 %.

Par contre Fall M. I. (16) trouvait 22 % de souches sensibles dans une étude réalisée à l'Hôpital Fann en 1992.

Une diminution très significative de la sensibilité des souches de *S. aureus* est constatée.

En Mexique, en 1999 PANIAGUA et Coll. (34) ont trouvé dans leur étude 100 % de résistance à la pénicilline G.

Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par plusieurs publications qui rapportent que le taux de résistance de *S. aureus* à la pénicilline G est de 90 % à travers le monde (88 % dans notre étude).

La pénicilline G est aujourd'hui plus que jamais un mauvais choix thérapeutique lors d'infection à *S. aureus*.

Quant à l'érythromycine on a une bonne activité avec 92 % des souches sensibles.

En 1997, Ndir I. (30) trouvait 78 % dans le même service (HALD)

En 1999, au Mexique PANIAGUA et Coll. (34) ont publié 68,6 %.

En 2002, l'institut Pasteur de Dakar publiait 80,9% de sensibilité.

La ciprofloxacine est un très bon choix thérapeutique dans la famille des quinolones. Ceci est d'ailleurs confirmé par des études faites en Malaisie par NORAJAH A. et Coll. en 2003 qui ont donné 2,5 % de résistance (32).

Quant à l'amikacine, nous avons eu une bonne activité avec 92% de sensibilité de 4 % de résistance.

Nos résultats sont similaires à ceux de NORAJAH A. et Coll. , réalisés en Malaisie qui ont trouvé une résistance de 3,8 %. Ceci montre que l'amikacine est un bon choix en thérapeutique.

Cependant des études réalisées au Liban par MONZER H. et Coll., ont donné 34 % de résistance (27).

Des études faites aux Pays-bas par NEELING A. J. et Coll. nous ont fourni pour le chloramphénicol 11% de résistance tandis HAMZE M et Coll. au Liban ont trouvé 10% de résistance (31 ; 17).

Les résultats sont comparables à ceux de notre étude qui présente une résistance de 8 %.

L'amoxicilline quant à elle offre une bonne activité avec une sensibilité de 76 %.

La doxycycline conserve toujours une bonne activité avec 60% de sensibilité. Mais l'émergence de souches résistantes ont été observée avec un pourcentage de 20 %.

II-3 LES ENTEROBACTERIES

Les espèces testées dans notre étude sont : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia*..

Les aminopénicillines, l'ampicilline comme l'amoxicilline ont montré des résistances avec respectivement 6,25 % et 38,80 % .

Nos résultats sont élevés par rapport à ceux obtenus en 2003 à Tripoli par MONZER HAMZE qui a trouvé 15 % de résistance avec les aminopénicillines (27).

Ceci fait d'ailleurs penser à l'émergence de souches de plus en plus résistantes.

Cette résistance pourrait être due à l'utilisation abusive de ces antibiotiques par les malades à cause de son coût abordable (disponible en générique). Cette résistance pourrait également être due à la production de pénicillinase par les entérobactéries.

Ce qui fait qu'en thérapeutique, on utilise de plus en plus l'association amoxicilline / acide clavulanique ; ampicilline / sulbactam ceci afin d'éviter l'inactivation de ces antibiotiques par la pénicillinase. Le plus souvent, l'acide clavulanique ne suffit pas à restaurer la sensibilité à l'amoxicilline chez les entérobactéries productrices de pénicillinases.

Le chloramphénicol quant à lui est actif sur toutes les espèces d'entérobactéries avec 81,15 % de sensibilité.

Quant à l'amikacine, l'aztréonam et la ciprofloxacine, nous avons noté une bonne activité avec respectivement les sensibilités suivantes : 75 %, 50 % et 93,75 %.

La ciprofloxacine s'est montrée très efficace avec 0% de résistance.

En 2000, une étude similaire réalisée au Bégin par GARRAB et Coll. a donné les pourcentages de sensibilité suivante : 92 % pour l'amikacine 83 % pour l'aztréonam et 78 % pour la ciprofloxacine.

De même en 1996, KOECK J. et Coll. ont trouvé 98% de sensibilité pour l'aztréonam, 100 % pour l'amikacine et 96,30 % pour la ciprofloxacine (20).

En 2003, les travaux de HAMZE MONZER au Liban ont donné une sensibilité de 77,90 % pour l'aztréonam, 71 % pour la ciprofloxacine et 89 % pour l'amikacine (27).

Pour ces trois antibiotiques bien qu'appartenant à des familles différentes ont comme dénominateur commun leur efficacité sur toutes les espèces d'entérobactéries.

Mais le terme d'efficacité devrait être nuancé car on assiste progressivement à l'apparition de souches résistantes.

La céfixime quant à elle, céphalosporine de 2^{ème} génération n'a pas été active sur les entérobactéries. Une résistance de 93 % a été observée.

Une telle résistance peut être due à sécrétion de céphalosporinase.

CONCLUSION

Nous avons entrepris ce travail sur les mycoplasmes urogénitaux, les *Staphylococcus aureus* et entérobactéries dans le but d'étudier l'activité des différents antibiotiques généralement utilisés en thérapeutique.

Il s'agit d'une microméthode d'étude de la sensibilité des germes en microplaques. Cette microméthode est une technique à cheval entre la méthode de diffusion et les méthodes automatisées et / ou semi-automatisées, dont les coûts très élevés ne sont pas à la mesure des moyens matériels et financiers dont disposent nos structures.

La microplaque est constituée de cupules qui contiennent des antibiotiques déshydratés. Chaque antibiotique a deux cupules : une pour la CCI et une pour la CCS.

Cette méthode consiste à ajouter dans les cupules contenant les antibiotiques déshydratés, l'inoculum bactérien standardisé (contenant $5.10^5 - 10^6$ germes/ml).

Après une incubation de 18 à 24 heures, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur coloré le rouge de phénol. Le virage du milieu montre qu'il y a croissance bactérienne en présence d'antibiotique et l'absence de virage démontre le contraire.

Les résultats obtenus sont de 3 catégories :

Sensible : si l'inhibition de croissance s'est faite aux 2 concentrations critiques.

Résistante : s'il y a croissance bactérienne aux 2 concentrations critiques de l'antibiotique.

Intermédiaire : s'il y a croissance au niveau de la concentration critique inférieure et une inhibition de cette croissance avec la concentration critique supérieure.

Nous avons testé le comportement de 25 souches de mycoplasmes urogénitaux, de 25 souches de *Staphylococcus aureus* et de 16 souches d'entérobactéries vis à vis des antibiotiques comme :

- Les Bêta-lactamines
- Quinolones
- Macrolides
- Cyclines
- Monobactam
 - Pénicillines
 - Céphalosporines de 2^{ème} génération

Cette microméthode a montré au cours de nos travaux une grande capacité à donner des résultats fiables et à coût moindre.

Pour les milieux d'étude, il doit y avoir une composition rigoureusement définie permettant une production de résultats fiables.

Dans le cas des mycoplasmes urogénitaux, le bouillon urée et le bouillon arginine sont recommandés dans le cadre d'étude de la sensibilité en milieu liquide (avec pH 6,1 – 6,3).

Dans le cas des entérobactéries et des *Staphylococcus aureus*, notre choix pour le bouillon MH supplémenté en ions (Ca^{2+} ; Mg^{2+}) inspire les recommandations faites par les auteurs DOSSO M. et Coll. pour l'étude de la sensibilité en milieu liquide (16).

Le glucose constituant essentiel de notre milieu est un sucre utilisé par la plupart des bactéries. Son utilisation par les microorganismes conduit à la production d'acide.

Cette production d'acide a été mise en évidence par un indicateur coloré le rouge de phénol.

Le milieu a en outre une grande stabilité lors de la conservation. Ainsi, les différents constituants de notre milieu ne modifie en rien le pH final. Ainsi la stérilisation à l'autoclave ne dénature pas les différents constituants sauf les ions divalents (Ca^{2+} ; Mg^{2+}) qui sont ajoutés au milieu, par filtration stérilisante après autoclavage.

La sélection des antibiotiques est difficile. Les antibiotiques utilisés en recherche fondamentale coûtent excessivement chers et ceux choisis doivent dans tous les cas être stables et actifs au cours des tests.

La conservation des antibiotiques a été faite selon les directions du fabricant. Une fois mise en solution, les conditions de conservation changent.

L'ampicilline et l'amoxicilline ont été les moins stables (6 semaines). Par contre, les autres antibiotiques ont une stabilité de 6 mois à -20°C .

Les solutions de travail (STCCI et STCCS) ont été préparées avec les solvants et les diluants appropriés.

La microméthode a fourni d'excellents résultats car en faisant une étude comparée avec le E-test qui est une méthode de référence, nous avons obtenu une concordance presque totale.

Cependant, des discordances mineures ont été observées comme par exemple une souche qui se montre résistante avec la méthode du E-test et intermédiaire avec notre microméthode.

Outre ces résultats satisfaisants, la microméthode présente plusieurs avantages.

- ✓ Coût peu élevé : la miniaturisation permet en effet d'utiliser de petites quantités de produits et réactifs
- ✓ Diminution des risques de souillures
- ✓ Lecture facile
- ✓ Interprétation directe des résultats

La microméthode présente aussi certaines limites :

- Elle est destinée aux bactéries fermentaires
- La préparation des solutions de travail est très difficile et nécessite beaucoup de calculs.
- Le temps mis pour la réalisation de ces tests est long.

L'amélioration de cette méthode d'étude de la sensibilité se fera certainement par une déshydratation des antibiotiques, ce qui permettra de réduire le temps de réalisation de ce test de sensibilité.

BIBLIOGRAPHIE

1- BALLE B.

Micro méthode d'étude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux.

Thèse pharm.. Dakar, 1999 N° 48

2- BEBEAR C., BARBEYRAC B., DEWILDE A., EDERT D., JANVRESSE C., MENDEL I., RENAUDIN., LE FAOU A., LEFEVRE J. C.

Etude multicentrique de la sensibilité *in vitro* des mycoplasmes génitaux aux antibiotiques.

Revue Pathologie et biologie PARIS 1993,vol. 41, N°4 pp289-293

3- BEBEAR C. M., CHARRON A., RENAUDIN H. T., BOVE J. M.

Altérations in topo isomerase IV And DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained *in vitro*

In : Antimicrobial Agents and chemotherapy 1998 Sept., 42 (9) ; 2304 -11.

4- BEBEAR C.

Les infections à mycoplasmes en gynécologie obstétrique.

Microsoft Internet Explorer, 1-6

5- BONISSOL C.H.

Biologie des mycoplasmes

Bull. , Mem., Soc. Med., Paris .Tome III-N°6

6- BOTTA G. A., RAPHENON G., BOTTA C., COURDET C.

Sexually transmitted diseases in senegalese woman

Clinical microbiology and Infection, May 1997,3, 2, 277.

7- DENIS .F

Mycoplasmes

CES de bactériologie-virologie clinique Dakar, 1998

8- DIA B.

Résistance des staphylocoques et des streptocoques aux antibiotiques

Thèse Pharm., Dakar, 1993, n°61

9- DIENG SARR A.

Les mycoplasmes

CES bactériologie –virologie 1996

10- DIOH H. D.

Standardisation et évolution de micro méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de différentes espèces de mycoplasmes

Thèse Pharm. : Dakar, 1998, n°54

11- DIOP M. Diakité

Etude de la sensibilité par E-test des souches de bacilles Gram négatif isolées au CHU de Dantec.

Thèse Pharm., 1998 n°69

12- DOSSO M.

Etude de la sensibilité in vitro aux ATB de différents isolats bactériens à Abidjan : résultats à propos de 94 souches.

Médecine digest., 1995, Suppl. 4, 32-38

13- DRAME B.

Micro méthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries, intérêts thérapeutiques et diagnostiques.

Thèse Pharm :2001, N°86

14- DRAME B. Guèye

Phénotypes de résistance des souches bactériennes isolées au CHU Aristide Le Dantec.

Thèse Pharm. Dakar, 1999, N°05

15- EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing)

Determination of Antimicrobial susceptibility test breakpoints August 2000.

16- FALL M. I.

Comportement vis à vis des antibiotiques de 94 souches de *S. aureus* isolées en situation pathogène au CHU de FANN, Dakar

Thèse Pharm. : Dakar, 1992, n°83

17- HAMZE M., DABBOUSSI F., DAHER W., IZARD D.

Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with Lebanon place of the methicillin resistance and comparison of detection method.

Internet explorer 2000

**18- HERRORO A. ; CUEVAS C. ; UMIA A. ; DELGADO T. ;
LOPEZ B. M.**

Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* from clinical specimens.
Clinical microbiology and infection May 1997 ; 2, 3, 277

19- KANE T. K.

Mise au point d'une microméthode d'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Thèse Pharm. : Dakar, 1996, n°69

**20- KOECK J. L. ; CAVALLO J. D. ; FABRE R. ; MEYRAN M. ;
ROUE R.**

Sensibilité aux antibiotiques des bacilles Gram négatif aérobies isolés d'infections sévères en 1992 : Résultats d'une étude multicentrique française.

Revue Presse médicale 1996, Vol. 25, n°30, pp1363-1366

21- KONATE B.

Micro méthode d'identification et d'étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques et streptocoques.

Thèse pharm. Dakar, 2001, N°100

22- KONATE D.

Standardisation, optimisation et évaluation d'une micro méthode d'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux.

Thèse Pharm. : Dakar, 2001, n°84

23- KRAUSS et Coll.

Mycoplasma / Ureaplasma : Increase in resistance to macrolides, tetracyclines and quinolones from 1983 to 1998.

24- MARMONIER A. A.

Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques

Dans Carbonelle B. et Coll. Bactériologie médicale Techniques usuelles
Paris, SIMEP, 1987, 227 – 237

25- MARRA M. A.

Détermination par E-test de la sensibilité des souches dakaroises de
Staphylocoques aureus

Thèse Pharm. : 1998, n°46

26- MINAR L. ; VERON N.

Bactériologie médicale 2^e Edition

Flammarion, Médecine Science, Paris 1989, 333-318, 773-823.

27- MONZER H., FOUAD D., DANIEL I.

Sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques : étude sur 4 ans (1998-2001)
dans le nord liban.

28- MUSSO D.

Sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques et traitement des
staphylococcies.

Medit. Med. , 1993, 9 :22-24

29- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

Performance standards for antimicrobial susceptibility.

Testing : Eight Informational Supplement. NCCLS document M : 100 S8; 1998 :
n°1

30- NDIR I.

Mise au point d'une micro méthode d'identification des entérobactéries.

Thèse Pharm. : 1996, n°5

31- NEELING A.J, LEAVEN WJ, SCHOOLS L.M et Coll.

Resistance of *Saphylococcus aureus*

In the netherlands surveillance by an electronic net work during 1989-1995.

32- NOZARAH A., LIM V. K., MANIRA S. N., KAMELA G.

Staphylococcus aureus carriage

In select communitie and their antibiotics susceptibilty patterns Juin 2003, 58,
(2) : 255-61 Malaisie

33- ODUGBEMIT ; AMIMASHAUMT ; KESAH K. . ODUYEBOY

Etude de la sensibilité antimicrobienne *in vitro* d'isolats bactériens cliniques à Lagos Nigeria.

Med. Digest., 1995, Suppl 4, 39-54

34- PANIAGUA G. L., MONROY E., GARCIA O., VACA S.

Effect of beta-lactamase inhibitors on minimum concentration of ampicillin amoxicillin for *staphylococcus aureus* strains.

Revue Latinoam Microbiology, 1998 Juillet - Décembre ; (3-4) 128-34

35- RAPHENON G.

Mécanisme de résistance des bactéries aux antibiotiques

Forum Médical 1996, 9 :6-11

36- SENJI P. ; ZELE S. ; KALENIC S.

Susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics.

Clinic. Microbiology and infection, May 1997, 3, 2, 277.

37- SHEPARD M. C.

Culture media for *Ureaplasma*

In : Razin S.; Tully J. G.

Methods in mycoplasmaology, vol. 1 Mycoplasma characterization Academic

Press New york, 1986, 305, 137 – 146

38- SIROT J.

Evaluation de l'activité antibactérienne des ATB in vitro

In : *LEMINOR et VERON Bactériologie médicale :Sciences Flammarion 2^e édition 1989.*

39- SY K. R.

Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques.

Données actuelles au CHU A. Le Dantec de Dakar.

Thèse Pharm. : 1996, n°55

40- TAYLOR D., ROBINSON

Infection due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* : an update

Clinical infection diseases ,1996,28,671-684

41- TODAR K.

Bacteriology 330 Lecture Tropics Antimicrobial agents 1996

42- TODAR K.

Bacteriology 330 Lecture Tropics Bacterial resistance to antibiotics 1996.

43- TRAORE R.

Etat actuel de l'activité in vitro des principaux antibiotiques sur les bacilles à Gram négatif isolées en pratique hospitalière au CHU de Dakar

Thèse Pharm. ,Dakar,1989,n°29

44- TROUVENOT D., BOSSHARD S.

Les mycoplasmes

Manuel de bactériologie clinique 1992,2,11205-1218

45- WADE A.

Sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* au CHU de FANN (1994-1996)

Thèse Pharm., Dakar 1996, n°81

46- WADJI S. D.

Etude comparative des différentes méthodes de détection des bêta-lactamases sur des souches bactériennes isolées à Dakar.

Thèse Pharm. , Dakar 1993 n°84

RESUME

Les bactéries sont des êtres vivants doués des propriétés diverses parmi lesquelles, la capacité d'élaborer des stratégies à même de s'opposer à l'action des antibactériens.

Pour cela, l'utilisation rationnelle des antibiotiques en clinique humaine devrait nécessairement passer par l'étude *in vitro* de la sensibilité des bactéries pathogènes aux différentes molécules d'antibiotiques. Ceci permettra aux cliniciens d'avoir le choix d'une antibiothérapie de première intention adaptée aux données épidémiologiques locales.

Les différentes techniques utilisées en routine pour l'étude de la sensibilité doivent répondre à plusieurs critères :

- Rapidité d'exécution
- Facilité de réalisation
- Délai de réponse court
- Fiabilité
- Reproductibilité
- Coût peu élevé

Micro CSB a été évalué pour atteindre un certain niveau indispensable à une lutte efficace contre la résistance.

La microplaque est constituée de cupules qui contiennent des antibiotiques déshydratés. Chaque antibiotique a deux cupules : une pour la CCI et une pour la CCS.

Cette méthode consiste à ajouter dans les cupules contenant les antibiotiques déshydratés, l'inoculum bactérien standardisé (contenant $5 \cdot 10^5$ – 10^6 germes/ml).

Après une incubation de 18 à 24 heures, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur coloré le rouge de phénol

Le virage du milieu montre qu'il y a croissance bactérienne en présence d'antibiotique et l'absence de virage démontre le contraire.

Les résultats obtenus sont de 3 catégories :

Sensible : si l'inhibition de croissance s'est faite aux 2 concentrations critiques.

Résistante : s'il y a croissance bactérienne aux 2 concentrations critiques de l'antibiotique.

Intermédiaire : s'il y a croissance au niveau de la concentration critique inférieure et une inhibition de cette croissance avec la concentration critique supérieure.