

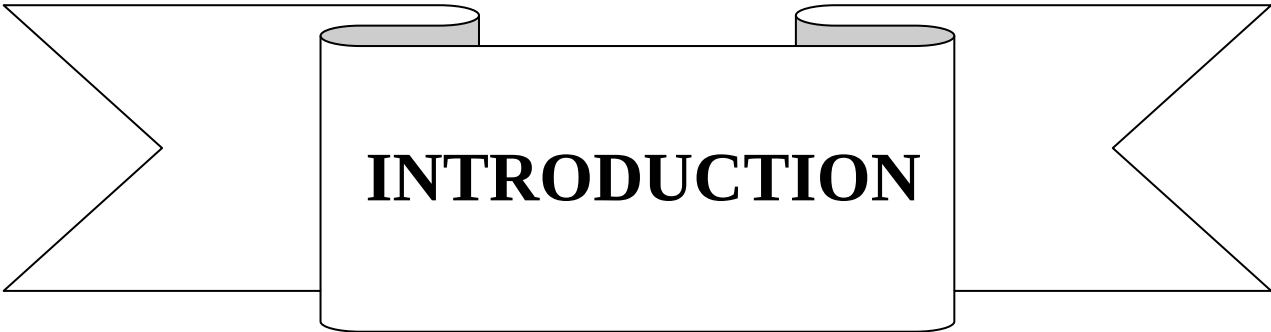
SOMMAIRE

INTRODUCTION	5
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I / Généralités sur le pneumocoque	8
I-1 Historique	8
I-2 Taxonomie	8
I-3 Caractères bactériologiques	9
I-3-1 Habitat	9
I-3-2 Morphologie	9
I-3-3 Structure	9
I-3-3-1 Paroi	9
I-3-3-2 Capsule	10
I-3-3-3 Membrane cytoplasmique	10
I-3-4 Culture	10
I-3-4-1 Milieux de culture	10
I-3-4-2 Conditions de culture	10
I-3-4-3 Examen macroscopique	10
I-3-5 Biochimie	11
I-3-6 Identification	13
I-3-6-1 Sensibilité à l'optochine	13
I-3-6-2 Lyse par la bile	13
I-3-6-3 Mise en évidence de la capsule	14
I-4 Pouvoir pathogène	16
I-5 Diagnostic	16
II : Généralités sur les pénicillines	19
II-1 Historique	19
II-2 Définition	19
II-3 Structure générale	19
II-4 Propriétés chimiques	20
II-5 Monographie des Pénicillines à action anti-streptococcique	20
II-6 Mécanisme d'action	21
II-7 Pharmacocinétique	22
II-8 Pharmacodynamie	22
III Résistance aux pénicillines	23
III-1 Définition	23
III-2 Classification	23
III-2-1 Résistance naturelle	23
III-2-2 Résistance acquise	23
III-2-3 Mécanismes	23
III-2-4 Résistance du pneumocoque à la Pénicilline	24

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL	26
I -METHODOLOGIE	26
I .1-Matériels	26
I.1.1-Cadre de l'étude	26
I.1.2-Origine des souches	26
I.1.3- Conservation des souches	
I.1.4- Matériel pour prélèvement	28
I.1.5-Matériel pour isolement et identification	28
I.1.6- Matériel pour la détection d'une β -lactamase par la méthode de la céfinase	28
I.1.7- Matériel pour antibiogramme	29
I.1.8- Matériel pour la détermination de la CMI par E-test	29
I.1.9- Matériel de conservation	30
I.1.10- Matériel d'exploitation des résultats	30
I .2- Méthodes	30
I.2.1- Prélèvements	30
I.2.1.1- Conditions de réalisation	30
I.2.1.2- Transport	31
I.2.1.3- Conservation	31
I.2.2- Examen macroscopique	31
I.2.3- Examen microscopique	32
I.2.4- Isolement	33
I.2.4.1- Ensemencement	33
I.2.4.2- Milieux utilisés	34
I.2.4.3- Interprétation	34
I.2.5-Identification	35
I.2.5.1- Examen macroscopique	35
I.2.5.2- Examen microscopique	35
I.2.5.3- Test de sensibilité à l'optochine	36
➤ Principe	36
➤ Technique	36
➤ Résultats	36
I.2.6- Recherche de Pneumocoques de sensibilité anormale à la pénicilline (PSAP)	36
I.2.6.1-Test présomptif	36
I.2.6.2-Test de confirmation	37
I.2.7- Antibiogramme standard ou diffusion en milieu gélosé	
I.2.7.1- Principe	38
I.2.7.2- Méthode	38
➤ Préparation de l'inoculum	38
➤ Ensemencement et application des disques	38

➤ Lecture	39
➤ Interprétation	39
I.2.8- Détermination de la CMI par E-test	41
I.2.8.1- Principe	41
I.2.8.2- Mode opératoire	41
➤ Préparation de l'inoculum	41
➤ Ensemencement	41
➤ Application des bandes E-test	42
➤ Lecture	43
➤ Stockage des bandes E-test	43
I.2.8.3- Critères d'interprétation	44
➤ Calcul des CMI ₅₀ et des CMI ₉₀	44
➤ Valeurs critiques des antibiotiques testés	44
I.2.9- Contrôle de qualité des tests de sensibilité	45
I.2.10- Analyse des résultats de la sensibilité aux antibiotiques	46
II / RESULTATS	48
II.1- Souches bactériennes	48
II .1.1-Répartition selon l'origine	48
II .1.2- Répartition selon le produit pathologique	49
II .1.3- Répartition en fonction de l'âge	50
II .2- Résultats de la sensibilité aux antibiotiques	51
II.2.1- Profil global des souches	51
II.2.2- Recherche de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline	55
III / DISCUSSION	60
III. 1- Souches bactériennes	60
III .2- E-Test	61

III. 3- Profil de sensibilité des souches aux antibiotiques	61
III .3.1- Sensibilité aux Béta-lactamines	61
III . 3.2- Sensibilité aux antibiotiques	63
 CONCLUSION	 65
BIBLIOGRAPHIE	67



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les infections pneumococciques occupent une place importante dans la pathologie infectieuse dans le monde du fait de leur fréquence, de leur gravité et de la mortalité élevée.

Elles sont la première cause de morbidité et de mortalité aux USA où l'incidence des pneumopathies et des méningites sont respectivement de 500.000 cas et 6.000 cas par an avec un résultat de 40.000 décès par an **(41)**.

Au Sénégal, cette incidence est estimée à 14 et 1400 pour 100.000 habitants par an avec une mortalité de 7 et 200 pour 100.000 habitants **(6)**

La pénicilline a été le traitement de référence des infections à pneumocoque pendant des décennies. Cependant, l'émergence et la fréquence croissante d'isolement de souches de sensibilité anormale à la pénicilline ont remis en cause ce traitement classique.

Au Sénégal, on a estimé en 1984 à 2,6 % le taux de pneumocoques à sensibilité diminuée à la pénicilline G **(49)** et en 1995 à 2,7 % à Dakar **(6)**. Ce travail a été entrepris dans le but de réunir les données sur la résistance bactérienne du pneumocoque et d'établir une ébauche thérapeutique efficace.



PREMIERE PARTIE :

Etude bibliographique

I/ Généralités sur le pneumocoque

I-1 Historique

Streptococcus pneumoniae fut isolé pour la première fois par Louis Pasteur en 1881 de la salive d'un enfant qui fut tué par la rage. Il l'appela « microbe septique » de la salive.

En 1883, Talamon isola le germe des crâchats souillés de pneumoniques et l'appela « coccus lancéolé de la pneumonie ».

En 1886, Fraenkel et Weichselbaum firent la description du germe.

En 1888, Gamalei l'isola et l'appela *Streptococcus lanceolatum parturi*.

En 1910, différents types sérologiques furent découverts et permirent l'emploi d'anti-sérums spécifiques qui constituèrent le premier traitement efficace de la pneumonie à pneumocoque.

En 1923, Griffith observa la capsule du pneumocoque virulent. Celle-ci est responsable de l'aspect lisse ou smooth (S) des colonies. Sa perte entraîne la perte de la virulence et l'apparition de l'aspect rugueux ou rough (R) des colonies.

En 1928, ce même auteur montra qu'une souche R et non pathogène pour la souris pouvait être transformée en une souche S capsulée et pathogène.

En 1944, Avery, MacLeod et MacCarthy établirent les bases de la génétique bactérienne en montrant que le facteur transformant chez le pneumocoque est l'ADN.

Le nom *Streptococcus pneumoniae* est donné au germe depuis quelques années.

I-2 Taxonomie

Les pneumocoques font partie de la classe des Cocci, de la sous classe des Cocci Gram +. Leur nom de famille est *Streptococcaceae*, le nom de genre est *Streptococcus* et celui de l'espèce *pneumoniae*. Ils peuvent être groupables ou non groupables (44).

I-3 Caractères bactériologiques

a) Habitat

Le pneumocoque est trouvé à l'état commensal dans les voies respiratoires supérieures. Il est transmis par l'intermédiaire des gouttelettes de Pflugge. Il est souvent retrouvé au niveau des muqueuses génitales et rarement chez les animaux.

C'est une bactérie très fragile qui ne survit pas dans l'environnement.

b) Morphologie

A l'examen microscopique, la morphologie est caractéristique et se présente sous un aspect en diplocoque, en flamme de bougie, en huit et en courtes chaînettes. Le germe est à Gram +, lancéolé et capsulé.

Toutefois, l'aspect n'est pas toujours évocateur.

Exemples :

- Dans un milieu carencé en magnésium ou en présence d'anticorps anti-capsulaires, les chaînettes observées sont relativement longues.
- Chez le malade sous traitement, le pneumocoque peut prendre un aspect pseudobacillaire.

c) Structure

Le pneumocoque est une bactérie à Gram +, capsulée.

Sa structure comprend trois parties : la paroi, la capsule et la membrane cytoplasmique

♦ Paroi

C'est une structure rigide, essentielle à la bactérie. Elle détermine sa forme et assure sa protection. Son constituant essentiel est le peptidoglycane ou mureine. C'est une macromolécule de grande taille, constituée de plusieurs chaînes linéaires faites d'une alternance de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Ces chaînes sont reliées par de courtes chaînettes peptidiques (figure 1).

Sa compacité détermine le degré de résistance de la bactérie qu'il entoure (45).

La paroi des bactéries à Gram + est généralement assez épaisse : 20 à 80µm . Elle est principalement constituée de peptidoglycane : 80µm (50).

Le peptidoglycane renferme des acides teichoïque et teichuronique qui interviennent dans l'activité bactéricide des bêta-lactamines (12).

♦ Capsule

Elle est présente chez le pneumocoque et détermine sa virulence (37). Sa structure est polysaccharidique.

C'est un caractère essentiel dans l'identification des types de pneumocoques.

♦ Membrane cytoplasmique

Elle est située sous la paroi et permet les échanges avec le milieu extérieur .Elle peut également être le point d'impact de diverses substances antimicrobiennes.

d) Culture

♦ Milieux de culture

Les milieux utilisés sont enrichis.

Exemple : gélose au sang de mouton ou de cheval à 5% .

L'addition de gentamicine à la concentration de 5µg / ml ou l'anaérobiose stricte rend le milieu sélectif au pneumocoque (1).

♦ Conditions de culture :

La culture du pneumocoque peut être réalisée à une température comprise entre 25 et 42°C et à des pH compris 6,5 et 8,3. En routine, le germe est cultivé en 24 à 48 heures entre 35 et 37°C, à un pH optimal de 7,8 (52).

L'enrichissement de l'atmosphère en CO₂ permet une meilleure sélection.

♦ Examen macroscopique

Les pneumocoques se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre. Ils développent une hémolyse de type alpha avec verdissement du milieu comme les streptocoques viridans.

Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée. Une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse.

e) Biochimie

Streptococcus pneumoniae est catalase négative et peroxydase négative ; ce qui induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène responsable en partie de son autolyse.

Les caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae* sont présentés dans le tableau I.

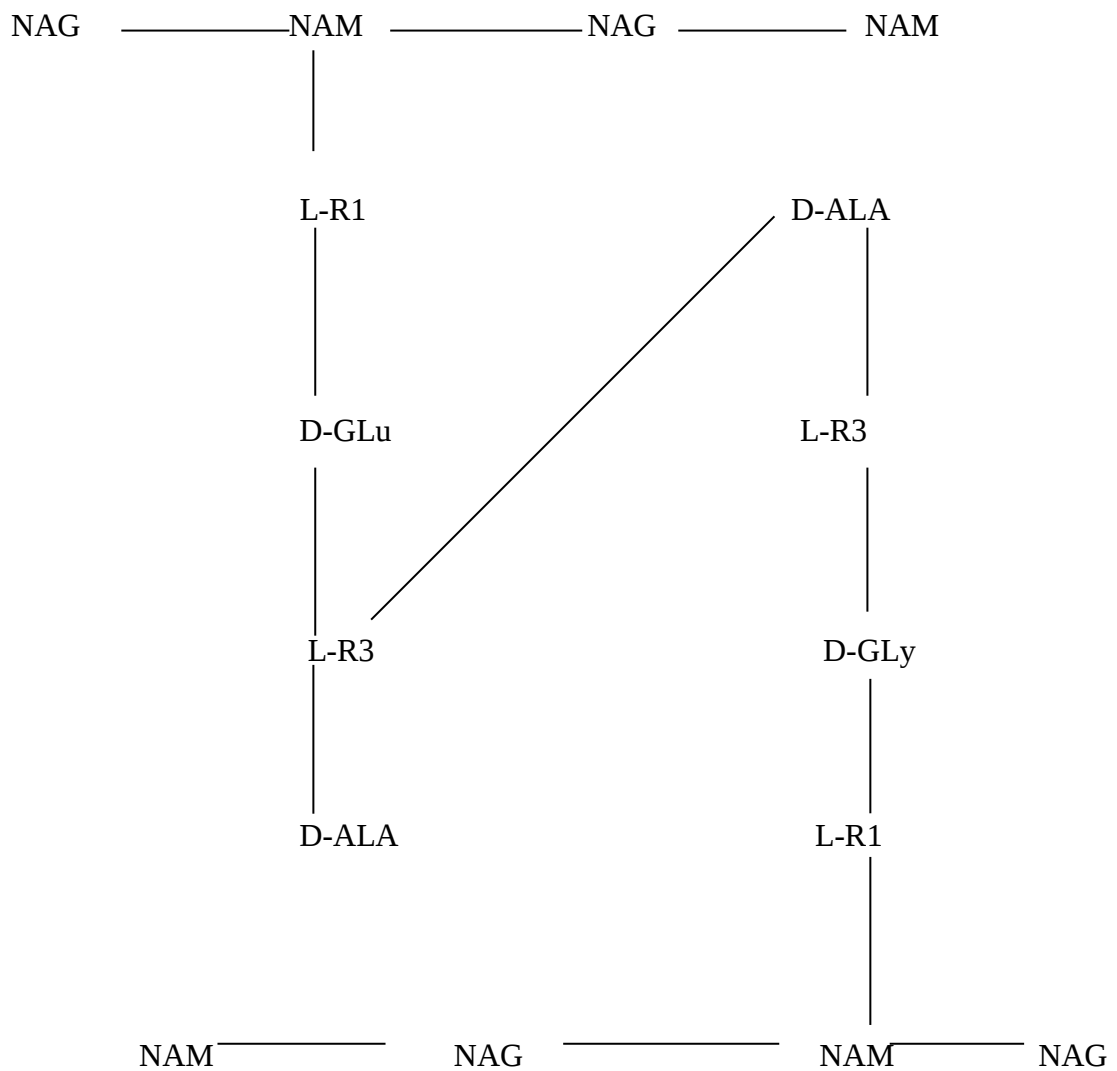


Figure 1 : Structure du peptidoglycane

Tableau I : Caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae*

TESTS	RESULTATS
Réaction de Voges-Prokaüer (VP)	-
Arginine-déshydrolase (ADH)	d
Esculine (ESC)	-
Bouillon hypersalé (BHS)	-
L-Arabinose (ARA)	-
Mannitol (MAN)	-
Sorbitol (SOR)	-
Trehalose (TRE)	+
Raffinose (RAF)	+
Sorbose (SOS)	d
Inuline (INU)	d
Lactose (LAC)	+
Ribose (RIB)	-
Amidon (AMD)	-
Glycérol (GLY)	d

+ : Caractère positif (71-90% des souches)

- : Caractère négatif (0-25% des souches)

d : Caractère variable (26-70% des souches)

La mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile, à l'aide de microméthodes, permet l'identification de *Streptococcus pneumoniae* et le diagnostic différentiel avec d'autres espèces de streptocoque.

f) Identification

L'identification formelle du pneumocoque repose sur trois critères.

- La sensibilité à l'optochine
- La lyse par la bile
- La mise en évidence d'une capsule

- **Sensibilité à l'optochine**

L'optochine est l'éthylhydrocupreine dérivé de la quinine.

Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque . Toutefois , 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques viridans en sont sensibles **(19)**.

Il faut donc tenir compte du diamètre de la zone d'inhibition : la plupart des pneumocoques en phase S (smooth) ou R (rough) ont un diamètre d'inhibition supérieur à 15-20mm.

- **Lyse par la bile ou phénomène de Neufeld**

A pH neutre, les pneumocoques provenant d'une culture de bouillon et mis en suspension dans de l'eau de sodium de 2 à 10% stérile sont lysés par une solution de désoxycholate . La lyse se traduit par un éclaircissement du milieu.

Une autre méthode préconisée par l'American Society of Microbiology (ASM) consiste à faire une suspension bactérienne en eau physiologique de turbidité égale à 0,5 ou 1 sur l'échelle de Mac Farland **(1)**.

La sensibilité à l'optochine et la lyse par les sels biliaires sont spécifiques aux pneumocoques et peuvent être utilisées pour les souches S (smooth).

Pour les souches R (Rough), le seul test utilisable est la sensibilité à l'optochine.

- **Mise en évidence de la capsule**

Elle se fait par action d'un sérum antipneumococcique polyvalent sur des cultures ou des produits pathologiques.

La révélation de l'antigène capsulaire peut se faire par différentes méthodes :

→ réaction de Neufeld ou du « gonflement capsulaire »

→ réactions d'agglutination

- procédé des particules de latex sensibilisées
- coagglutination (COA) avec staphylocoques tués **(2,10)**
- contre immuno-électrophorèse (CIE) **(5,13)**

Ces différentes méthodes permettent de déterminer les divers caractères antigéniques des streptocoques déterminant plusieurs sérogroupes ou sérotypes. (tableau II).

Tableau II : Classification danoise des 83 sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* (44).

Types monovalents (27)	Groupes (19)	Types inclus dans le groupe (56)
<u>1</u>		
<u>2</u>		
<u>3</u>		
<u>4</u>		
<u>5</u>		
	6	<u>6A</u> , 6B
	7	<u>7E</u> , 7A, 7B, 7C
<u>8</u>	9	<u>9N</u> , 9A, 9L, 9V
	10	10F, 10A,
	11	11F, 11A, 11B, 11C
	12	<u>12E</u> , 12A,
13		
<u>14</u>		
16	15	15F, 15A, 15B, 15C
	17	17F, 17A
	18	18F, 18A, 18B, <u>18C</u>
	19	<u>19E</u> , 19A, 19B, 19C
20		
21		
	22	22F, 22A
	23	<u>23E</u> , 23A, 23B
	24	24F, 24A, 24B
<u>25</u>		
27		
	28	28F, 28A
29		
31		
	32	32F, 32A
	33	33F, 33A, 33B, 33C
34		
	35	33F, 35A, 35B, 35C
36		
37		
38		
39		
40		
	41	41F, 41A
42		
43		
44		
45		
46		
	47	47F, 47A
48		

I-4 / Pouvoir pathogène

Le pneumocoque est un commensal des voies respiratoires supérieures de l'homme et des animaux.

Le portage asymptomatique est inversement proportionnel à l'âge, au titre d'anticorps anticapsulaires de l'hôte **(33)**.

Le statut immunitaire de l'hôte est également un facteur important dans la prévalence et la durée du portage **(11)**.

Des infections très sévères sont décrites à tous les âges mais avec une extrême gravité avant deux ans et après soixante ans. Elles sont à type de :

- Pneumonie
- Bactériémie
- Bronchites suppurées
- Péritonite
- Endocardite et Péricardite ...etc

I-5 / Diagnostic

Il est essentiellement direct par la mise en évidence de la bactérie

Les différents échantillons à prélever pour porter un diagnostic de méningite, de septicémie ou de pneumopathie à pneumocoques figurent dans le tableau III

Tableau III : Prélèvement à effectuer dans les principales infections à pneumocoque

	MENINGITES	SEPTICEMIES	PNEUMOPATHIES
Examen direct	LCR après centrifugation prolongée		Crachât Liquide pleural
Culture sur gélose au sang sous CO ₂ ou de préférence en anaérobiose	LCR et sang	Sang	Crachât, aspirations bronchiques, Ponction trans-traéchéales, sang, Liquide pleural
Recherche d'antigène	LCR Sérum, Urines	Hémoculture Sérum, Urines	Crachât, Sérum, Urines, Liquide pleural

Le diagnostic peut également être indirect

- par la culture : - sur milieux liquides (bouillon T)
- sur milieux solides (gélose au sang)
- par la recherche d'antigènes solubles par des réactions d'agglutination
- par la sérologie par dosage d'anticorps anti-enzymes (pneumolysine, hyaluronidase) ou anticapsulaires. Les techniques utilisées sont la RIA (radio immunologic action) et Elisa
- par la PCR (polymérase chain réaction) très sensible et très spécifique (47).

Les facteurs de virulence sont :

- la capsule qui diminue l'opsonisation et l'ingestion par les cellules phagocytaires

- la pneumolysine qui est une hémolysine intracellulaire et responsable de l'hémolyse de type alpha (57)
- la protéine A de surface

II / GENERALITES SUR LES PENICILLINES

II- 1 °) Historique

Pressentie depuis 1877 par Pasteur et Joubert, la notion d'antagonisme entre les micro-organismes ou concurrence biologique ne prit sa forme définitive qu'en 1929 par la découverte de Sir Alexander Flehming de la pénicilline. En 1939, Florey, Chain Abraham et Heathley chercheurs à l'université d'Oxford, reprirent les travaux de Flehming (extraction, purification). En 1940, ils firent la première expérimentation sur une souris atteinte de streptococcie.

La pénicilline est ensuite utilisée avec beaucoup de succès surtout pendant la deuxième guerre mondiale.

II- 2°) Définition

Le terme « pénicilline » a été donné par Flehming en 1929 à une substance à propriétés antibactériennes élaborée par un germe du genre *Penicillium*.

La synthèse fut ensuite réalisée par Shecham en 1957.

II-3°) Structure générale

Les pénicillines sont des bétalactamines dont la structure du noyau de base comporte toujours le cycle bêta-lactame auquel est associé le cycle thiazolidine.

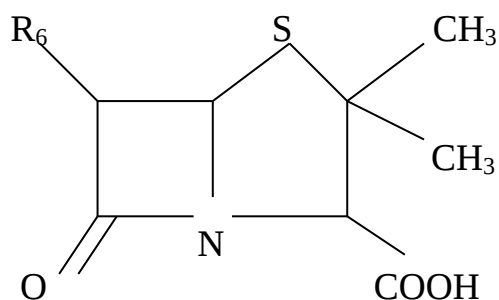


Figure 2 : Structure générale des pénicillines

Les différentes pénicillines sont distinguées par la nature du radical fixé sur le carbone 6 (pénicilline G).

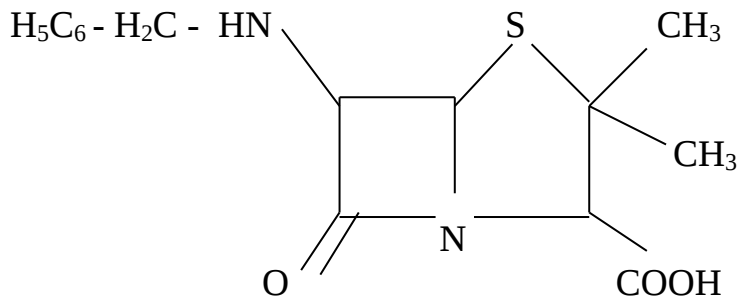


Fig 3 : Structure de la pénicilline G

II-4 / Propriétés chimiques

La fonction acide des pénicillines les rend peu stables en milieu acide (estomac).

Ainsi la pénicilline G est administrée par voie parentérale.

Les sels de sodium et de potassium sont très solubles dans l'eau.

L'ionisation rend difficile la diffusion à travers les membranes qui dépend également de l'hydrophobicité, de la taille et de la charge **(51)**.

Les solutions sont impérativement préparées au moment de l'emploi pour éviter l'hydrolyse .

II-5 / Monographie des Pénicillines à activité anti-streptococcique

➤ Pénicillines G et V

Le spectre d'activité concerne les bactéries à Gram négatif à l'exception des souches productrices de pénicillinases qui ouvrent le cycle β-lactame et inactivent ainsi les pénicillines.

- Pénicilline G ou benzyl pénicilline utilisée en IM et IV
- Bipénicilline (pénicilline-procaïne)
- Biclinocilline (bénéthamine pénicilline)
- Extencilline (benzathine pénicilline)

Ce sont des formes retard utilisées en IM.

- Pénicillines orales qui sont surtout la Pénicilline V (Ospen, Oracilline) assez mal absorbée.

➤ *Pénicilline A*

Elles ont un large spectre : celui de la pénicilline G élargi vers certains bacilles Gram –

- Aminopénicillines

Ampicilline (Totapen®, Penicline®)

Amoxilline (Bristamox®, Clamoxyl®, Hiconcil®)

- Carboxypénicillines

Carbenicilline (Pyopen®)

Ticarcilline (Ticarpen®)

- Ureido-pénicillines

Azlocilline (Securipen®)

Carbapenems : Tienam®

Oxapenams ou Clavams : Augmentin ®

Clavulin ®

Ce sont des associations de l'acide clavulanique avec l'amoxicilline ou la ticarcilline®

II-6 / Mécanismes d'action

Le site d'action des bêta-lactamines est connu avec précision depuis les travaux de Sprott **(36,51)**.

Les bêta-lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane. Elles agissent sur les PLP (Protéines liant la Pénicilline) qui sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane (transpeptidase et carboxypeptidase). Leur inhibition se traduit par l'arrêt de la croissance bactérienne puis sa lyse.

La pénicilline inhibe de manière compétitive les enzymes de synthèse de la paroi bactérienne.

L'affinité par analogie de substrat qu'elle développe, à leur égard, aboutit à la formation d'un complexe enzyme-pénicilline, avec altération de l'enzyme par un processus d'acylation (23). Les bêta lactamines sont donc des antibiotiques bactéricides. Le rapport CMI/CMB est voisin de 1. Cet effet bactéricide met en jeu d'autres enzymes autolytiques : glycosidases, amidases, et peptidases.

II-7 / Pharmacocinétique

La diffusion tissulaire des bêta-lactamines est moyenne. Elle est surtout extracellulaire. Leur diffusion méningée est généralement médiocre. Mais certaines molécules utilisées à fortes doses par voie intraveineuse sont efficaces. L'élimination est surtout urinaire.

II-8 / Pharmacodynamie

Elle a été longtemps déterminée par la CMI qui permet de définir les degrés de sensibilité des souches bactériennes vis à vis des antibiotiques.

Ainsi, une valeur de la CMI comprise entre 0,1 et 1µg/ml définit une sensibilité intermédiaire aux pénicillines et une valeur supérieure ou égale à 2µg/ml une résistance de haut niveau (16).

Toutefois la CMI qui traduit l'efficacité in vitro de l'antibiotique ne peut donner une idée exacte de l'activité in vivo. Ainsi on a défini de nouveaux paramètres :

- aire sous la courbe (AUC)
- quotient d'inhibition (QI)

$$QI = \frac{CMI \text{ in vivo}}{CMI \text{ in vitro}}$$

Ces deux paramètres permettent de déterminer l'efficacité thérapeutique :

$$QI > 10 \quad \text{et} \quad \frac{AUC}{CMI \text{ in vitro}} > 125$$

On définit également « le temps au dessus de la CMI qui correspond à la durée pendant laquelle la concentration sérique d'un antibiotique dépasse la CMI (27). Son intérêt, en terme de valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique des bêta-lactamines, a été démontré au cours d'études expérimentales et confirmé lors d'essais thérapeutiques (9,21) .

III / RESISTANCE AUX PENICILLINES

III-1 Définition

La résistance est l'aptitude d'une bactérie à se multiplier dans un milieu où la concentration en antibiotique est nettement plus élevée que celle qui empêche habituellement le développement de la majorité des souches de la même espèce (31).

III- 2 Classification

a) Résistance naturelle

Elle intervient d'emblée et correspond à une insensibilité permanente chez toutes les souches de même espèce à un antibiotique donné quelle que soit la dose administrée.

C'est une forme de résistance intrinsèque qui permet de déterminer le spectre d'activité d'un nouvel antibiotique.

b) Résistance acquise

C'est une forme de résistance intrinsèque qui intervient à la suite de l'utilisation inconsidérée des antibiotiques. Elle n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce normalement sensible. Elle résulte d'un mécanisme chromosomique (la mutation) ou d'un mécanisme extrachromosomique ou plasmidique.

c) Mécanismes

Trois mécanismes sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques : un enzymatique et deux non enzymatiques.

- Modification de la cible des antibiotiques par
 - substitution
 - diminution de l'affinité

- Diminution de la quantité d'antibiotique à l'intérieur de la bactérie par diminution du nombre des porines ou diminution de leur perméabilité par changement de configuration.
- Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques

d) **Résistance du Pneumocoque à la Pénicilline**

Le pneumocoque est naturellement sensible à la pénicilline . Cependant des phénomènes de résistance acquise ont été observés vis à vis des bêta-lactamines. Le premier a été observé en 1967 à Sydney avec des souches présentant une sensibilité diminuée **(14)**.

En 1977, des souches possédant un haut niveau de résistance à la pénicilline G (CMI>1mg/l) et des souches multirésistantes ont été décrites dans les méningites en Afrique du sud **(30)**.

Depuis, cette résistance est signalée dans plusieurs pays avec une fréquence constante. En France, la prévalence de la résistance aux pénicillines est de 25% **(53)**. C'est principalement une résistance acquise

L'altération des gènes entraîne la synthèse de nouvelles protéines. Ainsi les protéines cibles sont modifiées **(37)** et présentent une faible affinité pour l'antibiotique.

Streptococcus pneumoniae possède six PLP dont cinq de haut poids moléculaire (PLP1a, PLP1b, PLP2x, PLP2a, PLP2b) et une de bas poids moléculaire (PLP 3) qui est la seule non impliquée dans la transformation codant pour la production de la PLP d'affinité plus ou moins diminuée aux pénicillines.

La diminution de l'affinité de la PLP2b semble responsable de résistance **(42)**. Toutes les souches résistantes sont caractérisées par une grande variabilité du gène de la PLP 2b.

Leur apparition résulte donc de différentes recombinaisons de gènes aboutissant à une production de PLP d'affinité plus ou moins diminuée.

La multiplicité des combinaisons possibles explique l'hétérogénéité de la résistance et la nécessité de réaliser systématiquement des CMI pour ces souches.

D'autres mécanismes sont impliqués :

- Tolérance bactérienne **(35,38)**
- Production de bêta-lactamases plasmidiques, notamment les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BSE) **(4)**

Remarque :

Le quatrième mode de résistance (diminution de la perméabilité membranaire) ne concerne pas les bactéries à Gram + en raison de l'absence de membrane externe.

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAIL PERSONNEL

I / MATERIELS ET METHODES

I-1 Matériel s

I-1-1 Cadre de l'étude

Les travaux ont été effectués au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

I-1-2 Origine des souches

L'étude a porté sur des prélèvements faits entre 1993 et 2000.

→ 109 souches pathogènes isolées entre Décembre 1993 et Janvier 1995

→ 16 souches isolées entre Janvier 1997 et Janvier 1998

→ 16 souches isolées entre Août 1999 et Avril 2000.

Le total a été de 141 souches qui ont été isolées de différents produits pathologiques entre 1993 et 2000 :

(Liquide céphalo-rachidien , Hémoculture, Prélèvements respiratoires, Pus divers :otites, conjonctivite, articulaire...)

Les souches ont été collectées à partir des laboratoires de Bactériologie des CHU de Dakar.

I-1-3 Conservation des souches

Les souches ont pu être conservées dans

- du sérum de veau foetal (SVF)
- du bouillon cœur-cerveille additionné de 15% glycérol à -70°C.
- des cryotubes NUNC®
- de la gélose au sang cuit en tube

I-1-4 Matériel pour prélèvement

- Boîtes de pétri stériles
- Ecouvillons stériles
- Eau physiologique stérile
- glacière
- Réfrigérant

I –1-5 Matériel pour isolement et identification

- Gélose Muller-Hinton
- Boîtes de pétri
- Sang de cheval lysé
- Gentamicine
- Galerie CSB Streptocoques
- Générateur de CO₂ ou bougie
- Etuve
- Autoclave
- Anse de platine
- Eau distillée
- Disque s d'optochine
- Polyvitex

I-1-6 Matériel pour la détection d'une β -lactamase par la méthode de la céfinase

- Lames porte-objets
- disques de nitrocéphine
- eau physiologique
- anse de platine
- pinces

I-1-7 Matériel pour antibiogramme

- Coffret étalons échelle Mac Farland
- Eau physiologique stérile
- Boîtes de pétri
- Gélose Müller-Hinton
- Sang de cheval
- Disques d'antibiotique
 - Oxacilline (OXA) 1µg
 - Pénicilline (P-G)
 - Gentamicine (GENT)
- Pipettes Pasteur stériles
- Pipettes graduées stériles de 10ml
- Poires
- Tubes à hémolyse stériles
- Tubes à vis stériles
- Portoirs
- Anse de platine
- Bec Bunsen + source de gaz

I-1-8 Matériel pour la détermination de la CMI par E-test

- Souches viables de 24 h
- Gélose Müller-Hinton
- Sang de cheval
- Ecouvillons stériles
- Tubes à hémolyse
- Tubes Mac Farland 0.5
- Pipettes graduées de 10 à 25 ml
- Boîtes de pétri de 15 mm de diamètre

- eau physiologique
- polyvitex
- applicateur
- pinces, paire de ciseaux, pipettes
- bandes E-test
 - amoxicilline
 - amoxicilline-Acide clavunonique
 - pénicilline G
 - oxacilline
 - tétracycline
- Souches de référence pour contrôle de qualité S.p ATCC 49.619

I-1-9 Matériel de conservation

- Cryotubes NUNC®
- Bouillon cœur-cerveille
- Glycérol
- GSC en tube avec pente
- Lait écrémé

I-1-10 Matériel d'exploitation des résultats

Le logiciel Whonet IV a servi à l'exploitation des résultats

I-2 Méthodes

I-2-1 Prélèvements

I-2-1-1 Conditions de réalisation

La stérilité a été de rigueur .Car elle a déterminé la qualité des prélèvements.
Ces derniers ont nécessité.

- soit un recueil d'expectoration après effort de toux
- soit une aspiration au niveau du rhinopharynx
- soit une ponction veineuse pour l'hémoculture.

Les prélèvements ont été faits en dehors de toute antibiothérapie.

I-2-1-2 Transport

Il a été fait dans une glacière contenant des réfrigérants. Les prélèvements ont été ainsi acheminés au laboratoire et pris en charge dans un délai de 4h. Car la flore commensale se multiplie rapidement. Et les streptocoques sont fragiles.

I-2-1-3 Conservation

Elle a été faite par congélation à -70°C . La décongélation a été faite à la température ambiante du laboratoire.

I-2-2 Examen macroscopique

Il a consisté à apprécier l'aspect des prélèvements et a précédé leur traitement .

- les sécrétions rhinopharyngées ont été diluées à 0,1% avec de l'eau physiologique.
- les sécrétions trachéobronchiques ont été :
 - lavées avec de l'eau physiologique stérile
 - retirées complètement
 - ajoutées à un volume égal de N. acétylcystéine 1% ou de digesteur Eurobio® ; ce qui correspond à une dilution au demi.
 - mélangées au vortex pendant 2mn et laissées reposer 10 à 15 mn.
 - diluées au 1/500 avec de l'eau physiologique stérile.
 - Homogénéisées

I-2-3 Examen Microscopique

Il a été fait après coloration au Gram et/ou au bleu de méthylène.

A partir du produit pathologique préalablement traité, on a réalisé deux frottis : l'un au Gram et l'autre au bleu de méthylène.

L'examen microscopique à l'objectif 100 a permis d'apprécier :

- le nombre de cellules épithéliales
- le nombre de polynucléaires
- l'aspect de la flore

Le rapport nombre de polynucléaires sur le nombre de cellules épithéliales (2 pour un prélèvement acceptable) a permis de distinguer différentes situations.

(figure 4)

Cellules épithéliales pharyngées	< 25 /champ		> 25 / champ
Leucocytes			
Flore bactérienne au Gram	Polymorphe	Monomorphe ou nette prédominance d'un type	
Culture sans Signification			Culture propre A l'ensemencement
Prélèvement impropre à l'analyse bactériologique : Présence de salive			

Figure 4 : Critères d'acceptation des sécrétions trachéo-bronchiques ou rhinopharyngées

L'examen microscopique a été une étape incontournable. Car elle a permis de juger de l'acceptabilité du prélèvement et surtout d'orienter les investigations grâce à l'aspect de la flore.

I-2-4 Isolement

I-2-41 Ensemencement

10ml d'échantillon ont été ensemencés sur les milieux recommandés à l'aide d'une anse de platine.

I-2-4-2 Milieux utilisés

En vue d'obtenir des colonies des germes recherchés, les prélèvements ont été ensemencés sur des milieux appropriés, incubés dans des conditions précises. Ces milieux sont sélectifs.

Tableau IV : Conditions de culture de *Streptococcus pneumoniae*

Produits pathologiques	Expectorations et sécrétions rhinopharyngées	Hémoculture
Milieux de culture	GSC + gentamicine à 6µg/ml	BCC en flacon de 100ml (adulte) 50ml (enfant)
Modalités d'incubation	37°C + 5% de CO ₂ pendant 24-48 heures	37°C pendant 10 jours au moins

Remarque :

Les ballons d'hémoculture ont été observés chaque jour. L'apparition de trouble et la lyse du culot hématique ont permis de signer une culture positive.

I-2-4-3 Interprétation

Le nombre de colonies observées sur les milieux de culture correspond à la quantité de bactéries / ml de sécrétion. On ne peut donc affirmer qu'une culture est positive qu'après dénombrement du nombre de bactéries par ml.

Tableau V : Corrélation entre nombre de colonies observées sur les milieux de culture et le nombre de bactéries par ml de crachat.

Nombre de colonies sur les boites	Nombre de bactéries par ml de sécrétion
< 5 colonies	$10^5 - 10^6$
5 à 50	$10^6 - 10^7$
50 à 500	$10^7 - 10^8$
500	$> 10^8$

Interprétation

10^5 bactéries / ml : Souches commensales

10^6 bactéries / ml: Signification douteuse

$\geq 10^7$ bactéries / ml : Souches potentiellement pathogènes et susceptibles d'être responsables de l'infection en cours.

I-2-5 Identification

I-2-5-1 Examen macroscopique

Les colonies de pneumocoques sont petites, transparentes, rondes et développent une hémolyse de type α -viridans.

I-2-5-2 Examen microscopique

A partir d'une colonie, on a réalisé un frottis coloré au Gram. On a observé des cocci Gram positif ayant une forme lancéolée, en flamme de bougie, capsulés.

I-2-5-3 Test de sensibilité à l'optochine

➤ Principe

Streptococcus pneumoniae est généralement sensible à l'optochine (chlorhydrate d'éthyl-hydrocupreine) alors que les autres Streptocoques en particulier les non groupables ne sont pas sensibles.

Ce test est très fiable et d'une grande valeur diagnostique.

➤ Technique

Une boîte de gélose au sang est inoculée avec le germe isolé. On y dépose un disque imprégné de 5 µg d'optochine. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, on recherche l'existence ou l'absence d'une zone d'inhibition .

➤ Résultats

On a observé pour *Streptococcus pneumoniae* une zone d'inhibition > 15mm.
Les autres Streptocoques n'ont pas inhibés.

I-2-6 Recherche de pneumocoques de sensibilité anormale à la pénicilline (PSAP)

Elle a consisté à faire deux tests :

- Un test présomptif
- Un test de confirmation

I-2-6-1 Test présomptif

La détection de PSAP a été faite par la méthode de diffusion sur gélose Müller-Hinton additionnée de 5% de sang cuit avec disque d'oxacillline chargé à 1 µg. On a un PSAP si le diamètre d'inhibition autour du disque est inférieur ou égal à 19mm.

Une autre méthode a consisté à utiliser la dilution en gélose. Chaque souche a été repiquée par strie sur deux géloses Müller-Hinton + 5% de sang cuit contenant l'une 1 µg / ml et l'autre 0,25 µg / ml de pénicilline. L'observation après 18 heures d'incubation sous CO₂ a révélé 3 profils (Tableau VI).

Tableau VI : Profils observés

Concentration de pénicilline	Culture		
1 µg/ml	+	-	-
0,25 µg/ml	+	-	+
CMI présumptive	>1 µg /ml	≤ 0,25 µg /ml	= 0,5 µg/ml

I-2-6-2 Test de confirmation

Il s'agit de la détermination de la CMI de la pénicilline G par la technique de dilution de l'antibiotique en gélose Müller Hinton + 5% de sang cuit ou par la technique des bandes E-test® .

Ce test permet de classer les souches en :

- pneumocoques sensibles
- pneumocoques résistants intermédiaires
- pneumocoques résistants à haut niveau

I-2-7 Antibiogramme standard à diffusion en milieu gélosé

I-2-7-1 Principe

L'antibiogramme apprécie la modification de la croissance d'une souche bactérienne en présence d'antibiotiques. Il est réalisé sur gélose au sang cuit.

I-2-7-2 Méthode

➤ Préparation de l'inoculum

- partir d'une culture jeune de 18 h- 24h
- préparer une suspension de 1 à 2 colonies dans 10 ml d'eau physiologique.
- ajuster l'opacité à celle produite par le tube 0,5 de la gamme Mac Farland (concentration de 10^6 bactéries / ml ou 10^6 UFC / ml).
- diluer au 1/10 l'inoculum ainsi préparé

➤ Ensemencement et application des disques

- Ensemencer les boîtes contenant les milieux par inondation et laisser sécher 10 à 15 mn à la température ambiante après avoir aspiré l'excès.
- Appliquer les disques d'antibiotique à l'aide des distributeurs ou à la pince en appuyant légèrement.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures en atmosphère CO_2

Les antibiotiques testés ont été :

- Pénicilline G
- Oxacilline
- Ampicilline
- Amoxilline

- Amoxilline / Acide clavulanique

➤ Lecture

Les diamètres d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle à coulisse puis comparés aux valeurs critiques de l'antibiotique correspondant.

➤ Interprétation

En fonction du diamètre de la zone d'inhibition, le germe était dit sensible, intermédiaire ou résistant.

Les critères d'interprétation sont présentés dans le tableau VII: NCCLS et Whonet IV

Tableau VI : Concentration minimale inhibitrice interprétation-standard (µg/ml) pour *Streptococcus pneumoniae* selon NCCLS (1997) et Whonet IV

Antibiotiques	Sensibilité	Intermédiaire	Résistant
Amoxicilline acide clavulanique	$\leq 0,5 / 0,25$	1 / 0,5	$\geq 2/1$
Amoxicilline	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Céfotaxime	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Chloramphénicol	≤ 4	-	≥ 8
Erythromycine	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
Pénicilline	$\leq 0,06$	0,12	≥ 2
Rifampicine	≤ 1	2	≥ 4
Tétracycline	≤ 2	4	≥ 8
Triméthoprim /sulfaméthazole	$\leq 0,5 / 9,5$	1/19 – 2/38	$\geq 4/76$
Vancomycine	≤ 1	-	-

I-2-8 Détermination de la CMI par E-test®

Le E-test® est une technique de détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries aérobies comme les Entérobactéries , les Staphylocoques, les *Pseudomonas* et les Entérocoques mais également des germes fragiles tels que les Pneumocoques, les *Haemophilus* et les germes anaérobies.

I-2-8-1 Principe

Il est basé sur la combinaison des deux concepts de dilution et de diffusion.

Le système E-test® consiste en une bande en plastique non poreux, calibrée par un gradient préétabli de concentrations d'antibiotique couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg / ml d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,016 à 256µg / ml ou de 0,002 à 32µg / ml selon l'antibiotique.

I-2-8-2 Mode opératoire

➤ Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18h-24h dans un bouillon Müller Hinton pour les pneumocoques.

La suspension a été calibrée à l'échelle Mac Farland.

➤ Ensemencement

Le E-test® a été fait de préférence dans des boîtes de pétri de 150 mm de diamètre ; ce qui a permis de déposer un maximum de six bandes .

La gélose appropriée a été la gélose Müller-Hinton + Agar ajoutée de 5 % de sang de cheval défibriné.

La gélose a été coulée sur une épaisseur de 4,5 à 5 mm. Une fois la gélose solidifiée, les boîtes ont été mises à l'étuve pour avoir une surface bien sèche.

L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage : c'est la méthode de Kirby- Bauer préconisée par le NCCLS. On a imbibé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et on l'a essoré sur le rebord du tube .

L'écouvillon a été ensuite passé sur toute la surface de la gélose par simple rotation de 90°.

Il fallait s'assurer que toute la boîte était bien ensemencée.

Avant l'application de la bande E-test[®] , il fallait laisser sécher les boîtes afin que l'inoculum fût bien absorbé.

➤ Application des bandes E-test[®]

- Sortir le paquet de bandes à utiliser du « freezer » (-20°C) et le laisser revenir à la température ambiante jusqu'à ce que toute l'humidité s'évapore avant de l'ouvrir. Il faut environ 30mn.
- Vérifier l'absence de fente ou de trou sur les paquets de E-test. On n'utilise pas les paquets endommagés.
- Retirer les bandes avec une pince par la partie supérieure où il est marqué E.
- Eviter de toucher la zone chargée à la main
- Placer les bandes dans la cassette d'insertion des bandes. Chaque puits peut contenir 20 bandes
- Mettre le même type d'antibiotique par puits
- Remplir les puits de la cassette suivant l'antibiogramme
- Prélever bande par bande à l'aide de l'applicateur et les déposer à la surface de la gélose. Après 50 bandes, il faut changer la bande adhésive de l'applicateur.
- Incuber immédiatement les boîtes à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ pendant 20-24h

Remarque :

- Ne pas déplacer une bande E-test une fois déposée sur la gélose. Car la libération de l'antibiotique est instantanée.
- L'épaisseur de la gélose doit être d'environ $4 \pm 0,5\text{mm}$
- Ne pas déposer beaucoup de bandes E-test sur une boîte de pétri : un maximum de 6 bandes est possible.

➤ Lecture

Après 24h d'incubation, on a procédé à la lecture de la valeur de la CMI.

L'inhibition de la croissance se traduisait par une ellipse. La valeur de la CMI correspondait au point d'intersection entre la limite de la zone d'inhibition et la bande E-test.

➤ Stockage des bandes E-test

Les paquets d'E-test ont été stockés au « freezer » à -20°C . Après ouverture d'un paquet, les bandes inutilisées doivent être gardées dans des tubes de stockage hermétique contenant un dessicateur et placées à -20°C . Il fallait toujours :

- s'assurer que le dessicateur est bleu avant l'utilisation de la bande
- marquer les tubes de stockage avec étiquette indiquant la date de péremption, le numéro de lot et le code de l'antibiotique
- ne stocker que le même type d'antibiotique par tube

I-2-8-3 Critères d'interprétation

➤ Calcul des CMI₅₀ et des CMI₉₀

C'est la détermination de la médiane par la méthode d'extrapolation linéaire.

Les CMI₅₀ et les CMI₉₀ sont données par la forme suivante :

$$X = \frac{A - B}{C - B} (Z - Y) + Y$$

Si $X = \text{CMI}_{50}$

A = moitié des souches inhibées

B = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à A

C = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à A

$$B < A < C$$

Y = CMI de B

Z = CMI de C

Si $X = \text{CMI}_{90}$

A = 90% des souches inhibées

B = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à A

C = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à A

$$B < A < C$$

Y = CMI de B

Z = CMI de C

➤ Valeurs critiques des antibiotiques testés

Tableau VII : CMI interprétation standard (µg/ml) pour selon NCCLS et Whonet IV

Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Amocilline / acide clavulanique	$\leq 0,5 / 0,25$	1 / 0,5	$\geq 2 >1$
Amoxilline	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Pénicilline	$\leq 0,6$	0,12- 1	≥ 2

I-2-9 Contrôle de qualité des tests de sensibilité

Les normes utilisées sont celles de NCCLS

1. Obtenir les souches de contrôle de qualité de source sure (ATCC)
2. Entretenir correctement les souches de contrôle de qualité en les conservant suivant deux méthodes
 - * En stock culture pour l'utilisation fréquente des souches
 - * A -70°C dans les cryotubes pour une conservation de longue durée.
3. Dans toutes les séries d'antibiogramme ou de E-test de *Streptococcus pneumoniae*, les souches de référence ATCC 49619 S. p ont été testées en parallèle comme contrôle de qualité afin de valider ; les résultats de la dite souche sont lus en premier lieu.
4. Les contrôles de qualité sont effectués à plusieurs niveaux
 - * par une simple vérification de la date de péremption des milieux de culture et de tous les réactifs à utiliser
 - * par un stockage correct des milieux de culture, des disques et des bandes E-test avec un relevé quotidien de la température du réfrigérateur et du freezer
 - * Par une manipulation correcte avec respect de la démarche du protocole établi

- * Par une sélection correcte de la terminaison en pointe de la CMI
- * Par une vérification de la profondeur de la gélose, de la capacité de croissance supportée.

I-2-10 Analyse des résultats de la sensibilité aux antibiotiques

Le logiciel Whonet IV a servi à l'analyse des résultats. C'est une série de programmes informatiques permettant la gestion des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des germes bactériens.

Le Whonet IV permet d'obtenir sous forme de % et de diagramme les résultats de sensibilité des souches par rapport à différents antibiotiques et en fonction de différents paramètres.

Les différentes valeurs de CMI pour chaque souche testée ont été enregistrées dans l'ordinateur après avoir mis en place une grille d'enregistrement : les valeurs ont été vérifiées et corrigées avant l'exploitation par le logiciel Whonet IV (voir résultats)



II / RESULTATS

II--1 Souches bactériennes

L'étude a porté sur 141 souches de *Streptococcus pneumoniae* dont

- 109 isolées entre Décembre 1993 et Janvier 1995
- 16 isolées entre Janvier 1997 et Janvier 1998
- 16 isolées entre Août 1999 et Avril 2001

Les souches étaient conservées au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'HALD.

II-1-1 Répartition des souches selon l'origine

Tableau VII: Répartition des souches selon l'origine

Années	HALD	HEAR	CHU Fann	HPD	Total
2000	3	5	7	1	16
1997	9	5	1	1	16
1993	35	40	17	17	109
Total	47	50	25	19	141
Pourcentage (%)	33	35	18	14	100

La majorité des souches isolées provenaient de l'HEAR (35%) et de l'HALD (33%)

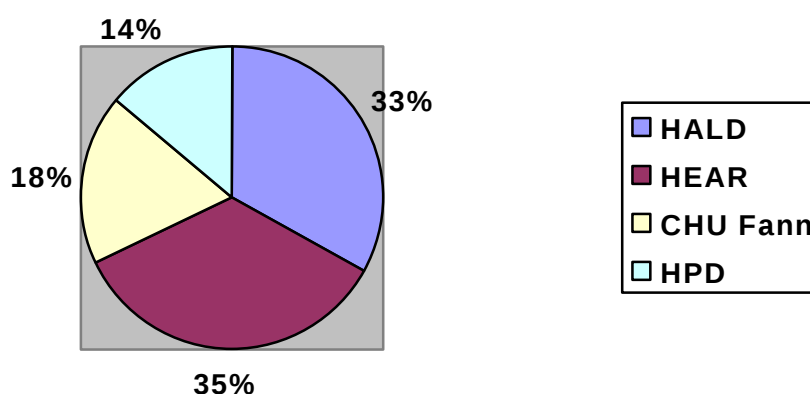


Figure 5 : Répartition selon l'origine

II.1.2 Répartition selon le produit pathologique

Tableau VIII : Répartition selon le produit pathologique

	1993	1997	2000	Pourcentages (%)
PR	16	5	14	18,65
PD	27	2	0	20,45
Hémoculture	5	2	2	6,39
LCR	61	7	0	54,31
Total	109	16	16	100

PR : prélèvements respiratoires

PD : pus divers

LCR : liquide céphalo-rachidien

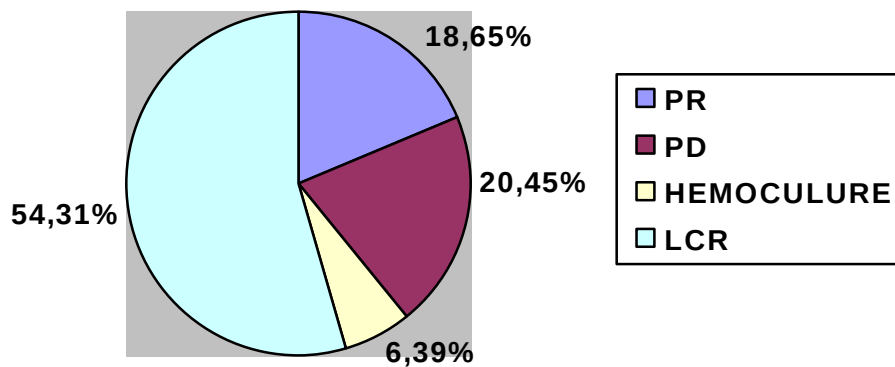


Figure 6 : Répartition selon le produit pathologique

Les souches isolées déterminaient surtout des méningites purulentes (54,31%). Les isollements venaient ensuite de prélèvements respiratoires (18,65%) et de pus divers (20,45%).

II-1-3 Répartition en fonction de l'âge

Tableau IX : Répartition en fonction de l'âge

	1993	1997	2000	Pourcentage (%)
Enfants (2-6 ans)	59	11	9	56
Adultes	50	5	7	44

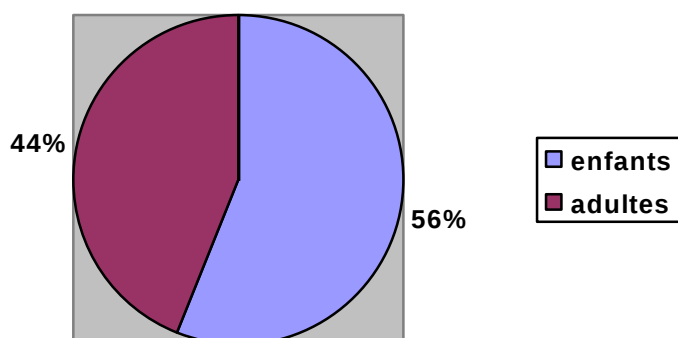


Figure 7 : Répartition selon l'âge

Streptococcus pneumoniae a été plus fréquemment isolé chez les enfants (56%) que chez les adultes (44%).

II .2 - Résultats de la sensibilité aux antibiotiques

II-2-1 Profil global des souches

Plusieurs antibiotiques appartenant à diverses familles ont été testés sur les souches de *Streptococcus pneumoniae* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les pourcentages de souches sensibles, intermédiaires et résistantes ont été déterminés pour chacun d'entre eux en fonction du diamètre d'inhibition. Les résultats de l'antibiogramme sont présentés dans le tableau X.

D'autres antibiotiques ont été testés par E-test® sur les mêmes souches. Les pourcentages de souches sensibles, intermédiaires et résistantes ainsi que les CMI₅₀ ,CMI₉₀ et leurs moyennes ont été déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau X.

Le tableau IV montre que la sensibilité globale des souches de pneumocoques est assez bonne.

Cependant un taux important de résistance est observé pour la tétracycline (33% en 1997), le Cotrimoxazole (34% en 1993) et l'Erythromycin 11% en 2000.

Le tableau permet aussi d'observer une nette progression de la résistance intermédiaire pour :

la Pénicilline G : 0% en 1993
35% en 1997
36% en 2000

le Cotrimoxazole : 17% en 1993
19% en 1997

20% en 2000

Une résistance intermédiaire évoluant vers une résistance nette est apparue pour

l'amoxicilline	R	I
	0%	3% en 1997
	4,5%	0% en 2000

l'amox / Ac clav	R	I
	0%	0% en 1997
	4,5%	0% en 2000

Tableau XI : Activité globale des antibiotiques

	1993			1997		
Antibiotiques	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S (%)
Amoxicilline				0	3	97
Amoxicilline / Acide clavulanique				0	0	100
Céfotaxime	0	0	100	0	3	97
Chloramphénicol	0	0	100	12	0	88
Erythromycine	0	0	98	6	0	94
Pénicilline G	2	0		0	35	65
Cotrimoxazole	34	17	49	9	19	72
Vancomycine	0	0	100	0	0	100
Tétracycline	17	7	76	33	6	61
Rifampicine				0	0	100

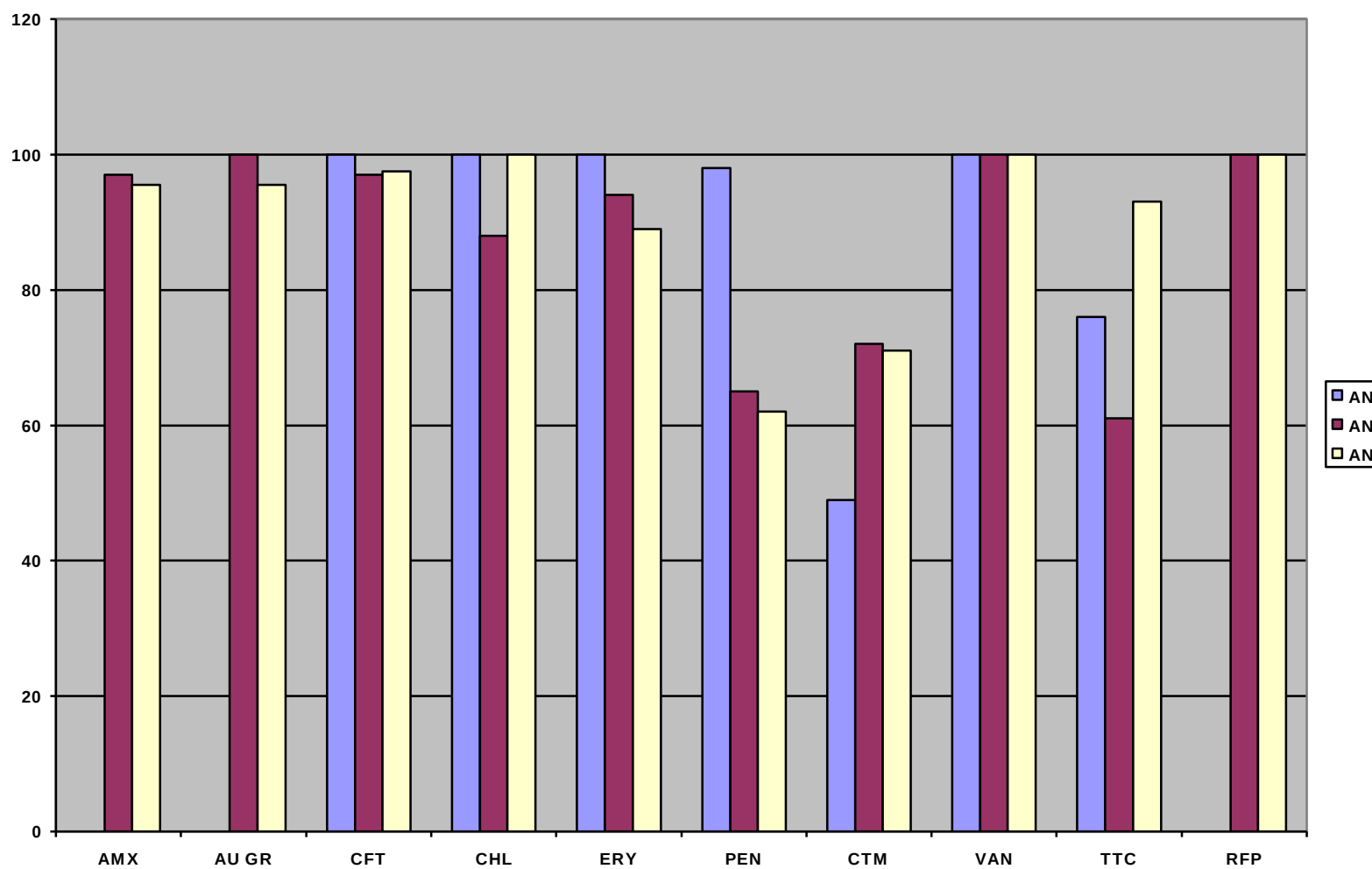


Figure 8 : pourcentage de sensibilité aux antibiotiques sur l'ensemble des souches de 1993 à 2000

Abscisses : antibiotiques
Ordonnées : % de sensibilité

II-2-2 Recherche de Pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP)

Elle a été effectuée par la détermination des CMI de la Pénicilline G et de divers antibiotiques. Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau XI.

Le tableau XI montre que le pourcentage de PSDP augmente progressivement :
2% en 1993 ; 35% en 1997 ; 36% en 2000.

Il indique également l'apparition d'une résistance franche à la Pénicilline mais avec une CMI bien inférieure à 2µg/ml. Donc aucune souche de pneumocoques testée n'a présenté une résistance franche.

Pour l'amoxicilline, les souches testées ont été globalement sensibles comme le montrent les CMI₅₀ et les CMI₉₀ basses. Seul un faible pourcentage (3% en 1997) a présenté une résistance intermédiaire.

L'association Amoxicilline/Acide clavulanique a été très active sur les souches avec des CMI₅₀ et CMI₉₀ basses.

Les céphalosporines de 3^{ème} génération (Céfotaxime) ont été très actives sur les souches testées. Seul un faible pourcentage a présenté une sensibilité diminuée :

0% en 1993

3% en 1997

2% en 2000

La sensibilité des souches vis à vis du chloramphénicol a été très bonne malgré la détection de 12% de cas résistance en 1997.

L'activité des macrolides représentés par l'Erytromycine a été assez bonne comme l'ont montré les CMI₅₀ et CMI₉₀. Toutefois, la sensibilité décroît pour laisser apparaître une résistance franche.

	S	R
1995	100%	0%
1997	94%	6%
2000	89%	11%

**Tableau XI : Activité des antibiotiques sur l'ensemble des souches : résultats des CMI₅₀
CMI₉₀**

	1993						1997						2000			
	Interval. de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	R(%)	I(%)	S(%)	Interval. de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	R(%)	I(%)	S(%)	Interval de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	R(%)
							0,5-2	0,016	0,25	0	3	97	0,008-8	0,047	2	4,5
a							0,5-25	0,016	0,016	0	0	100	0,008-2	0,023	2	4,5
	0,52	0,008	0,052	0	0	100	0,5-2	0,023	0,25	0	3	97	0,016-2	0,064	0,023	0
col	4-8	0,32	1,23	0	0	100	4-8	1,5	8	12	0	88	0,125-4	1,5	2	0
e	0,05-4	0,02	0,03	0	0	100	0,25-1	0,047	0,094	6	0	94	0,125-32	≤0,06	8	11
	0,06-1	0,005	0,011	0	2	98	0,06-2	0,023	0,75	0	35	65	0,06-2	0,047	0,25	2
e							0,5-4	0,25	2	9	19	72	0,047-6	0,38	1	9
e	< 1	0,17	0,26	0	0	100	1-2	0,38	1	0	0	100	0,125-1	0,125	0,5	0
	2-8	0,66	8,35	23,5	6,5	70	2-8	0,5	48	33	6	61	0,094-24	0,1	4	4,5
							1-4	0,32	0,19	0	0	100	0,032-05	0,075	0,25	0

La rifampicine a été très active sur toutes les souches. Une sensibilité totale a été notée avec des CMI₅₀ et CMI₉₀ faibles.

Les glycopeptides représentés par la Vancomycine ont été également très actifs sur l'ensemble des souches.

La sensibilité des cyclines, notamment de la Tétracycline, n'a pas été bonne. La Tétracycline a été la molécule la moins active sur les souches avec un pourcentage de résistance franche de 33% en 1997.

Elle a également présenté une importante résistance intermédiaire 6% en 1997

La sensibilité au Cotrimoxazole n'a pas été bonne : 72% en 1997 et 71% en 2000. Le Cotrimoxazole a présenté un fort taux de résistance intermédiaire 19% en 1995 et 20% en 2000 et un taux important de résistance franche stable 9% en 1997 et en 2000.

Tableau XII : Activité des antibiotiques sur les souches

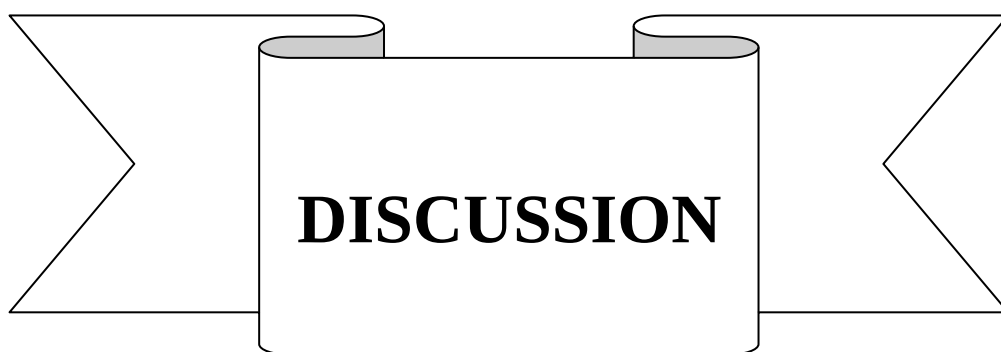
	1993	1997	2000
Amoxicilline		S	S
Amoxicilline /Ac clav		S	S
Céfotaxime	S	S	S
Chloramphénicol	S	MS	S
Erytromycine	S	S	MS
Pénicilline G	S	IS	IS
Cotrimoxazole		IS	IS
Vancomycine	S	S	S
Tétramycine	MS	IS-R	S
Rifampicine		S	S

S : sensible : plus de 90% des souches sont sensibles

R : résistante : au moins 50% des souches sont résistantes

MS : modérément sensible : l'antibiotique est modérément actif in vitro : 50 à 90%

IS : inconstamment sensible : le pourcentage de résistance intermédiaire est important 5 à 40%.



DISCUSSION

La sensibilité aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* a été étudiée par la méthode du E-test® (AB Biodisk, Solnäs, Sweden) selon les recommandations de NCCLS (46).

Le contrôle des différentes étapes de cette technique a été effectué à l'aide de souches de référence ATCC 49619 S.

III.1-Souches bactériennes

L'étude a porté sur 141 souches de *Streptococcus pneumoniae* dont :

- 109 prélevées entre Décembre 1993 et Janvier 1995
- 16 isolées entre Janvier 1997 et janvier 1998
- 16 isolées entre Août 1999 et Avril 2000

Elles ont été conservées à -70°C en bouillon cœur –cervelle additionné de 15% de glycérol.

La majorité des souches étudiées ont été isolées lors de méningites purulentes (54,31%) et essentiellement chez les enfants de moins de 7 ans (56%). On les a également isolées de prélèvements respiratoires (15,65%) , de pus divers (otites, arthrites) (20,45%) , de septicémies (6,39%).

Ainsi on a noté l'importance des pneumocoques en pathologie infectieuse pédiatrique.

III-2 E-Test

Le E-test est une méthode qui permet d'obtenir simplement et rapidement une détermination de CMI. Plusieurs travaux effectués par cette technique ont prouvé sa sensibilité, sa facilité et sa reproductibilité (7,40,55). Seules des différences minimales ont été notées en comparaison aux autres méthodes. Jorgensen a montré que ses résultats étaient bien corrélés avec ceux de la technique de référence (39).

En effet, plusieurs auteurs considèrent maintenant que le E-test est la meilleure méthode pour tester la sensibilité des pneumocoques (43).

Le E-test présente l'avantage de permettre le test simultané de plusieurs antibiotiques et l'inconvénient d'être assez onéreux.

III-3 Profil de sensibilité des souches aux antibiotiques

III-3-1 Sensibilité aux bêtalactamines

Toutes les souches de *Streptococcus pneumoniae* testées ont été sensibles à la pénicilline G.

Cependant le pourcentage de PSDP a augmenté au cours des années.

2% en 1993

35% en 1995

36% en 2000

Ces taux sont proches de celui trouvé en France dans les infections respiratoires et ORL 40-43% (48).

En 1997, les données du centre national de référence aux pneumocoques en France ont montré que le taux de pneumocoques de sensibilité anormale à la pénicilline au cours de pneumonie de l'adulte était de 32% parmi les souches

isolées en hémoculture et de 34% parmi les souches isolées d'autres prélèvements **(25)**.

L'apparition de résistance intermédiaire est inquiétante. En fait la pénicilline G est inefficace dès que les souches ont un certain niveau de résistance intermédiaire. Et l'échec thérapeutique devient possible **(15,26)**.

L'évolution de la prévalence des pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline est importante en Europe et aux USA. En France, la fréquence de PSDP est passée de 20 à 36% entre 1992 et 1995 **(15,24)**. Elle est de 26% à Atlanta aux USA **(34)**, 20% en Islande **(4)** et 45% en Espagne et en Afrique du sud **(28)**.

L'étude a montré que les PSDP sont surtout isolés du LCR et des prélèvements respiratoires :

- 42% du LCR en 1997 et 32% en 2000
- 17% en ORL en 1997 et 34% en 2000

Ceci est inquiétant vu la fréquence des méningites et des pneumonies surtout chez l'enfant. Les souches de PSDP ont surtout été isolées chez l'enfant (56%). Ce taux est proche de celui retrouvé en France lors d'une étude multicentrique : 60% de PSDP chez les enfants **(18,48)**.

Parmi les autres bêta-lactamines, l'Amoxicilline, l'association Amoxicilline/Acide clavulanique ont conservé une très bonne activité sur les pneumocoques. Cette bonne activité a été confirmée par C. Doit et E. Bingen **(20)** et Sy K. R. **(53)**, Benrejet **(8)** et Appelbaum **(3)**.

L'association Amoxicilline / Acide clavulanique possède la meilleure activité avec une CMI₉₀ plus basse. Cependant, un taux de résistance de 0,8% a été retrouvé à Pékin **(56)**.

Parmi les céphalosporines testées, la céfatoxime a donné de bons résultats avec des CMI basses ; ce qui correspond aux résultats d'autres études africaines **(8)**. Cependant des résistances à la céfatoxime ont été signalées aux USA **(22,56)**.

L'analyse comparative des deux derniers groupes d'antibiotiques a révélé une différence d'efficacité en faveur de la céphalosporine ; ce qui a été confirmé par le Pr Bertrand Dautzenberg (17).

III-3-2 Sensibilité aux antibiotiques

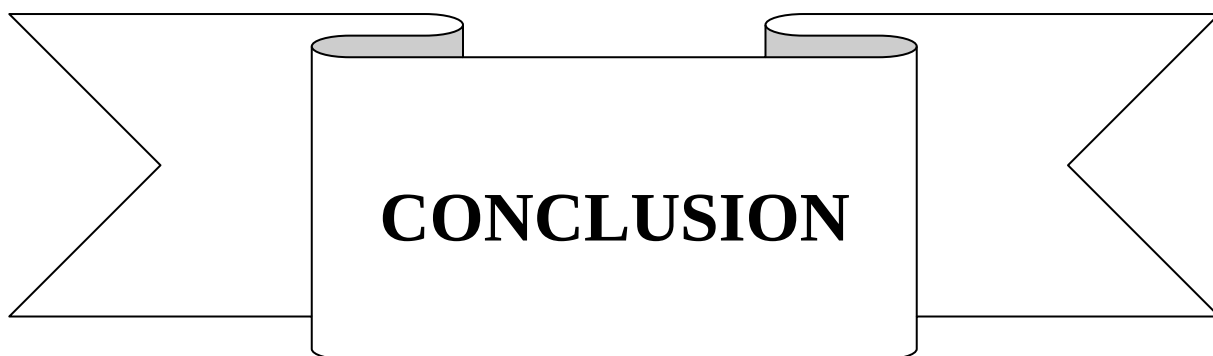
La Vancomycine et la Rifampicine ont présenté une très bonne activité (100%) vis à vis du pneumocoque. Aucune résistance n'a été rapportée jusqu'à présent dans la littérature.

La résistance à l'érythromycine a augmenté avec le temps. Ce phénomène a également été observé en France (48).

Le taux de pneumocoques de sensibilité anormale au cotrimoxazole est important (29%). Mais il est loin de celui observé à Pébin (56).

La résistance à la tétracycline est également importante : 39% en 1997.

Selon une étude multicentrique française faite en 1995, la résistance aux macrolides, au cotrimoxazole, aux cyclines étaient suffisamment fréquente pour que ces antibiotiques ne soient pas considérés comme une alternative thérapeutique au traitement de première intention des infections respiratoires et ORL en France (29).



CONCLUSION

La fréquence et la virulence du pneumocoque ,qui est pourtant un commensal de l'oropharynx, dans de nombreuses pathologies humaines et l'émergence de souches résistantes ou de sensibilité diminuée à la pénicilline G et à ses dérivés ont conduit à mener une étude sur l'évolution de la résistance afin de faire des ébauches de thérapeutique idoine.

Ce travail a porté sur 141 souches prélevées de 1993 à 2000. Les prélèvements réalisés sur différents produits pathologiques ont été pris en charge au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'HALD et conservés par congélation. La fréquence des souches de PSDP est en nette progression :

2% en 1993

35% en 1997

38% en 2000

Cependant l'amoxicilline associée ou non à l'acide clavulanique et la céfotaxime restent très actives et constituent la meilleure alternative en thérapie de première intention dans le rapport efficacité / tolérance. Car la vancomycine et la rifampicine bien que très efficaces (100%) sont mal tolérées.

Quant aux autres familles d'antibiotiques, la résistance est si importante qu'elles ne peuvent pas être considérées comme une alternative thérapeutique :

Macrolides : 11% en 2000

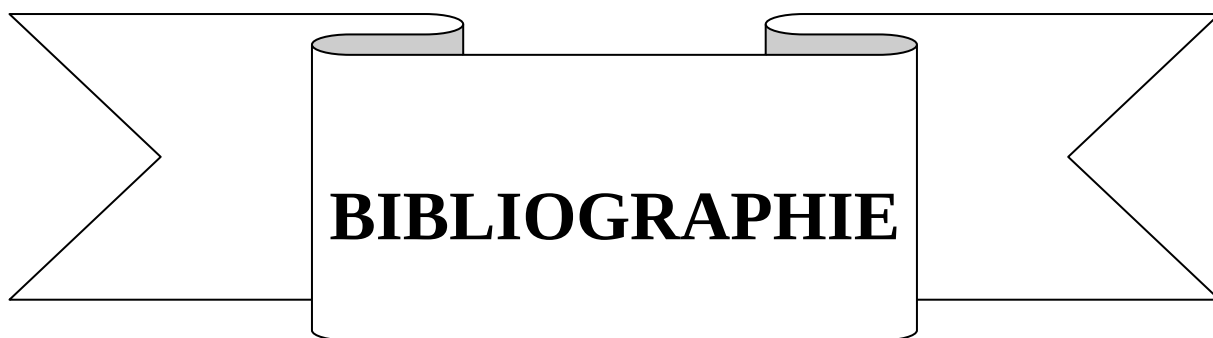
Sulfamides : 29% en 2000

Cyclines : 39% en 1997

Chloramphénicol : 12% en 1997

La place majeure que tient *Streptococcus pneumoniae* dans l'étiologie des méningites, des infections ORL et pulmonaires impose de tenir compte de l'ensemble des données relatives à la résistance aux antibiotiques. Un suivi

épidémiologique régulier est donc nécessaire à l'élaboration de stratégies.
thérapeutiques efficaces.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1-Albert B ; William J H. Jr ; Kenneth L. H.

Manuel of Clinical Microbiology
5 th Edition, ASM 1991 : 243-244

2- Alouf J.E.

Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin)
Pharmacol therap., 1980 ; 11 : 661-717

3- Appelbaum P. G.

Antibiotic resistant pneumococci facts and fiction
J. Chemother. ; 1994, 6 suppl. 4 : 7-16

4- Arason et al

Anticrobials increase pneumococcal resistance in children
Br. Med. J. ; 1996, 313 : 7054

5- Austrian R.

Some aspects of the pneumococcal carrier state
Antimicrob Agents chemother, 1986 ; 1f :35-45

6- Bathily C. T.

Etude de la sensibilité aux antibiotiques de différentes de différentes souches de pneumocoques isolées à Dakar.
Th. Pharm. , Dakar, 1995, 39.

7- Balmstrom A. ; Biodisk A. B.

Les CMI déterminées par E-test pour *Streptococcus pneumoniae* sont elles réellement inférieures à celles obtenues par la méthode de référence ?
ICAAC 1996

8- Ben Rejeb S. ; Kamouna.

Surveillance de la sensibilité in vitro de différents pathogènes isolés de prélèvements trachéo-bronchiques, pus chirurgicaux, hémocultures, urines et d'isolats de *Neisseria gonorrhoeae*.
Med. Dig., 1995, suppl. 4 : 24-31

9- Bergogne – Berezine E.

Concentrations minimales inhibitrices (CMI) in
Bases biologiques de l'antibiothérapie
Ed Masson Paris ; 1999 ; p 41-52

10- Birgertt , Lard B. ; Eva D.

Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* strains by coagglutination and counter immunoelectrophoresis
J . Clin Microb, Oct. 1983 ; 978-80.

11- Boulivois G. J .

Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*
J.Gen. Microbiol. , 1992 ; 138 : 249-259

12-Bristol Myers-Squib

Infectiologie : mécanismes bactériens de défense face aux bêta-lactamines 1993

13- Bussard A.

Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel : l'électrosynérèse.
Biochem, Biophys-Actual. 1959 ; 34 : 258.263

14-Center for disease control

Follow up on multiple antibiotic résistance
Pneumococci South Africa
Morbidity Mortality Weekly Rep : 1978 ; 27 : 1-2

15-Cohen R. ; Geslin P.

La résistance aux antibiotiques modifie - t - elle le pronostic des méningites et des otites moyennes aiguës à *Streptococcus pneumoniae*
Med. Mal. Inf. , 1997, 27 Spécial : 496 – 501

16-Craig. W.A

Anticicrobial Résistance Issues of the Future
Diagn. Microbiol Infect Dis 1996 ; 25 :213-217

17- Dautzenberg B.

Les infections respiratoires basses : un problème fréquent en médecine générale.
Act. Théra. Euro, 1994, n° 152

18- Defouilloy C. ; Fremaux A. ; Medhaoui A.

Influence du terrain sur la résistance du *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques. Med. Mal. Infect. , 1994 ; 24 : 693 – 697

19- Denis F

Actualités bactériologiques et épidémiologiques du pneumocoque
Le pharm. Biol 1983, 17 (145) : 35

20- Doit C. ; Bingen E.

Rôle du laboratoire dans la détection de la résistance du pneumocoque et dans le choix du traitement optimal.
Med. Mal. Infect. ; 1994 ; 24, Spécial : 939 – 943.

21-Drusano G.I., Craig W.A.

Relevance of pharmacokinetics on pharmacodynamics in the sélection of antibiotic for respiratory tract infection.
J chemother 1997 ; 9 (suppl 3) ; 38-44

22-Figueirido A., Connor J. D. ; Severin A.

A pneumococcal clinical isolate with high level resistance to cefotaxime and ceftriaxone.
J. Antimicrobiol. Agent. Chemother., 1992, 36 : 886 – 889

23-Friedland I. R., Mac Cracken Jr. GH

Management of infections caused by antibiotic- résistant *Streptococcus pneumoniae*
N Engl. J Med, 1994 ; 331 :3777-382.

24-Geslin P.

Bêta-lactamine et pneumocoques multi-résistants isolés en France (1984-94)
Med. Hyg., 1995, 53 : 211 – 218

25- Geslin P.

Centre national de référence des pneumocoques.
Rapport d'activité 1997.

26- Geslin P. ; Cohen R. ; Fremoux A.

Données épidémiologiques de la résistance aux antibiotiques des pneumocoques isolés du LCR .
Med. Mal. Infect. , 1996, 26 (Spécial) : 995-1005.

27-Gillepsie S.M., Ullman C., Smith M. D.

Détection of *S. p* in sputum samples by PCR.
J. Clin Microbiol, 1994 ; 32 : 1308-11

28- Goldstein F. W. AcarJ. F. and the Alexander Projet collaborative Goup.
Anti-microbial resistance among lower respiratory tract isolates of *S.p* : Result
of 1992-93 Western Europe and USA collaborative surveillance study
J. Anti-microbiol. Chemother. , 1996, 38 suppl. A 71-78.

29- Goldstein F.W. ; Pean Y. ; Guerrier M. L. et al

Activité des antibiotiques sur *Sp*, *Haemophilus influenzae* et *Branhamella*
catarrhalis isolés d'infections respiratoires et ORL en France : résultats d'une
enquête multicentrique.
Med. Mal. Infect. , 1998, 28 : 253-257

30-Goosens H, Sprenger M.J.W.

Community acquired infection and bacterial résistance.
BMJ 1998 ; 654-657

31-Gunnison J. B. ; Fraber M.A. ; Pelcher E. A.

Penicillin-resistant variants of *Pneumococci*
Appl. Microbiol. 1968, 16 : 311-314

32-Gutnam L.

Penicillin résistant and penicillin tolérant mutants of group A *Streptococci*.
Antimicrob. Agent chemother, 1982, 22, 128-136.

33-Gwaltney

Pathogenesis and sequelar of respiratory infections
Rev. Infect. Dis. , 1991 ; 13 : S477 – 85.

34-Herodias N. D.

Détermination de la sensibilité des souches *d'haemophilus influenzae* par E-test
et d'étude des variétés de la sensibilité à l'association Amoxicilline + Acide
clavulanique.
Th. Pharm. Dakar, 1996 ; 56

35-Horne D.

PH dépendant penicillin tolérance of group B *Streptococcus*
Antimicrob. Agent chemother ; 1981, 20, 128-135

36-Horn D. et al

Lethal effect of hétérolologans

37- Infections à Pneumocoques in : APPIF

Ed E Pilly Montmarency : 242 ;1997 :p 258-259

38- Jacoby G. A.

More extended spectrum bêta-lactamases

Antimicrob. Agents

39- Jorgensen J. H. ; Ferraro M. J. ; Mc Elmeel M. L.

Détection of penicillin and extended spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E-test

J. Clin. Microbiol, 1994, 32 : 159-63.

40- Kiska D. L. ; Jones M. C. ; Chazotte N. N.

Comparison of antimicrobial susceptibility méthodes for détection of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*.

J. Clin. Microbiol, 1995, 33(1) : 229-232

41-Kronenberger C. B., Hoffman R. E., Lezotte D. C.,

Invasive penicillin-resistant Pneumococcal infections : a prevalence and historical cohort study.

Emerg. Infect.Dis., 1996, 2 (2) : 1-6.

42-Livermore D. M.

Bêta-lactamases : distribution et inhibition

Lettre de l'infectiologue ; 1992, NH. Série : 4-8

43- Macias E. A. ; Mason E ; Ocra H. Y.

Comparaison of E-test with standard broth microdilution for détermining antibiotic susceptibilities of penicillin resistant strains on S. p

J. Clin. Microbiol, 1994, 32 : 430 - 432.

44- Mboup S.

Intérêt de la recherche des antigènes bactériens solubles pour établir le diagnostic et le pronostic des méningites purulentes.

Th. Pharm, Tours 1983, n° 2

45-Michel Briand Y.

Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques
Masson ed, Paris 1986

46-National commitee For Clinical Laboratory Standards.

Minimum inhibitory concentration (MIC) interpretive standards (µg /ml).
NCCLS Document M7-A4, 1997 , 17(2).

47-OMS

Rapport tech n° 210, 1961.

48- Pean y. ; Goldstein F. W. ; Guerrier M. ; L. et Le Groupe de Travail Français .

Activité des antibiotiques sur *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilis influenzae* et *Moraxella catarrhalis* isolés d'infections respiratoires et ORL en France : résultats d'une étude mulyicentriue.
Med. Mal. Infect. 1998 ; 28 : 253 – 257.

49- Samb A. ; Sawadogo ; Mboup S. ; Cissé M. F.

surveillance et évolution de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. p* et *Haemophilus influenzae* isolées dans les méningites purulentes au CHU de Dakar.
Dakar Med., 1987 ; 32 :6 – 7

50-Shockman G. D. et al

Structure, function and assembly of cell walls of gram positive bacteria
Ann ; Rev, Microbiol ,1983,37,501-527

51- Sprott B. et al

Penicillin binding proteins and the future of béta-lactam antibiotics
J. Gen. Microbial . , 1993, 129 1247-1260

52- Stéphane S.C.

S p, *H i* et *MC* dans les infections respiratoires basses communautaires à dakar.
Isolement bactérien et sensibilité aux antibiotiques.
Th Pharm, Dakar : 2000 ; n°81

53- Sy K. R.

Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques. Données actuelles au C.H.U A. Le Dantec de Dakar.
Th. Pharm. Dakar , 1996 ; n° 55.

54Varon C.

Bases moléculaires de la résistance du pneumocoque aux bêta-lactamines in
Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines
Springer Verlag-Ed. 1993, 15-24

55- Verhaegen J., Verbist L.

La méthode E-test est-elle fiable pour la détermination de la sensibilité des
Streptococcus pneumoniae sensibles et résistants à la pénicilline G.
ICAAC 1996.

56- Zaoui N.

Etude comparée de la sensibilité des souches d'*Haemophilus influenzae* et
Streptococcus pneumoniae isolées au Maroc et au Sénégal .
Th. Pharm. , Dakar : 1998 ; n°55.

57- Zimmerman W. et al

the function of the outer membrane of *E. coli* as a permeability barrier to bêta-
lactam antibiotics Antimicrob. Agent chemother : 1977, 12, 368-372.



DEDICACES

Je dédie

Ce Travail

*** Au Docteur Fatou WADE in mémorium**

Ta rigueur dans les études faisait de toi un exemple .

Ta solidarité, ton total dévouement aux parents et aux jeunes frères et ta confiance en moi m'ont énormément aidé à arriver au bout .

« Seuls meurent ceux que l'on oublie. Et on ne peut t'oublier »

Que la terre du Paradis te soit légère

*** A mon père**

Pour l'exemple que vous constituez dans tous les domaines

Pour votre sens du devoir

Pour les nombreux efforts fournis pour la réussite de vos enfants.

Puisse le bon Dieu vous accorde une très longue vie

Trouver ici le modeste témoignage de mon admiration, de mon affection et ma reconnaissance .

*** A ma mère**

vous avez toujours été un refuge pour moi . Vous avez su comprendre vos enfants, les guider lorsqu'ils étaient en difficulté et représenter la sécurité pour nous.

Ce travail n'est pas que le couronnement de vos sacrifices, de votre patience et de votre dévouement .

Je prie Dieu pour qu'il vous accorde une très longue vie pour savourer le fruit de vos efforts.

*** A Cheikh et Doudou**

Des mots ne pouvaient ni exprimer, ni traduire mon attachement, ma reconnaissance et ma gratitude envers vous.

*** A mes sœurs : Kana, Ndèye Amy, Collé, Awa, Awa Kaolack, Mamab**

je souhaite avoir qui a toutes vos vertus (disponibilité, gentillesse, complicité, dévouement). Je vous adore.

*** A mes frères : Tapha, Ibou, Michel, Adau, Elimane, Babou**

Le témoignage de mon respect, de mon attachement et de mon affection.
Restons unis pour l'éternité.

* **A Awa Sow**

j'ai trouvé soutien, compréhension, disponibilité et amour auprès de toi. Sois assurée de mon attachement et de ma tendresse éternels.

* **A Abdou Diop**

En témoignage de la solidité et de la durée de notre amitié. Merci pour tout.

* A mes amis d'enfance : **Mathurin, Karim, Ama, Sylla, Mor**

* A mes amis d'en face : **Baye, Badou, Tall, Fatou Baye, Omar, Ndèye Fatou**

* A mes amies : **Ndebane, Marie Guéye, Khoudia, Ndèye Bâ, Seynabou Lakh**

* A Madame **Thiam Guéte Diallo** : Pour ta disponibilité et ta gentillesse

* A la famille Mr **Barane Thiam** particulièrement à **Sénaba, Modou Nafi et Astou**. Toute ma sympathie

* Au **Dr Idrissa Barry** et sa femme et **Abdou Gassama**

Au Dr **Aïssatou Diouf** et famille

* A **Younouss, Soda, Libasse, Mamby, Magib**

A notre Maître , Directeur de Thèse et Président du jury
Le Professeur Cheikh Saad-Bouh Boye

Vous nous avez fait confiance en nous confiant ce travail. Nous espérons l'avoir fait selon vos principes de rigueur et de recherche de la perfection.

C'est aussi un très grand plaisir et un très grand honneur que vous nous faites en présidant ce jury.

Nous avons eu à apprécier durant notre cursus universitaire vos nombreuses qualités scientifiques et humaines.

Nous vous sommes très reconnaissant.

A notre Maître et Juge
Le Professeur Alioune Diéye

Votre enseignement de qualité, votre grande disponibilité et votre humilité, nous ont fascinés tout au long de nos études.

Qu'il nous soit permis, en ce jour solennel , de vous adresser nos vifs remerciements et de vous témoigner notre profonde reconnaissance .

A notre Maître et Juge

Le Maître de Conférence Agrégé Mamadou Badiane

Votre enseignement de qualité et votre prestance nous ont toujours fascinés.

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail témoigne de altruisme.

Soyez assuré de notre très grande reconnaissance et de notre immense admiration.

A notre Maître et Juge

Le Maître de conférences Agrégé Papa Salif Sow

Vous avez accepté spontanément de juger ce travail .

Votre simplicité et votre abord facile continuent de nous émerveiller .

Soyez assurer de notre profonde gratitude et notre grande sympathie.