

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

\*\*\*\*\*

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE

ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE : 2014

N° 239

**VALIDATION D'UNE METHODE D'ETUDE  
D'ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES SUR DES  
SOUCHES DE BACILLES A GRAM NEGATIF ISOLES  
D'INFECTIONS RESPIRATOIRES**

**MEMOIRE**

**DU DIPLOME DE MASTER DE MICROBIOLOGIE**

**FONDAMENTALE ET APPLIQUEE**

**ANNEE : 2012-2014**

**Présenté et soutenu publiquement**

**Le 30 Décembre 2014**

**Par**

**Mathias MBALE**

## MEMBRES DU JURY

<b>Président :</b>	<b>Mr Cheikh Saad-Bouh BOYE</b>	<b>Professeur</b>
<b>Membres :</b>	<b>Mme N'dèye Coumba TOURE-KANE</b>	<b>Professeur</b>
	<b>Mr Makhtar Camara</b>	<b>Maître-assistant</b>
<b>Directeur de mémoire :</b>	<b>Mr Cheikh Saad-Bouh BOYE</b>	<b>Professeur</b>
<b>Co-directeur de mémoire :</b>	<b>Mr Abdoulaye SECK</b>	<b>Assistant</b>

**L'éternel a de la bonté pour qui espère en lui**

**Lamentations 3 :25**

**DEDICACES**

***Je dédie ce travail :***

***A la mémoire de mon défunt papa, Charles MBALE,***

*A qui je rends un hommage très mérité.*

***A ma maman Catherine YAGBANZI,***

*Pour ton amour, ta prière, puisse Dieu Le Tout Puissant t'accorder santé et longévité.*

***A Diane OUAÏNA mon épouse bien aimée et à mes enfants adorés,***

*Pour votre affection, votre patience, votre confiance et votre soutien constant.*

***A mes frères et sœurs,***

*Pour vos encouragements et vos soutiens, je vous dis merci.*

***A mes nièces et neveux***

***A ma belle famille,***

*Toute ma gratitude pour le soutien et les conseils.*

***A mes promotionnaires du Prytanée Militaire de Saint-Louis,***

*En témoignage de la fraternité qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons partagés, je vous dédie ce travail ; et vous souhaite ainsi qu'à vos familles une vie pleine de santé, de réussite et de bonheur*

***A mes amis et collègues, merci de votre esprit d'équipe***

***A tous ceux qui n'ont pas été cités, vous n'avez pas été oubliés.***

## REMERCIEMENTS

*L'exposé de ce travail m'offre l'opportunité de remercier tous ceux qui m'ont encouragé et aidé dans sa réalisation.*

### ***Mes sincères remerciements :***

***A mon Directeur de mémoire, le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE,***

*Pour avoir accepté d'encadrer notre mémoire, pour votre qualité professionnelle, votre ouverture d'esprit scientifique, humain et intellectuel, votre rigueur et votre persévérance dans le travail, votre envie de recherche ; nous vous présentons toute notre estime et toute notre gratitude pour tout ce que vous apportez aux étudiants pour leur réussite, mais aussi pour tout ce que vous apportez au monde médical.*

*Nous prions Dieu le Tout Puissant, de vous donner longue vie, une santé de fer et beaucoup de succès dans tous vos engagements professionnels.*

***A Mon Co-directeur, Dr Abdoulaye SECK,***

*Vous vous êtes personnellement investi dans la réalisation de ce travail. Nous vous renouvelons nos sincères remerciements pour votre disponibilité et votre compétence.*

***A Dr Sokhna FALL,***

*Nous tenons à exprimer toute notre gratitude pour votre contribution et votre disponibilité dans la rédaction de ce mémoire.*

***Nous ne pourrions manquer d'adresser nos sincères remerciements :***

*Particulièrement à Monsieur Amadou DIOP, qui nous a apporté tout son soutien, et qui n'a ménagé ni sa compétence technique, ni son temps pour nous aider dans la réalisation de ce travail.*

*A tout le personnel de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie du Laboratoire de Bactériologie et de Virologie de Hôpital Aristide Le Dantec, nos très sincères remerciements:*

*Dr Assane DIENG*

*Monsieur Assane FAYE*

*Monsieur Abdoulaye DIOP*

*Monsieur Cheikh Oumar SAGNA*

*Monsieur Djibi SAMBOU*

*Monsieur Michel DIOP*

*Monsieur Pa BADJI*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail,  
Soyez tous assurés de notre reconnaissance !*



**A NOS  
MAÎTRES ET JUGES**

***A notre Maître et Président du jury***

***Monsieur le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE***

*Vous nous avez fait l'honneur de présider notre jury de mémoire malgré vos nombreuses occupations. La courtoisie, la gentillesse, l'humilité et les compétences que vous incarnez font de vous un modèle.*

*Veillez accepter, cher Maître, nos sincères remerciements ainsi que nos hommages respectueux.*

***A notre Maître et juge***

***Madame le Professeur N'dèye Coumba TOURE-KANE***

*Nous avons été très touchés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté d'être parmi nos juges et de pouvoir profiter de vos compétences.*

*C'est un grand honneur que vous nous faites. Nous vous remercions vivement de votre disponibilité. Nous tenons à vous exprimer notre profonde gratitude et notre considération.*

***A notre Maître et juge***

***Monsieur Makhtar CAMARA***

*En acceptant de juger ce travail, vous nous faites un grand honneur.*

*Soyez assuré très cher maître, de notre haute considération et de notre vive reconnaissance.*

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>CA-SFM</b>	: Comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CI</b>	: Concentration inhibitrice
<b>CIP-CAZ</b>	: Ciprofloxacine-ceftazidime
<b>CIP-GEN</b>	: Ciprofloxacine-gentamicine
<b>CLED</b>	: Cystine Lactose Electrolyt Deficient
<b>CMI</b>	: Concentration minimale inhibitrice
<b>CQI</b>	: Contrôle de qualité interne
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>EUCAST</b>	: European Committee and Antimicrobial Susceptibility Testing
<b><i>E. aerogene</i></b>	: <i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>FIC</b>	: Fractional Inhibitory Concentration
<b>E-TEST®</b>	: Epsilometer-test
<b>HALD</b>	: Hôpital Aristide Le DANTEC
<b><i>K. pneumonia</i></b>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>MH</b>	: Mueller Hinton
<b>NCCLS</b>	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>UFC</b>	: Unité formant colonie
<b>WHONET</b>	: World Health Organisation Network.

## LISTE DES FIGURES

<b><u>Figure 1</u></b> : Technique de diffusion sur gélose par la bandelette E-test® .....	7
<b><u>Figure 2</u></b> : Epreuve de synergie entre deux disques d'antibiotiques.....	8
<b><u>Figure 3</u></b> : Représentation schématique de la technique de l'échiquier.....	14
<b><u>Figure 4</u></b> : Traduction graphique de FIC index (Isobogramme).....	16
<b><u>Figure 5</u></b> : Corrélation entre les CMI obtenues par la méthode de dilution et les CMI cibles.....	19
<b><u>Figure 6</u></b> : Corrélation négative des résultats de diamètres de l'antibiogramme et des CMI obtenus avec la ceftazidime.....	20
<b><u>Figure 7</u></b> : Corrélation négative des résultats de diamètres de l'antibiogramme et des CMI obtenus avec la ciprofloxacine.....	20
<b><u>Figure 8</u></b> : Corrélation négative des résultats de diamètres de l'antibiogramme et des CMI avec la gentamicine.....	21
<b><u>Figure 9</u></b> : Courbe de synergie totale de l'association CIP-CAZ sur la souche de <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853.....	22
<b><u>Figure 10</u></b> : Courbe de synergie partielle de l'association CIP-CAZ sur la souche <i>d'E.coli</i> ATCC 2592.....	23
<b><u>Figure 11</u></b> : Courbe de synergie partielle de l'association CIP-CAZ sur la souche de <i>P.aeruginosa</i> .....	24
<b><u>Figure 12</u></b> : Courbe de synergie totale de l'association CIP-CAZ sur la souche <i>d'E.aerogenes</i> .....	25
<b><u>Figure 13</u></b> : Courbe d'indifférence de l'association CIP-CAZ sur la souche de <i>K.pneumoniae</i> .....	26

<b>Figure 14</b> : Courbe de synergie totale de l'association CIP-GEN sur la souche de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	27
<b>Figure 15</b> : Courbe de synergie totale de l'association CIP-GEN sur la souche d' <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	27
<b>Figure 16</b> : Courbe de synergie partielle de l'association CIP-GEN sur la souche de <i>P.aeruginosa</i> ....	29
<b>Figure 17</b> : Courbe de synergie totale de l'association CIP-GEN sur la souche d' <i>E. aerogenes</i> .....	30
<b>Figure 18</b> : Courbe d'indifférence de l'association CIP-GEN sur la souche de <i>K. pneumoniae</i> .....	31

## LISTE DES TABLEAUX

<b><u>Tableau I:</u></b> Interprétation des interactions des associations d'antibiotiques .....	15
<b><u>Tableau II:</u></b> Résultats de l'antibiogramme standard des trois souches bactériennes .....	17
<b><u>Tableau III:</u></b> Résultats de la souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	18
<b><u>Tableau IV:</u></b> Résultats de la souche d' <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	18
<b><u>Tableau V:</u></b> Résultats de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
<b><u>Tableau VI:</u></b> Résultats des CMI obtenues par dilution comparés aux valeurs cibles (EUCAST).19	
<b><u>Tableau VII:</u></b> Sensibilité de la souche de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 à l'association CIPCAZ	22
<b><u>Tableau VIII:</u></b> Sensibilité de la souche d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 à l'association CIP-CAZ.....	23
<b><u>Tableau IX:</u></b> Sensibilité de la souche de <i>P. aeruginosa</i> à l'association CIP-CAZ.....	24
<b><u>Tableau X:</u></b> Sensibilité de la souche d' <i>E. aerogenes</i> à l'association CIP-CAZ .....	25
<b><u>Tableau XI:</u></b> Sensibilité de la souche de <i>K. pneumoniae</i> à l'association CIP-CAZ.....	26
<b><u>Tableau XII:</u></b> Sensibilité de la souche de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 à l'association CIP-GEN27	
<b><u>Tableau XIII:</u></b> Sensibilité de la souche d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 à l'association CIP-GEN.....	28
<b><u>Tableau XIV:</u></b> Sensibilité de la souche de <i>P. aeruginosa</i> à l'association CIP-GEN .....	29
<b><u>Tableau XV:</u></b> Sensibilité de la souche d' <i>E. aerogenes</i> à l'association CIP-GEN.....	30
<b><u>Tableau XVI:</u></b> Sensibilité de la souche de <i>K. pneumoniae</i> à l'association CIP-GEN.....	31
<b><u>Tableau XVII:</u></b> Récapitulatif des résultats des associations d'antibiotiques CIP-CAZ et CIP-GEN sur les souches bactériennes.....	32

## **TABLE DES MATIERES**

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Première partie : Revue bibliographique</b>	
I.Intérêt de l'association d'antibiotiques en thérapeutique infectieuse [7,8].....	2
II. Indications actuelles des associations .....	2
II.1 Elargir le spectre antibactérien .....	2
II.2 Prévenir l'émergence des mutants résistants.....	2
II.3 Obtenir un effet synergique pour renforcer la bactéricidie.....	3
III.    Comment associer les antibiotiques .....	3
III.1 Choix des associations d'antibiotiques.....	4
IV.    Définition des interactions .....	4
IV.1 Mécanismes des associations synergiques .....	5
IV.2 Mécanismes des associations antagonistes.....	6
V. Méthodes d'étude des associations d'antibiotiques .....	6
V.1 Technique d'étude par diffusion.....	6
V.2 Techniques d'étude par dilution en milieu liquide.....	9
I.    Cadre de l'étude .....	10
II. Objectifs .....	10
III. Souches bactériennes étudiées .....	10
IV. Matériel.....	10

IV.1 Matériel et réactifs de laboratoire .....	10
IV.2 Matériel d'exploitation des résultats.....	11
V. Méthodologie .....	12
V.1 Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques .....	12
V.1.1 Antibiogramme standard .....	12
V.1.2 Méthode d'étude des associations d'antibiotiques.....	12
V.2 Contrôle de qualité.....	16
VI. Résultats .....	17
VI.1 Profils de sensibilité des trois souches pathogènes .....	17
S : Sensible ; I : Intermédiaire ; R : Résistant.....	17
VI.2 Résultats de l'antibiogramme et des CMI des souches étudiées .....	18
VI.2.1 Diamètres et CMI des souches étudiées.....	18
VI.3 Validation de la détermination des CMI par la méthode de dilution.....	19
VI.3.1 Corrélation entre les CMI obtenues et les CMI cibles des souches de référence...19	
VI.3.2 Corrélation entre les CMI obtenues par la méthode de dilution et les diamètres obtenus par l'antibiogramme standard.....	20
VI.4 Sensibilité des souches aux différentes associations d'antibiotiques .....	22
VI.4.1 Sensibilité des souches à l'association ciprofloxacine-ceftazidime.....	22
VI.4.2 Sensibilité des souches à l'association ciprofloxacine-gentamicine.....	27
Tableau XII : Sensibilité de la souche de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 à l'association CIP- GEN.....	27
VII. DISCUSSION .....	33

<b>Recommandation.....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>38</b>

# **INTRODUCTION**

Les bacilles à Gram négatif occupent une place importante en pathologie humaine et sont fréquemment isolés au laboratoire. Ils sont à l'origine d'infections diverses parmi lesquelles les infections respiratoires qui sont des affections graves et représentant un motif fréquent de consultation médicale. Ces infections respiratoires constituent un réel problème de santé publique, avec des taux de mortalité et de morbidité significatifs particulièrement dans les pays en voie de développement, en dépit des progrès importants réalisés dans le domaine thérapeutique et de diagnostic microbiologique [2].

Les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* qui sont des bactéries commensales et opportunistes, sont les plus fréquemment isolées, souvent responsables d'infections nosocomiales et rarement d'infections communautaires [1,2].

Le diagnostic d'infections respiratoires est habituellement établi sur des bases cliniques, et les traitements sont souvent instaurés de façon empirique en l'absence de tout diagnostic microbiologique [5].

L'utilisation irrationnelle des antibiotiques pour traiter ces infections peut entraîner l'émergence et la propagation des bactéries multirésistantes, d'où la survenue d'échecs thérapeutiques.

Ainsi, pour guider le clinicien dans son choix thérapeutique et permettre une prise en charge correcte de ces infections [16]; il est indispensable face à l'ampleur des échecs thérapeutiques, d'améliorer la démarche diagnostique et thérapeutique en optimisant l'utilisation des antibiotiques par la recherche d'une efficacité maximale.

C'est dans cette optique que nous avons réalisé ce travail qui a consisté à étudier l'activité d'associations des antibiotiques sur les souches isolées d'infections respiratoires pour rechercher un effet synergique.

Les objectifs de ce travail étaient de:

- Valider la méthode de la technique de dilution pour étudier une association d'antibiotiques
- Etudier deux associations d'antibiotiques testés sur trois souches bactériennes isolées d'infections respiratoires.



**PREMIERE PARTIE :**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Intérêt de l'association d'antibiotiques en thérapeutique infectieuse [7,8]**

Dans les infections sévères généralisées, surtout sur des témoins fragilisés, il est indispensable que l'antibiothérapie soit efficace.

Dans les infections aiguës localisées, une antibiothérapie bactériostatique peut suffire pour limiter la prolifération des bactéries, avec l'aide des défenses naturelles le foyer infectieux pourra être éliminé.

Aujourd'hui, avec l'émergence des bactéries multirésistantes, le traitement antibiotique en monothérapie est parfois inapproprié : d'où l'intérêt d'utiliser les associations d'antibiotiques qui permettent de trouver une alternative au choix thérapeutique, limité à l'arsenal d'antibiotiques existant sur le marché surtout dans les pays en voie de développement.

## **II. Indications actuelles des associations**

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

Par contre, pour certaines bactéries multirésistantes les résultats d'antibiogramme ne permettent pas un choix à une molécule efficace, nécessitant de recourir à une association antibiotique.

Plusieurs circonstances essentielles peuvent motiver l'utilisation d'une association d'antibiotiques en thérapeutique.

### **II.1 Elargir le spectre antibactérien**

L'élargissement du spectre antibactérien permet :

- de traiter en urgence une infection sévère non diagnostiquée dans l'attente des résultats bactériologiques, l'association de deux antibiotiques à spectre d'activité complémentaire sera instaurée après avoir effectué les prélèvements nécessaires au diagnostic et pourrait être modifiée éventuellement en fonction des résultats bactériologiques obtenus.

- de traiter une infection à germes multiples, où un seul antibiotique ne peut être actif sur l'ensemble de la population bactérienne, il est souhaitable d'utiliser une association : c'est le cas notamment des infections à localisation ouverte (broncho-pulmonaire, digestive ou gynécologique).

### **II.2 Prévenir l'émergence des mutants résistants.**

L'émergence des bactéries résistantes est fonction de l'espèce bactérienne elle-même et de l'antibiotique utilisé. Certains antibiotiques (fosfomycine, acide fusidique, rifamycine, quinolones)

dont les mécanismes de résistance sont le plus souvent de déterminisme chromosomique, sont l'objet d'une fréquence de mutation élevée vers la résistance. Elle s'exprimera d'autant plus rapidement par l'émergence de mutants résistants au cours même de la thérapeutique, que la concentration bactérienne au site de l'infection sera importante. L'utilisation de ces antibiotiques en monothérapie est déconseillée et ne peut se concevoir qu'en association avec d'autres molécules.

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

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

### **II.3 Obtenir un effet synergique pour renforcer la bactéricidie**

La gravité de l'infection, qu'elle soit liée à un terrain particulièrement compromis, à un germe particulièrement résistant ou à un site particulièrement difficile d'accès, peut nécessiter un renforcement et/ou une accélération de la vitesse de bactéricidie. Dans de telles situations, les aminosides démontrent une importante activité lorsqu'elles sont associées à une bêta-lactamine ou une fluoroquinolone.

Les résultats thérapeutiques sont le plus souvent corrélés, à l'action de l'association étudiée *in vitro*, sur la souche bactérienne à l'origine du syndrome infectieux. Les effets synergiques sont plus souvent attendus lorsque la souche est sensible à chacun des deux antibiotiques de l'association ou alors lorsqu'elle est de sensibilité intermédiaire à l'un d'entre eux. Ces effets peuvent aussi être obtenus lorsque la souche est sensible à l'un des deux antibiotiques et résistante à l'autre. Ils sont plus rares lorsque la souche est résistante aux deux antibiotiques. En revanche, les effets antagonistes mis en évidence *in vitro* sont rarement démontrés en thérapeutique.

### **III. Comment associer les antibiotiques**

Les associations les plus fréquemment utilisées restent bêta-lactamine-aminoside en raison de leur effet synergique. D'autres font appel à des molécules qui, en monothérapie ne sont pas toujours les antibiotiques de choix vis-à-vis de la bactérie considérée. Ainsi, la céfotaxime n'est pas un antistaphylococcique de première intention, mais l'association céfotaxime-fosfomycine le devient même sur les souches de staphylocoques méthicillino-résistantes.

Les interactions entre antibiotiques sont très complexes. L'absence de standardisation des méthodes d'études de ces interactions *in vitro* gêne par ailleurs le choix du clinicien. Il est cependant impossible d'envisager l'ensemble des combinaisons possibles pour le traitement de toutes les infections. Il faut savoir que :

- Les associations font appel le plus souvent aux aminosides, aux bêta-lactamines et aux quinolones systémiques. En effet, les aminosides sont parmi les antibiotiques les plus rapidement bactéricides, notamment avec une bêta-lactamine ou une quinolone à action systémique.
- En l'absence de test fiable, extrapolable *in vivo*, l'étude de l'efficacité des associations d'antibiotiques repose toujours sur les données d'études cliniques, comparatives et rigoureuses.
- L'efficacité *in vivo* peut assurément survenir lorsqu'une synergie bactéricide de l'association peut être démontrée *in vitro*.
- Même les associations qualifiées d'antagonistes *in vitro* peuvent s'avérer efficaces.
- L'efficacité de l'association sera optimale si les antibiotiques sont présents ensemble, à des concentrations suffisantes au niveau du site infectieux.

### **III.1 Choix des associations d'antibiotiques**

#### **III.1.1 Choix en fonction du germe**

Du fait que l'efficacité de l'antibiotique soit fonction de la souche, il existe des associations "standards" que l'on utilise pour chaque souche.

Exemples d'associations synergiques :

- Bêta-lactamines et aminosides
- Glycopeptides et aminosides
- Sulfamides et triméthoprime

#### **III.2 Autres critères de choix**

Dans chaque cas, le choix des antibiotiques à étudier dépendra également de leur capacité de diffusion dans le foyer infectieux, de la voie d'administration souhaitée (orale ou parentérale) des risques toxiques et des effets secondaires liés à l'état du malade.

## **IV. Définition des interactions**

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

- **la synergie** : l'effet de l'association est significativement supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié pris isolément.
- **l'addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique étudié pris isolément.
- **l'indifférence** : l'effet de l'association n'est ni supérieur ni inférieur à celui de chacun des deux antibiotiques pris isolément.
- **l'antagonisme** : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets des deux antibiotiques pris isolément.

#### IV.1 Mécanismes des associations synergiques

- **Facilitation de la pénétration**

La pénétration d'un antibiotique dans la bactérie peut être facilitée par une autre molécule. Ce mécanisme est observé lors de l'association d'un antibiotique inhibant la synthèse de la paroi avec un aminoside. Ainsi, les bêta-lactamines ou la vancomycine facilitent la pénétration des aminosides en augmentant la perméabilité de la paroi. Cet effet synergique a été démontré pour les enterocoques, les streptocoques et les *Staphylococcus aureus*.

- **Inhibition séquentielle d'une même voie métabolique**

Les associations triméthoprime-sulfamide sont synergiques, car il y a inhibition séquentielle de la *dihydroptéroate synthétase* et de la *dihydrofolate réductase* qui sont deux enzymes impliquées dans la synthèse des folates.

- **Inhibition de la synthèse de la paroi**

Un effet synergique séquentiel se produit lors de l'association de la vancomycine avec une bêta-lactamine. L'association de deux bêta-lactamines se fixant sur des PLP différentes peut également avoir un effet synergique. Les PLP (Protéines Liant les Pénicillines) constituent les cibles d'action des bêta-lactamines.

- **Inhibition des bêta-lactamases**

Une synergie par compétition d'affinité pour une *bêta-lactamase* peut être observée lors de l'association pénicilline G (ou ampicilline) avec la cloxacilline.

L'association d'un inhibiteur des *bêta-lactamases*, tel que l'acide clavulanique, avec l'amoxicilline permet à ce dernier antibiotique de conserver une efficacité sur des souches productrices de certaines *bêta-lactamases*.

## IV.2 Mécanismes des associations antagonistes

- **Association d'un antibiotique bactériostatique et d'une bêta-lactamine**

Les antibiotiques bactériostatiques comme les tétracyclines, les macrolides ou les phénicolés diminuent l'activité bactéricide des bêta-lactamines, car celles-ci ne sont actives que sur les bactéries en phase de multiplication. Cet antagonisme a été démontré *in vitro* et *in vivo*.

- **Associations d'antibiotiques actifs sur la sous-unité 50S des ribosomes**

Les associations macrolides-chloramphénicol ou macrolides-lincosamides ou macrolides-macrolides conduisent à une compétition pour la fixation sur la sous-unité 50S des ribosomes, ce qui produit un effet antagoniste.

- **Inhibition du transfert actif des aminosides**

*In vitro*, l'association d'un aminoside avec un phénicolé ou une tétracycline inhibe le mécanisme de transfert actif nécessaire à la pénétration de l'aminoside dans la cellule bactérienne.

- **Induction des bêta-lactamases**

L'association de deux bêta-lactamines peut être antagoniste si l'une d'elles est inductrice des bêta-lactamases. Exemples : associations pipéracilline-céfotaxime (ou ceftazidime ou imipénème) ; associations céfoxitine-céfamandole (ou ceftazidime ou carbénicilline).

## V. Méthodes d'étude des associations d'antibiotiques

Il existe plusieurs méthodes d'étude des associations d'antibiotiques qui peuvent être regroupés en deux catégories : la technique d'étude par diffusion et la technique d'étude par dilution en milieu liquide [4, 9, 11, 14].

### V.1 Technique d'étude par diffusion

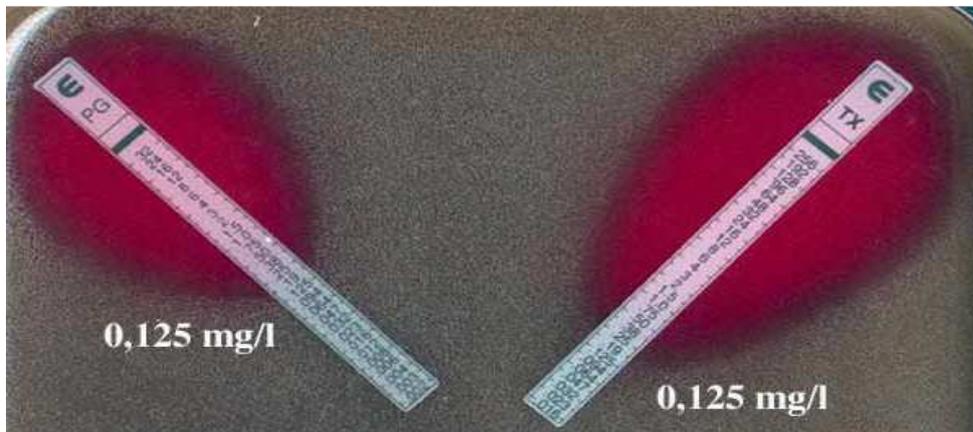
#### V.1.1 Technique de diffusion par E-test® [6]

Le test Epsilometer ou E-test® est une méthode de diffusion en milieu gélosé qui associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu gélosé.

Elle est basée sur la détermination de la CMI en utilisant des bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de concentrations d'antibiotiques, qui sont appliquées à la surface de la gélose préalablementensemencée avec un inoculum de la souche à étudier.

Après incubation à 37°C pendant 18-24 heures, faire la lecture de la CMI. L'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par une ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette déterminent la CMI. Une échelle de lecture imprimée sur la bandelette a permis une interprétation rapide, en s'aidant des valeurs fournies par la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) qui sont des valeurs critiques qui délimitent chaque antibiotique.

Pour l'étude des associations d'antibiotiques par cette technique, les bandelettes *E-test*<sup>®</sup> sont placées en formant un angle de 90° sur la gélose préalablementensemencée avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation à 37°C pendant 18-24 heures, une zone d'inhibition sera formée à l'intersection des deux bandelettes et permettra de définir les effets d'interaction de l'association (Cf. figures 1-4).



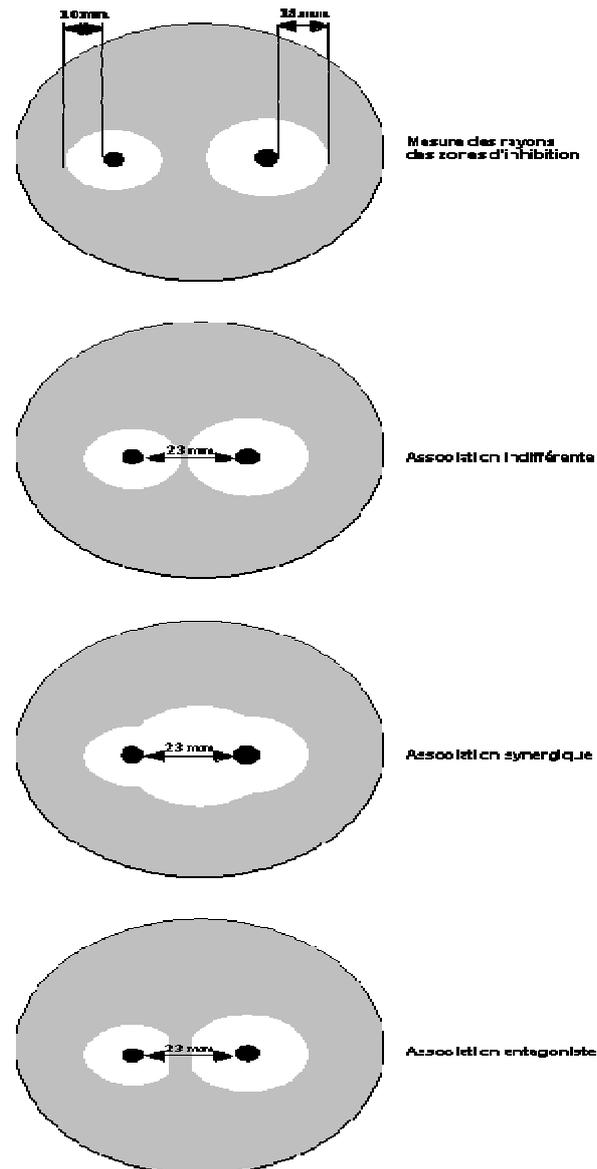
**Figure 1:** Technique de diffusion sur gélose par la bandelette E-test<sup>®</sup>

### V.1.2 Techniques simplifiées d'étude par diffusion

Deux techniques qualitatives permettent une évaluation des effets bactériostatiques des associations d'antibiotiques:

- Le placement rapproché de deux disques, à la surface d'un milieu gélosé, permet de détecter les synergies ou les antagonismes les plus nets (Cf. figure 6).

Avant d'effectuer le test d'association, il convient de mesurer le rayon de chacune des zones d'inhibition. Dans le test proprement dit, la distance entre les disques sera égale ou légèrement supérieure à la somme de ces rayons.



**Figure 2 :** Epreuve de synergie entre deux disques d'antibiotiques

- La disposition à angle droit de deux bandes de papier filtre imprégnées des solutions d'antibiotique permet, après observation de l'angle formé par la rencontre des deux zones d'inhibition, de déterminer l'effet de l'association (Cf. figures 1-4).

## **V.2 Techniques d'étude par dilution en milieu liquide**

### **V.2.1 Technique de « schéma triangulaire »**

Une même quantité de bouillonensemencée avec la souche bactérienne à étudier à une concentration de l'ordre de  $10^6$  bactéries /ml est répartie dans une série de tubes disposés selon un "schéma triangulaire". Dans chaque tube, une gamme de dilution d'antibiotiques préparés est répartie, et permet de réaliser les concentrations désirées des antibiotiques à étudier, isolément et en association. Ces concentrations sont comprises dans les limites des concentrations humorales efficaces établies pour chacun des antibiotiques.

Après 18-24 heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , le décompte des germes survivants, dans chaque tube ne présentant pas de culture visible permet de déterminer l'effet bactériostatique et une action bactéricide des antibiotiques isolés et de leur association. Le pourcentage de germes survivants est déterminé par comparaison de la densité des colonies de germes survivants aux antibiotiques à la densité des colonies obtenues avec l'inoculum initial (témoin inoculum).

### **V.2.2 Technique de "l'échiquier" [14]**

Cette méthode permet de quantifier l'interaction de deux antibiotiques A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentrations A et B. Les concentrations des deux antibiotiques utilisés représentent habituellement une progression géométrique de raison 2 ; des dilutions de raison 1,5 peuvent être nécessaires à une quantification plus précise des interactions.

Ainsi, les différentes concentrations de chaque antibiotique A et B sont associées entre elles deux à deux. Chaque concentration d'un antibiotique est associée à chacune des concentrations de l'autre antibiotique. Après ensemencement de la souche étudiée et après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 heures, les concentrations pour lesquelles se produisent une inhibition de la croissance bactérienne, c'est-à-dire l'effet bactériostatique est noté et les interactions entre les antibiotiques associés sont déterminées par les calculs de FIC index (Fraction de Concentration Inhibitrice).



**DEUXIEME PARTIE :**  
**TRAVAIL EXPERIMENTAL**

## I. Cadre de l'étude

Cette étude a été réalisée à l'Unité de Recherche d'Expertise et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le DANTEC de Dakar.

## II. Objectifs

Les objectifs de l'étude étaient de:

- Valider la méthode de la technique de dilution pour étudier une association d'antibiotiques
- Etudier deux associations d'antibiotiques testés sur trois souches bactériennes isolées d'infections respiratoires.

## III. Souches bactériennes étudiées

Trois souches de bacilles à Gram négatif (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*) isolées d'infections respiratoires et deux souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ont été utilisées durant notre étude.

## IV. Matériel

### IV.1 Matériel et réactifs de laboratoire

- Pots stériles de 50 ml
- Écouvillons stériles
- Eau physiologique
- Agitateur type vortex
- Centrifugeuse
- Embouts stériles (1000µl, 200µl, 50µl)
- Micropipettes (1000µl, 500µl, 200µl, 100µl, 50µl)
- Tubes stériles « FALCON » de 5ml à 10ml
- Microscope optique
- Etuve
- Balance de précision ( $10^{-4}$  gramme)
- Anse calibrée de 10µl
- Congélateur
- Densitomètre

- Huile à immersion
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Papier buvard
- Gélose CLED
- Gélose MH
- Boîtes de Pétri (carrée de 120mm et ronde de 90mm)
- Disques d'oxydase
- Eau oxygénée
- Portoir réduit pour identification des bacilles à gram négatif, constitué de:
  - Milieu Kligler-Hajna
  - Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate
  - Milieu Citrate de Simmons
  - Milieu Urée-Tryptophane
- Disques d'antibiotiques (Cf. la liste des antibiotiques testés)
- Antibiotiques en poudre
- Plaques de micro-titration de 96 cupules
- Pied à coulisse
- Multi-pipettes
- Cryotubes
- Extrait de levure
- Glucose
- Glycérol
- Lait écrémé
- Plan et portoir de rangement

#### **IV.2 Matériel d'exploitation des résultats**

Les logiciels WHONET 5.6 et Microsoft Excel ont servi à l'analyse des résultats.

## V. Méthodologie

### V.1 Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

#### V.1.1 Antibiogramme standard

##### • Mode opératoire

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues à partir d'une culture pure de 18-24 heures, il a été ajusté à l'étalon 0,5 sur l'échelle de Mc Farland. L'ensemencement a été fait par écouvillonnage sur le milieu gélosé de Mueller Hinton. Les disques d'antibiotiques ont été appliqués à la surface de la gélose et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les diamètres de la zone d'inhibition pour chaque antibiotique ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse permettant de catégoriser les germes en souche sensible, intermédiaire ou résistante selon les recommandations de CA-SFM.

#### V.1.2 Méthode d'étude des associations d'antibiotiques

Le pouvoir synergique de deux associations d'antibiotiques a été déterminé par la technique dite de «l'Echiquier». Elle consiste à étudier différentes concentrations de deux antibiotiques seuls et associés.

##### • Détermination de la CMI

Pour étudier une association d'antibiotiques, il faudra d'abord déterminer les CMI des antibiotiques tests.

Nous avons préparé dans une série de cupules contenant 100 µl de bouillon MH, une gamme de concentrations croissantes de l'antibiotique à tester à l'exception de la première qui a servi de témoin. Une même quantité d'un inoculum bactérien avec une opacité correspondant à 0,5 sur l'échelle de Mc-Farland a été répartie dans chaque cupule. Après incubation à 37° C pendant 18-24 heures, la première cupule dans laquelle il n'y a pas de culture visible indique la CMI qui est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18-24 heures d'incubation à 37°C.

## - Mode opératoire d'une association d'antibiotiques

### • Préparation de la solution d'antibiotique

Nous avons fixé la plus forte concentration de l'antibiotique A à 16 fois la CMI de A, et la plus forte concentration de l'antibiotique B à 8 fois la CMI de B, en fonction des profils de sensibilité des souches pathogènes sur lesquelles a porté notre étude.

Ainsi, deux solutions en bouillon de MH de chaque antibiotique sont préparées : la première solution contient 4 fois la concentration maximale à étudier (soit 64 fois la CMI pour l'antibiotique A et 32 fois pour l'antibiotique B) et la deuxième à 2 fois la concentration maximale à étudier (soit 32 fois la CMI pour l'antibiotique A et 16 fois la CMI pour l'antibiotique B).

### • Préparation des gradients de concentration dans la microplaque

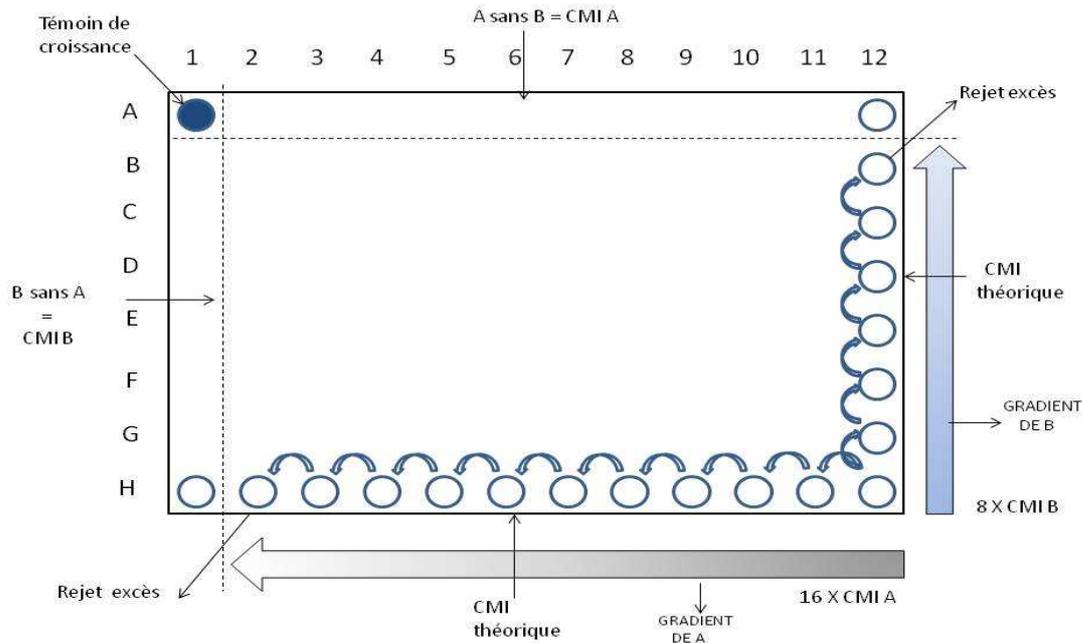
Nous avons distribué à l'aide de la micropipette multiple 100  $\mu$ l de bouillon MH dans toutes les cupules excluant la rangée A et la colonne 1.

100  $\mu$ l de la solution d'antibiotique A à 4 fois la concentration maximale désirée sont répartis dans les cupules de H à B de la colonne 12 ; le contenu des cupules de la colonne 12 est alors dilué de moitié jusqu'à la colonne 2.

La gamme de dilution de l'antibiotique B est préparée dans le replicateur de la même façon en excluant la rangée A et la colonne 1. Le dépôt est effectué dans les cupules de la rangée H avec une dilution de H à B. Une fois ces opérations de dilution terminées ; le contenu du replicateur est transféré dans la microplaque. Les gammes de concentration de l'antibiotique B se mélangent à celles de A. Après vidange complète du replicateur, chaque cupule de la microplaque contient un volume final de 200  $\mu$ l.

Les puits de colonne 1 et de la rangée A sont ensuite remplis à 100 $\mu$ l de bouillon MH. Puis 100 $\mu$ l de l'antibiotique B à 2 fois la concentration finale maximale, sont déposés dans la cupule H de la colonne 1 où est effectuée une dilution de raison 2 jusqu'à la cupule B. Les 100  $\mu$ l en excès sont rejetés. Il est procédé de la même sorte avec l'antibiotique A sur la rangée A de la cupule 12 jusqu'à la cupule 2. La cupule A1 reste libre et reçoit 100 $\mu$ l de bouillon MH sans antibiotique et sert de témoin de culture.

Ainsi, dans les 96 puits de la microplaque, chacune des dilutions de l'un des antibiotiques est réparti seul ou en association avec chacune des dilutions de l'autre antibiotique. Les gammes de concentration sont réalisées selon une progression géométrique de raison 2 et le volume final dans chaque cupule est de 200 $\mu$ l (*Cf. figure 7*).



**Figure 3:** Représentation schématique de la technique de l'échiquier

- **Préparation, inoculation et incubation bactériennes**

L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18-24 heures avec de l'eau physiologique afin d'obtenir une suspension d'opacité équivalente à 0,5 Mac Farland. A l'aide d'une pipette multicanaux ajustée à 10  $\mu$ l, prélever l'inoculum bactérien préparé puis distribuer dans les 96 cupules de la microplaque ; puis homogénéiser et incuber à l'étuve à 37°C pendant 18-24 heures.

- **Lecture**

Une cupule est considérée positive lorsque le milieu devient trouble, signe d'une croissance bactérienne. En cas d'inhibition, il n'y a aucune modification du bouillon.

- **Interprétation**

Dans chaque rangée et dans chaque colonne, les plus faibles concentrations inhibitrices (CI) de chaque antibiotique sont relevées et rapportées à la CMI, ce qui permet de définir un FIC index =  $CI/CMI$  des deux antibiotiques en association qui est égal à :

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

- Le FIC index : la somme des FIC des deux antibiotiques (A et B) associés
- CI (A/B) : la plus faible concentration inhibitrice de A en combinaison avec B
- CI (B/A) : la plus faible concentration inhibitrice de B en combinaison avec A
- CMI (A) : la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique A
- CMI (B) : la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique B

Cet index est calculé dans chaque rangée, mais seul le FIC index le plus bas est considéré comme caractéristique de l'association. Pour que l'association soit considérée comme synergique, il faut que le FIC index soit  $\leq 0,75$ .

Ainsi, pour chaque souche étudiée, la valeur de FIC index a permis de définir les interactions des antibiotiques dans les cupules où il n'y a pas de culture (*Cf. tableau I*).

**Tableau I:** Interprétation des interactions des associations d'antibiotiques

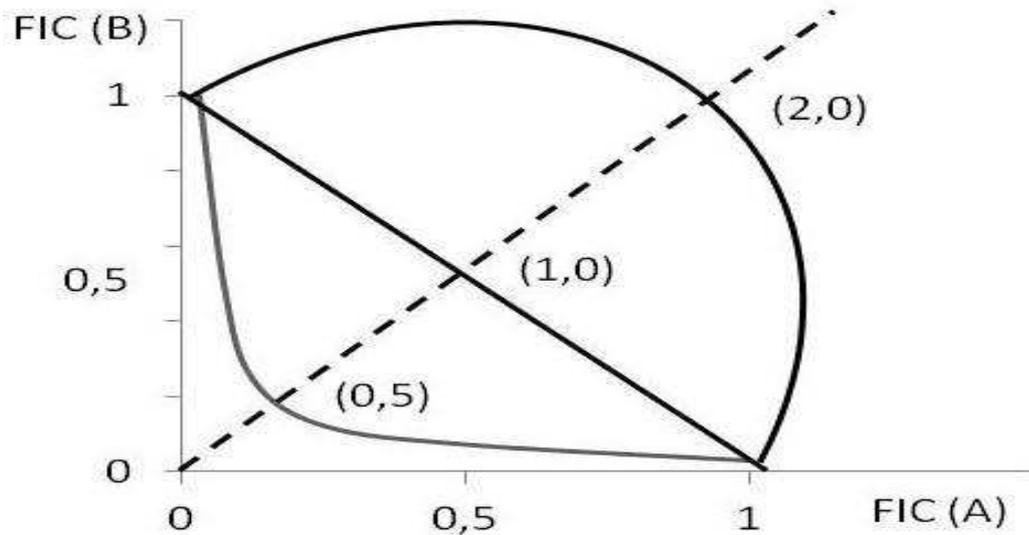
Valeurs de FIC index	Types d'association
FIC index $\leq 0,5$	<b>Synergie totale</b>
$0,5 < \text{FIC index} \leq 0,75$	<b>Synergie partielle</b>
$0,75 < \text{FIC index} \leq 1$	<b>Addition</b>
$1 < \text{FIC index} \leq 2$	<b>Indifférence</b>
FIC index $> 2$	<b>Antagonisme</b>

Les associations d'antibiotiques suivantes ont été testées :

- ciprofloxacine et ceftazidime
- ciprofloxacine et gentamicine

- **Elaboration de l'isobologramme**

Une représentation graphique de l'activité de l'association des antibiotiques dite Isobologramme peut être faite. C'est une courbe qui est obtenue en portant sur l'axe des abscisses, le FIC (A) et sur l'axe des ordonnées le FIC (B) (Cf. *figure 8*).



**Figure 4:** Traduction graphique de FIC index (Isobologramme)

## V.2 Contrôle de qualité

Dans cette étude, nous avons utilisé les souches de référence d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 conformément aux normes recommandées par la CLSI.

# **RESULTATS**

## VI. Résultats

### VI.1 Profils de sensibilité des trois souches pathogènes

Les profils de sensibilité des souches ont été déterminés par la méthode standard de l'antibiogramme suivant les recommandations de CLSI. Les souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 nous ont permis de valider notre technique d'antibiogramme et l'efficacité des disques d'antibiotiques utilisés.

**Tableau II:** Résultats de l'antibiogramme standard des trois souches bactériennes

Antibiotiques	Souches identifiées		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pipéracilline	R	S	R
Amoxicilline +Acide clavulanique	R	-	S
Ticarcilline +Acide clavulanique	R	S	R
Cefuroxime	R	-	R
Céfotaxime	R	-	R
Céftazidime	R	S	S
Ceftriaxone	R	-	-
Aztréonam	I	S	R
Cefépime	R	S	R
Gentamicine	R	S	S
Kanamicine	R	-	-
Amikacine	S	S	S
Netilmicine	S	S	S
Ciprofloxacine	R	S	S
Lévofloxacine	S	S	S
Chloramphénicol	R	-	-
Colistine	S	S	S

S : Sensible ; I : Intermédiaire ; R : Résistant

## VI.2 Résultats de l'antibiogramme et des CMI des souches étudiées

## VI.2.1 Diamètres et CMI des souches étudiées

**Tableau III:** Résultats de la souche de *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiotiques	Diamètres obtenus		Diamètres critiques (mm) [EUCAST]		CMI obtenues (µg/ml)	CMI critiques (µg/ml) [EUCAST]	
	mm	S, R, I	R	S		S	R
CAZ	16	R	< 19	≥ 22	16	≤ 0,5	> 1
CIP	18	R	< 19	≥ 22	8	≤ 1	> 4
GEN	7	R	< 14	≥ 17	> 32	≤ 2	> 4

**Tableau IV:** Résultats de la souche d'*Enterobacter aerogenes*.

Antibiotiques	Diamètres obtenus		Diamètres critiques (mm) [EUCAST]		CMI obtenues (µg/ml)	CMI critiques (µg/ml) [EUCAST]	
	mm	S, R, I	R	S		S	R
CAZ	26	S	< 19	≥ 22	1	≤ 0,5	> 1
CIP	26	S	< 19	≥ 22	0,25	≤ 1	> 4
GEN	18	S	< 14	≥ 17	2	≤ 2	> 4

**Tableau V :** Résultats de la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

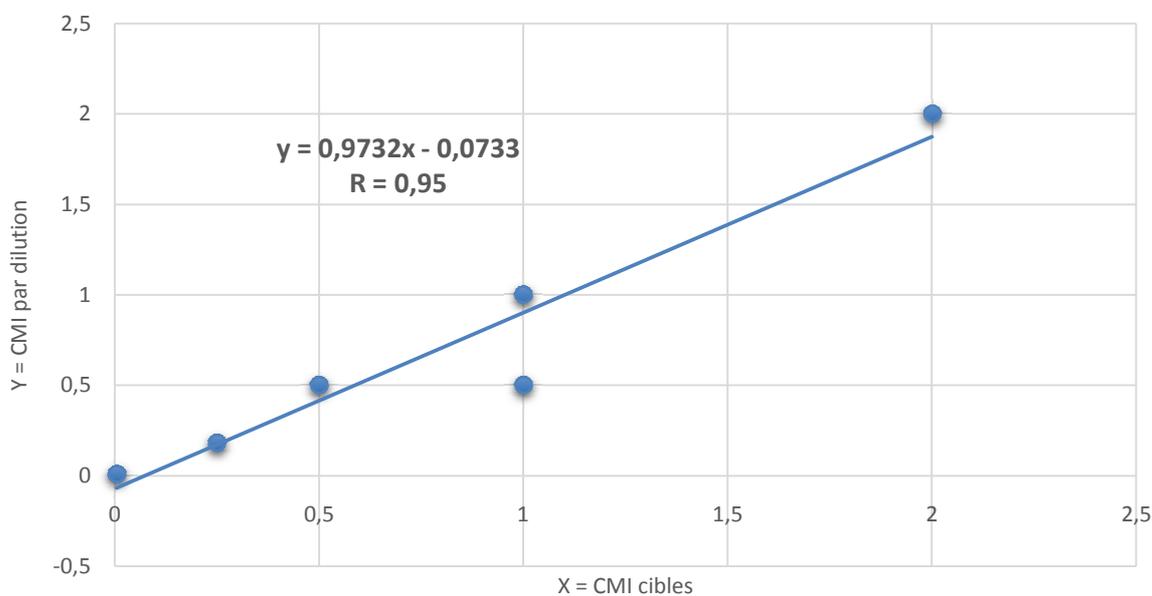
Antibiotiques	Diamètres obtenus		Diamètres critiques (mm) [EUCAST]		CMI obtenues (µg/ml)	CMI critiques (µg/ml) [EUCAST]	
	mm	S, R, I	R	S		S	R
CAZ	26	S	< 16	≥ 16	2	≤ 8	> 8
CIP	32	S	< 22	≥ 25	0,25	≤ 0,5	> 1
GEN	17	S	< 15	≥ 15	4	≤ 4	> 4

### VI.3 Validation de la détermination des CMI par la méthode de dilution

#### VI.3.1 Corrélation entre les CMI obtenues et les CMI cibles des souches de référence.

**Tableau VI** : Résultats des CMI obtenues par dilution comparés aux valeurs cibles (EUCAST).

Souches	Antibiotiques	CMI (µg/ml)	CMI cibles (µg/ml)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	CAZ	0,25	0,18
	CIP	0,005	0,008
	GEN	1	0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CAZ	2	2
	CIP	0,5	0,5
	GEN	1	1

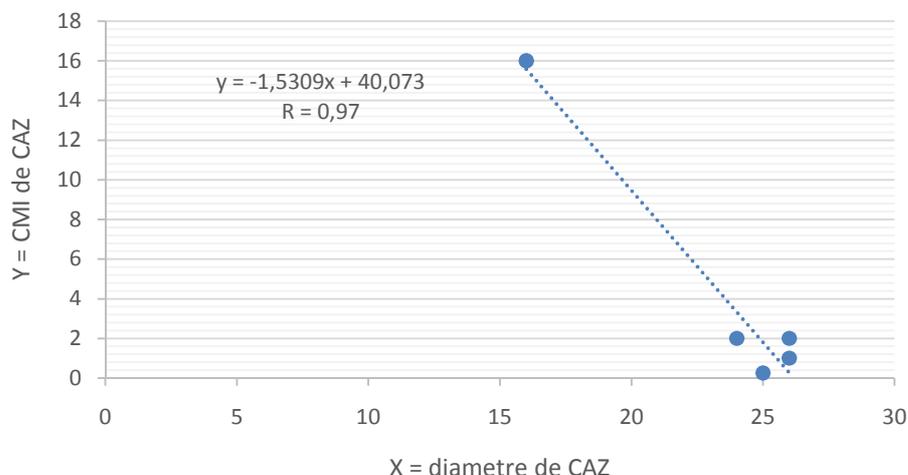


**Figure 5** : Corrélation entre les CMI obtenues par la méthode de dilution et les CMI cibles.

La corrélation entre les valeurs de CMI obtenues par la méthode de dilution et les valeurs de CMI cibles des souches de référence est très bonne.

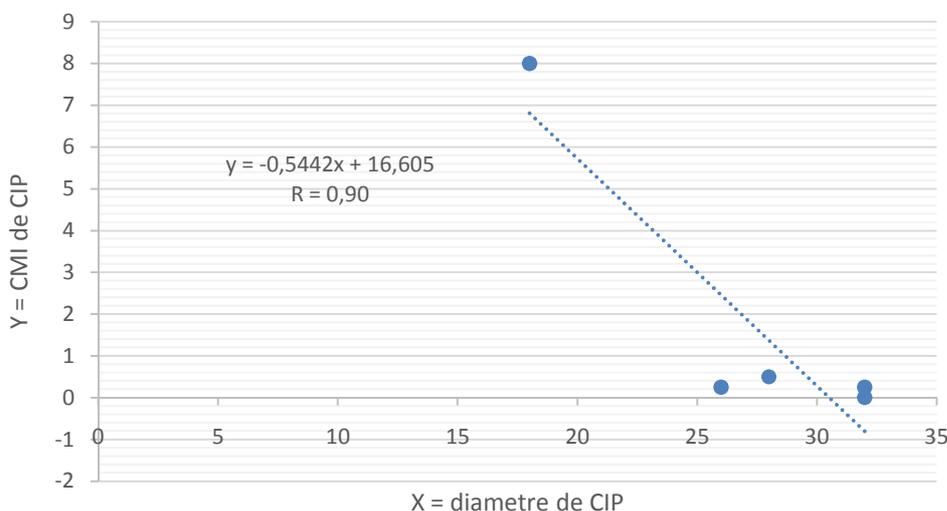
L'équation de la droite de régression est sous la forme  $y = 0,9732x - 0,0733$ , avec  $r = 0,95$ .

**VI.3.2 Corrélation entre les CMI obtenues par la méthode de dilution et les diamètres obtenus par l’antibiogramme standard**



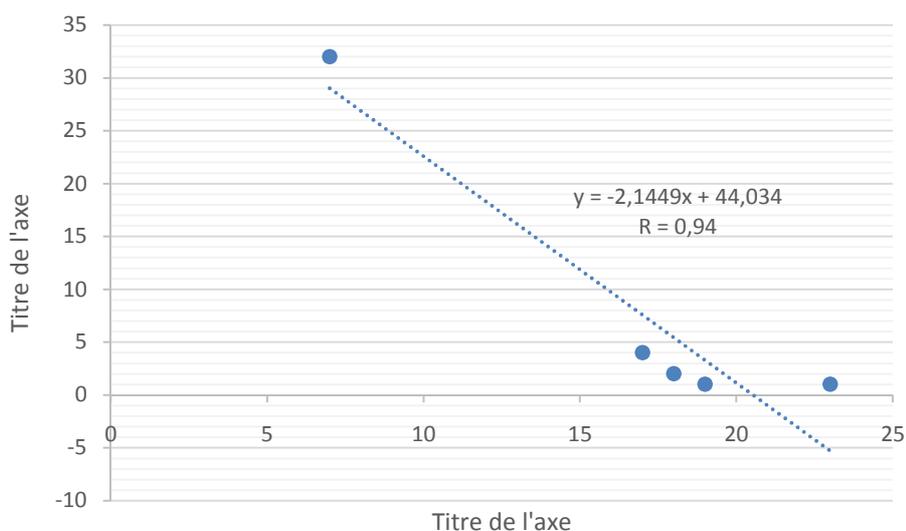
**Figure 6 :** Corrélation négative des résultats de diamètres de l’antibiogramme et des CMI obtenus avec la ceftazidime.

La corrélation des diamètres et des CMI obtenues étaient très bonne, avec  $r = 0,97$ .



**Figure 1 :** Corrélation négative des résultats de diamètres de l’antibiogramme et des CMI obtenus avec la ciprofloxacine.

La corrélation des diamètres et des CMI obtenues étaient très bonne, avec  $r = 0,90$ .



**Figure 2** : Corrélation négative des résultats de diamètres de l'antibiogramme et des CMI obtenus avec la gentamicine.

La corrélation des diamètres et de CMI obtenues étaient très bonne, avec  $r = 0,94$ .

La corrélation entre les valeurs des CMI obtenues par la méthode de dilution et les valeurs des diamètres trouvés par l'antibiogramme standard est bonne. Sur les trois molécules testées nous avons obtenu des coefficients de corrélation supérieurs à 0,8; avec respectivement,  $r = 0,97$  pour la ceftazidime,  $r = 0,90$  pour la ciprofloxacine et  $r = 0,94$  pour la gentamicine.

Les profils de sensibilité obtenus avec les souches étudiées étaient identiques pour les deux méthodes. Ainsi, les CMI obtenues ont été utilisées comme base de calcul pour faire les associations entre ces différentes molécules.

### VI.4 Sensibilité des souches aux différentes associations d'antibiotiques

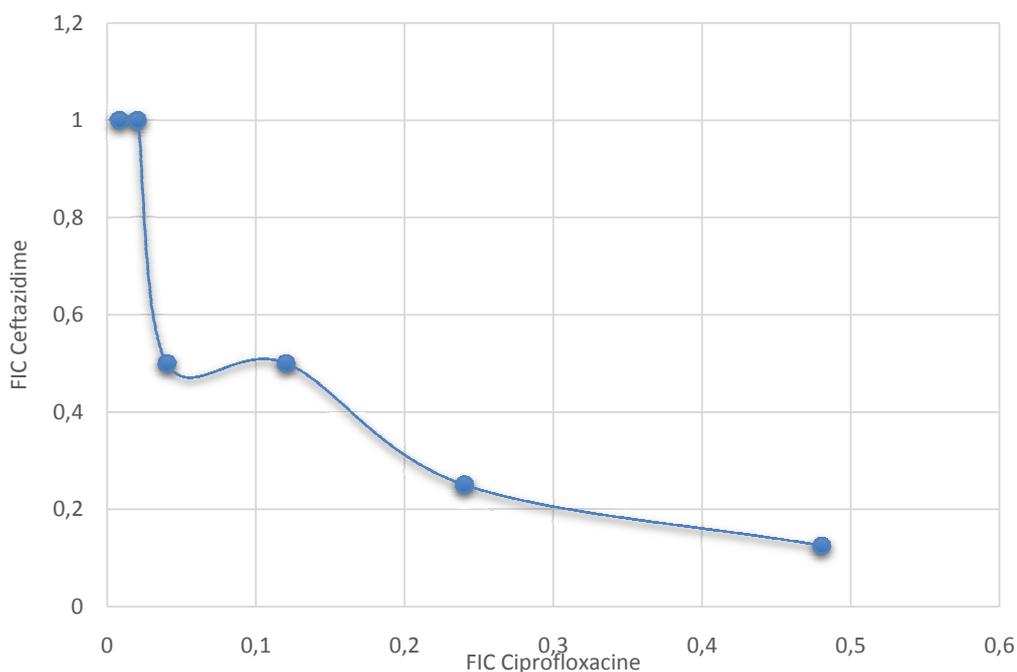
#### VI.4.1 Sensibilité des souches à l'association ciprofloxacine-ceftazidime

**Tableau VII** : Sensibilité de la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 à l'association CIP-CAZ.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,25	2	0,12	0,25	0,48	0,125	0,605	Synergie partielle
0,25	2	<b>0,06</b>	<b>0,5</b>	<b>0,24</b>	<b>0,25</b>	<b>0,49</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	2	0,03	1	0,12	0,5	0,62	Synergie partielle
0,25	2	0,01	1	0,04	0,5	0,54	Synergie partielle
0,25	2	0,005	2	0,02	1	1,02	Indifférence
0,25	2	0,002	2	0,008	1	1,008	Indifférence

A = ciprofloxacine ; B = ceftazidime

L'association des deux antibiotiques CIP-CAZ était très active sur la souche de *P.aeruginosa* ATCC 27853 (synergie totale).

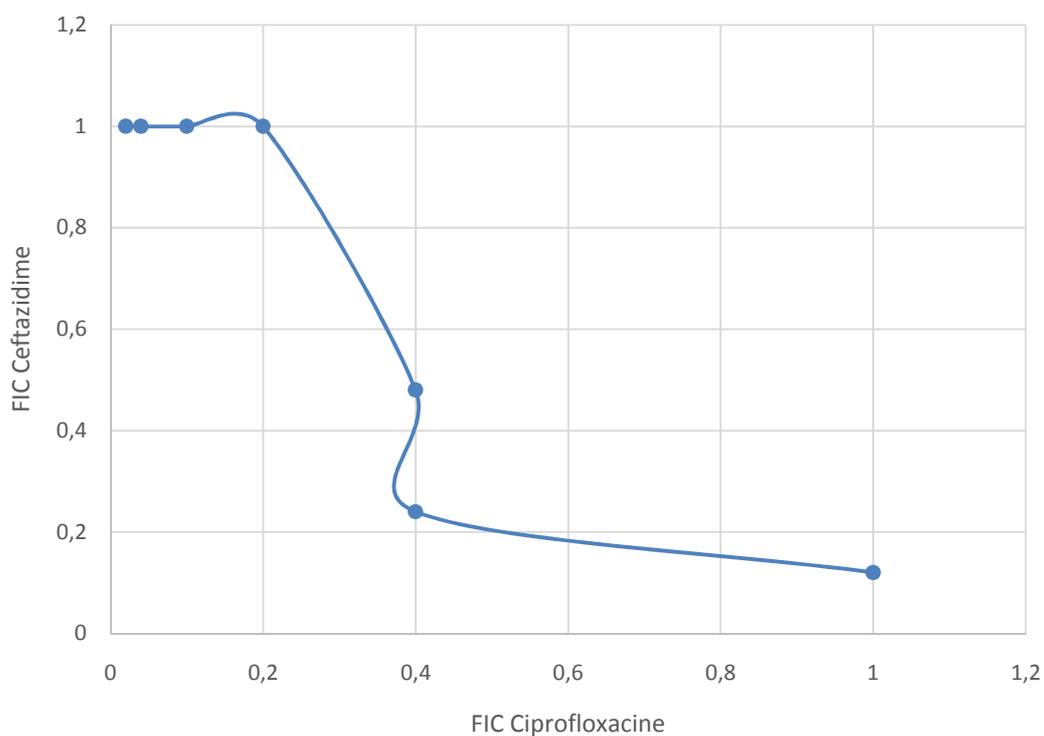


**Figure 9** : Courbe de synergie totale de l'association CIP-CAZ sur la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Tableau VIII :** Sensibilité de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 à l'association CIP-CAZ.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,005	0,25	0,005	0,03	1	0,12	1,12	Indifférence
0,005	0,25	<b>0,002</b>	<b>0,06</b>	<b>0,4</b>	<b>0,24</b>	<b>0,64</b>	<b>Synergie partielle</b>
0,005	0,25	0,002	0,12	0,4	0,48	0,88	Addition
0,005	0,25	0,001	0,25	0,2	1	1,2	Indifférence
0,005	0,25	0,0005	0,25	0,1	1	1,1	Indifférence
0,005	0,25	0,0002	0,25	0,04	1	1,04	Indifférence
0,005	0,25	0,0001	0,25	0,02	1	1,02	Indifférence

L'association des antibiotiques CIP-CAZ sur la souche *d'E. coli* ATCC 25922 n'était pas totalement efficace (synergie partielle).



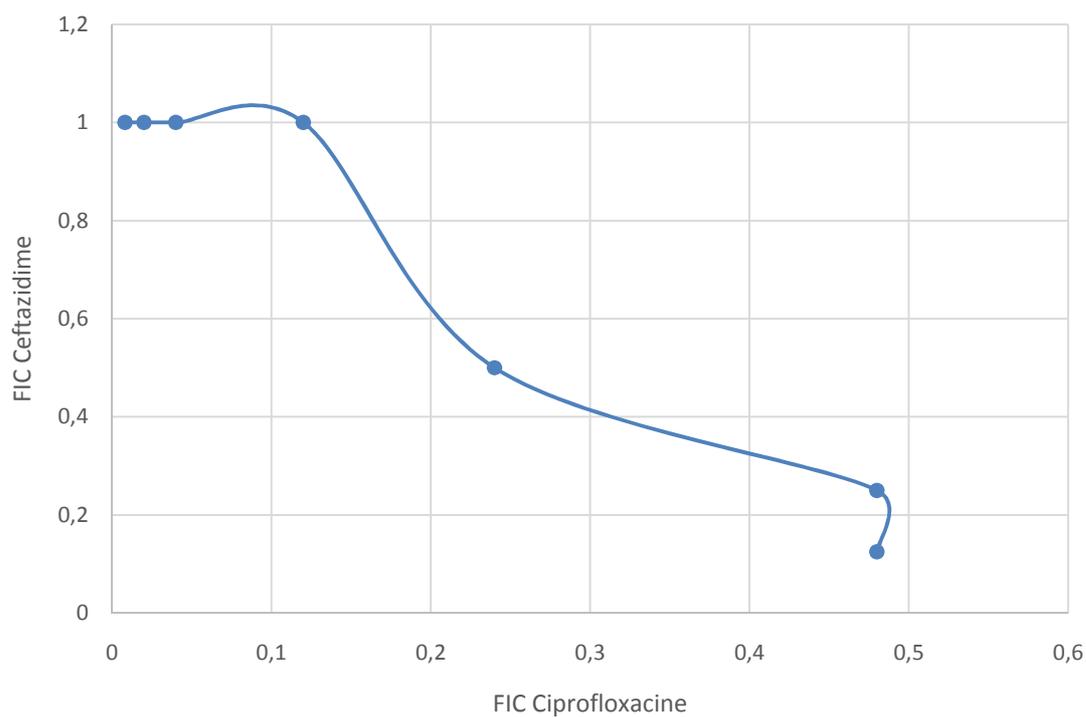
**Figure 10 :** Courbe de synergie partielle de l'association CIP-CAZ sur la souche *d'E.coli* ATCC 25922.

**Tableau IX :** Sensibilité de la souche de *P. aeruginosa* à l'association CIP-CAZ.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,25	2	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,48</b>	<b>0,125</b>	<b>0,605</b>	<b>Synergie partielle</b>
0,25	2	<b>0,12</b>	<b>0,5</b>	<b>0,48</b>	<b>0,25</b>	<b>0,73</b>	<b>Synergie partielle</b>
0,25	2	<b>0,06</b>	<b>1</b>	<b>0,24</b>	<b>0,5</b>	<b>0,74</b>	<b>Synergie partielle</b>
0,25	2	0,03	2	0,12	1	1,12	Indifférence
0,25	2	0,01	2	0,04	1	1,04	Indifférence
0,25	2	0,005	2	0,02	1	1,02	Indifférence
0,25	2	0,002	2	0,008	1	1,008	Indifférence

L'association des antibiotiques CIP-CAZ sur la souche de *P. aeruginosa*

n'était pas totalement efficace (synergie partielle).



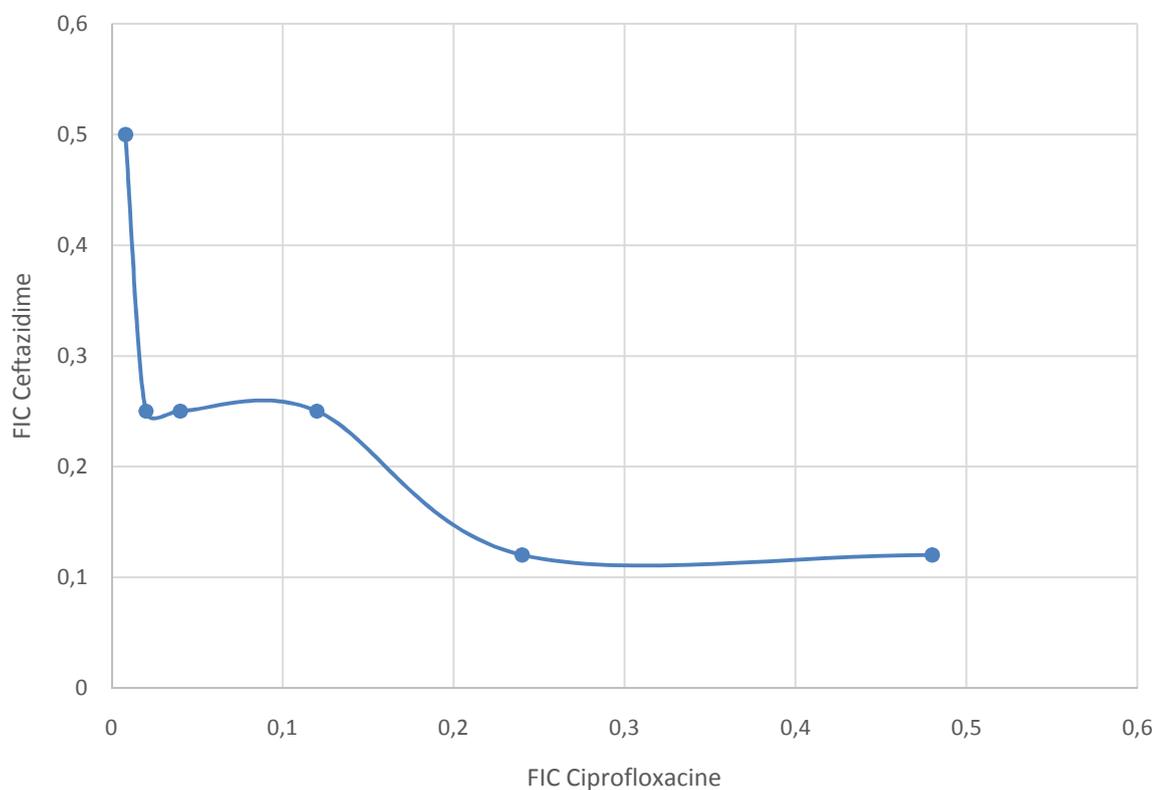
**Figure 11 :** Courbe de synergie partielle de l'association CIP-CAZ sur la souche de

*P. aeruginosa*.

**Tableau X :** Sensibilité de la souche d'*Enterobacter aerogenes* à l'association CIP-CAZ.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,25	1	0,12	0,12	0,48	0,12	0,6	Synergie partielle
0,25	1	<b>0,06</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>	<b>0,12</b>	<b>0,36</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	1	<b>0,03</b>	<b>0,25</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,37</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	1	<b>0,01</b>	<b>0,25</b>	<b>0,04</b>	<b>0,25</b>	<b>0,29</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	1	<b>0,005</b>	<b>0,25</b>	<b>0,02</b>	<b>0,25</b>	<b>0,27</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	1	0,002	0,5	0,008	0,5	0,508	Synergie partielle

L'association des deux antibiotiques CIP-CAZ sur la souche d'*Enterobacter aerogenes* était très active (synergie totale).

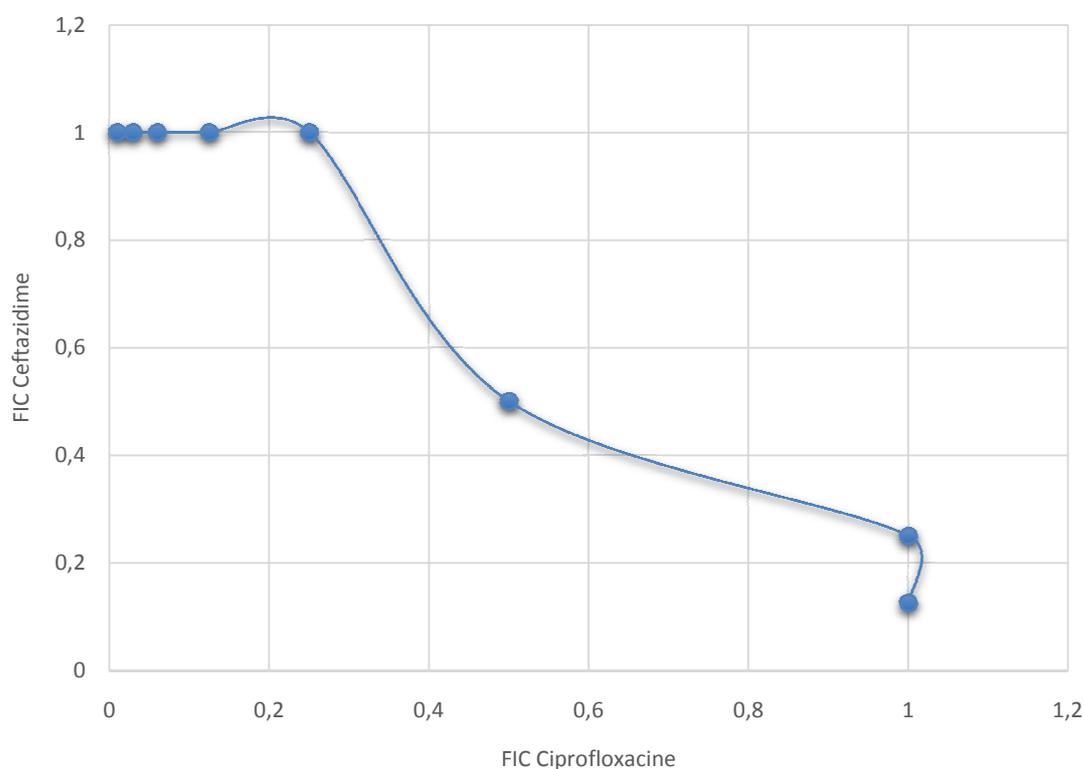


**Figure 12 :** Courbe de synergie totale de l'association CIP-CAZ sur la souche d'*Enterobacter aerogenes*.

**Tableau XI :** Sensibilité de la souche de *K. pneumoniae* à l'association CIP-CAZ.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
8	16	8	2	1	0,125	1,125	Indifférence
8	16	8	4	1	0,25	1,25	Indifférence
8	16	4	8	0,5	0,5	1	Indifférence
8	16	2	16	0,25	1	1,25	Indifférence
8	16	1	16	0,125	1	1,125	Indifférence
8	16	0,5	16	0,0625	1	1,0625	Indifférence
8	16	0,25	16	0,03125	1	1,03125	Indifférence
8	16	0,12	16	0,015	1	1,015	Indifférence

L'association des deux antibiotiques CIP-CAZ était inactive sur la souche de *K. pneumoniae* (indifférence).



**Figure 33 :** Courbe d'indifférence de l'association CIP-CAZ sur la souche de *K. pneumoniae*.

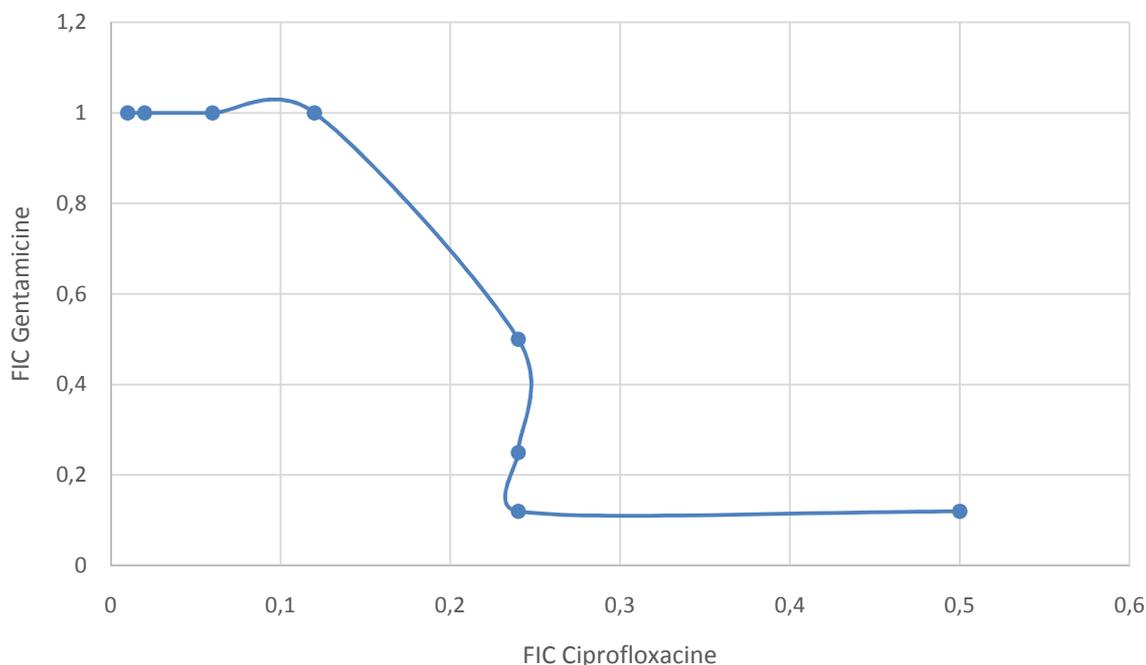
**VI.4.2 Sensibilité des souches à l'association ciprofloxacine-gentamicine**

**Tableau XII :** Sensibilité de la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 à l'association CIP-GEN.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,5	1	0,25	0,12	0,5	0,12	0,62	Synergie partielle
0,5	1	<b>0,12</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>	<b>0,12</b>	<b>0,36</b>	<b>Synergie totale</b>
0,5	1	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,24</b>	<b>0,25</b>	<b>0,49</b>	<b>Synergie totale</b>
0,5	1	0,12	0,5	0,24	0,5	0,74	Synergie partielle
0,5	1	0,06	1	0,12	1	1,12	Indifférence
0,5	1	0,03	1	0,06	1	1,06	Indifférence
0,5	1	0,01	1	0,02	1	1,02	Indifférence
0,5	1	0,005	1	0,01	1	1,01	Indifférence

A = ciprofloxacine ; B = gentamicine

L'association des deux antibiotiques CIP-GEN sur la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 était très active (synergie totale).

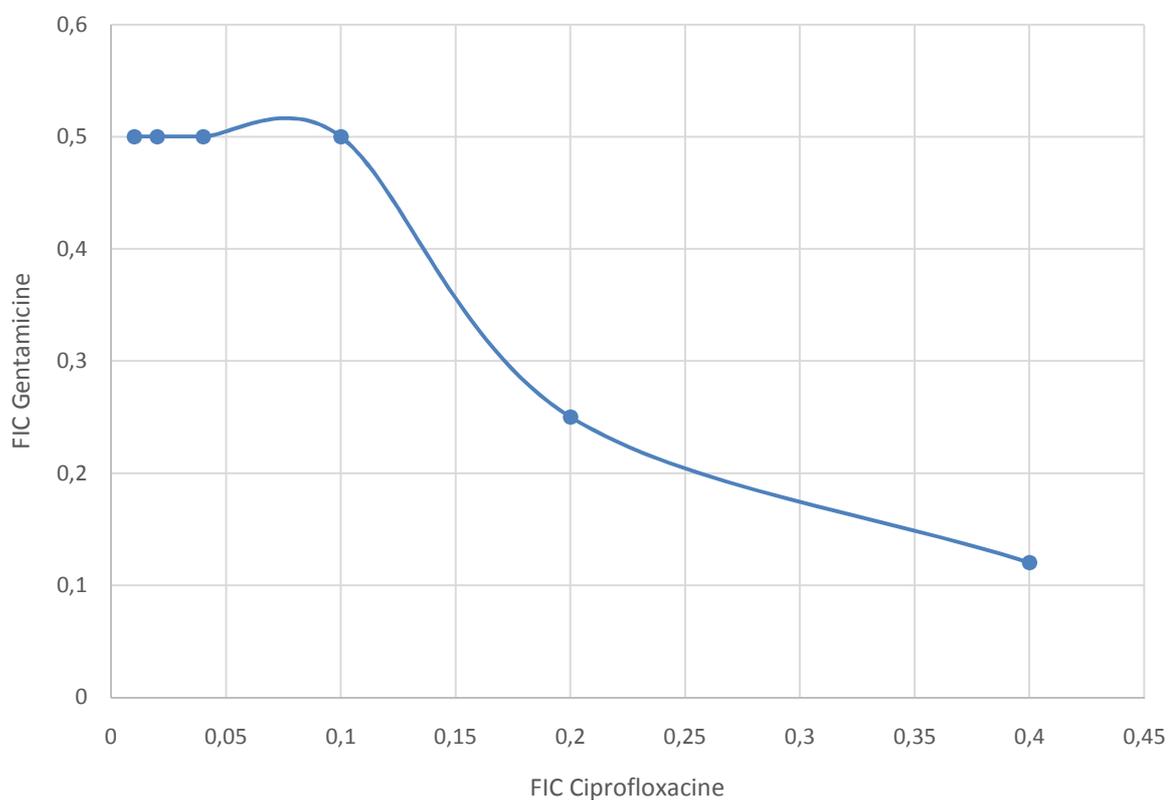


**Figure 14 :** Courbe de synergie totale de l'association CIP-GEN sur la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Tableau XIII** : Sensibilité de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 à l'association CIP-GEN.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,005	1	0,002	0,12	0,4	0,12	0,52	Synergie partielle
0,005	1	<b>0,001</b>	<b>0,25</b>	<b>0,2</b>	<b>0,25</b>	<b>0,45</b>	<b>Synergie totale</b>
0,005	1	0,0005	0,5	0,1	0,5	0,6	Synergie partielle
0,005	1	0,0002	0,5	0,04	0,5	0,54	Synergie partielle
0,005	1	0,0001	0,5	0,02	0,5	0,52	Synergie partielle
0,005	1	0,00005	0,5	0,01	0,5	0,51	Synergie partielle

L'association des deux antibiotiques CIP-GEN sur la souche *d'E. coli* ATCC25922 était active (synergie totale).

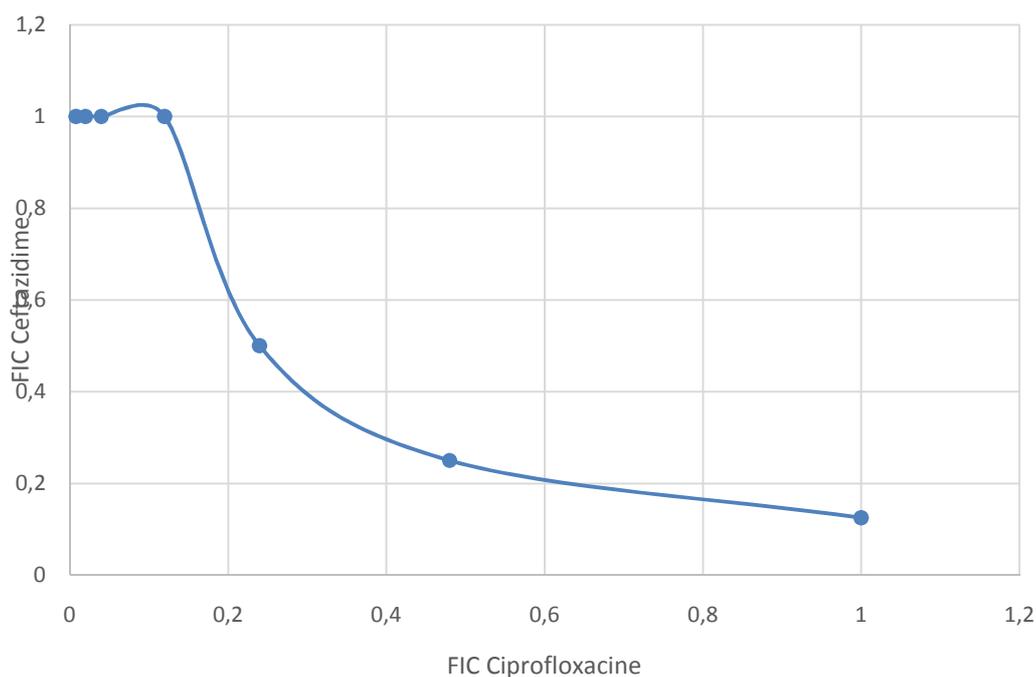


**Figure 15** : Courbe de synergie totale de l'association CIP-GEN sur la souche *d'E. coli* ATCC 25922.

**Tableau 1 :** Sensibilité de la souche de *P. aeruginosa* à l'association CIP-GEN.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,25	4	0,25	0,5	1	0,125	1,125	Indifférence
0,25	<b>4</b>	<b>0,12</b>	<b>1</b>	<b>0,48</b>	<b>0,25</b>	<b>0,73</b>	<b>Synergie partielle</b>
0,25	<b>4</b>	<b>0,06</b>	<b>2</b>	<b>0,24</b>	<b>0,5</b>	<b>0,74</b>	<b>Synergie partielle</b>
0,25	4	0,03	4	0,12	1	1,12	Indifférence
0,25	4	0,01	4	0,04	1	1,04	Indifférence
0,25	4	0,005	4	0,02	1	1,02	Indifférence
0,25	4	0,002	4	0,008	1	1,008	Indifférence

L'association des deux antibiotiques CIP-GEN n'était pas totalement active sur la souche de *P. aeruginosa* (synergie partielle).

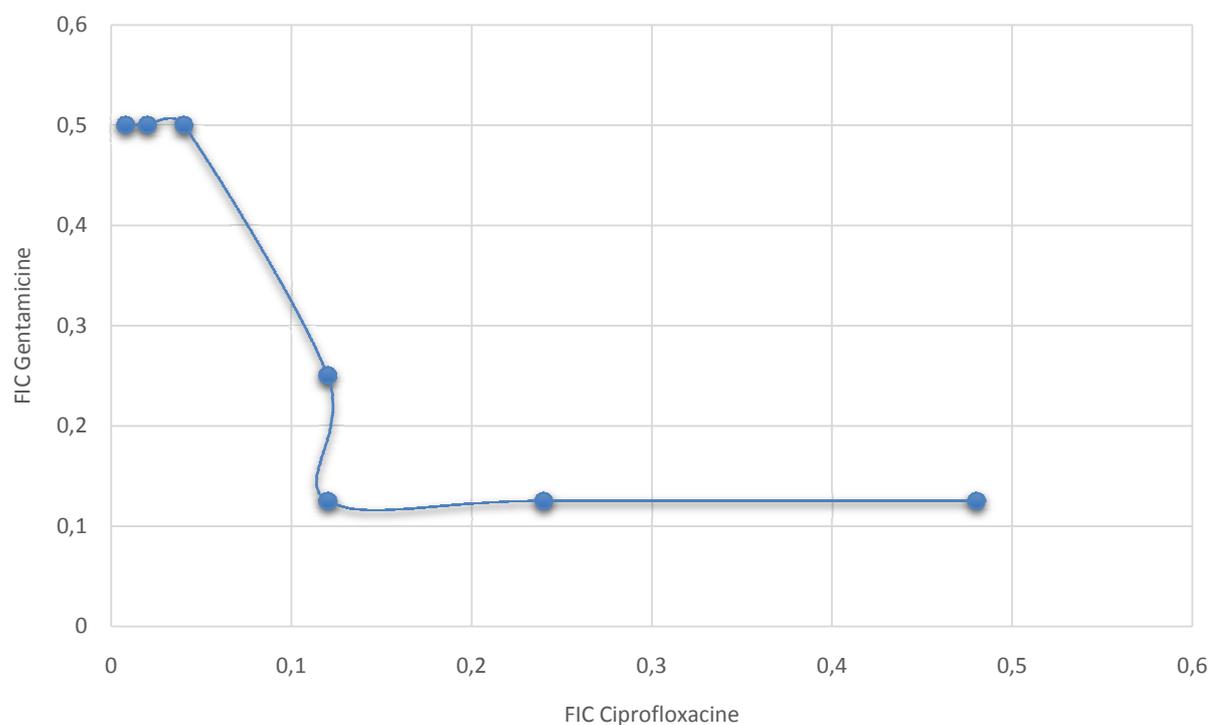


**Figure 16 :** Courbe de synergie partielle de l'association CIP-GEN sur la souche de *P. aeruginosa*.

**Tableau 2 :** Sensibilité de la souche *d'E. aerogenes* à l'association CIP-GEN.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
0,25	2	0,12	0,25	0,48	0,125	0,605	Synergie partielle
0,25	<b>2</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>0,24</b>	<b>0,125</b>	<b>0,365</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	<b>2</b>	<b>0,03</b>	<b>0,25</b>	<b>0,12</b>	<b>0,125</b>	<b>0,245</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	<b>2</b>	<b>0,03</b>	<b>0,5</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,37</b>	<b>Synergie totale</b>
0,25	2	0,01	1	0,04	0,5	0,54	Synergie partielle
0,25	2	0,005	1	0,02	0,5	0,52	Synergie partielle
0,25	2	0,002	1	0,008	0,5	0,508	Synergie partielle

L'association des deux antibiotiques CIP-GEN sur la souche *d'E. aerogenes* est très active (synergie totale).

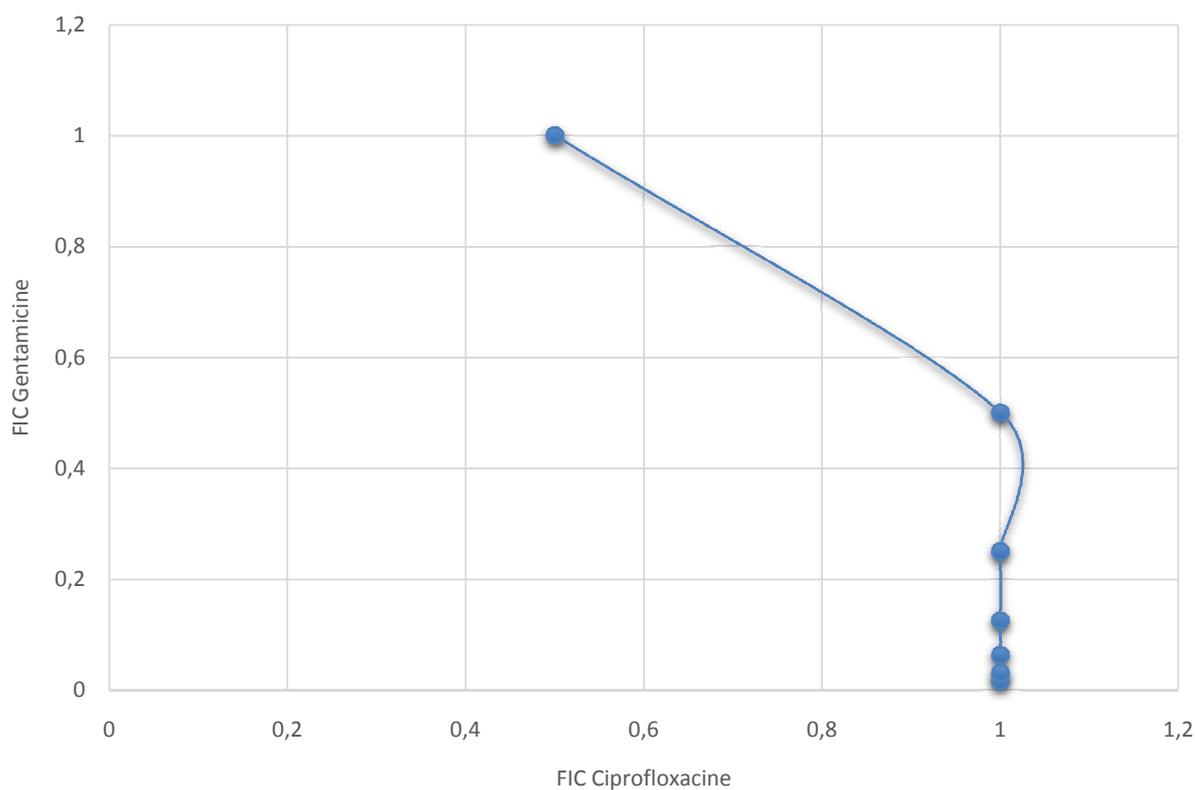


**Figure 17 :** Courbe de synergie totale de l'association CIP-GEN sur la souche *d'E. aerogenes*.

**Tableau 3 :** Sensibilité de la souche de *K. pneumoniae* à l'association CIP-GEN.

CMI A	CMI B	CMI A/B	CMI B/A	FIC A	FIC B	FIC index	Interprétation
8	256	8	4	1	0,016	1,02	Indifférence
8	256	8	8	1	0,031	1,03	Indifférence
8	256	8	16	1	0,063	1,06	Indifférence
8	256	8	32	1	0,125	1,13	Indifférence
8	256	8	64	1	0,25	1,25	Indifférence
8	256	8	128	1	0,5	1,5	Indifférence
8	256	4	256	0,5	1	1,5	Indifférence

L'association des deux antibiotiques CIP-GEN sur cette souche de *K. pneumoniae* était inactive (indifférence).



**Figure 18 :** Courbe d'indifférence de l'association CIP-GEN sur la souche de *K.pneumoniae*.

**Tableau 4 :** Récapitulatif des résultats des associations d'antibiotiques CIP-CAZ et CIP-GEN sur les trois souches bactériennes.

Associations d'antibiotiques	Souches étudiées		
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>CIP-CAZ</b>	Indifférence	<b>Synergie totale</b>	<b>Synergie partielle</b>
<b>CIP-GEN</b>	Indifférence	<b>Synergie totale</b>	<b>Synergie partielle</b>

L'étude des associations d'antibiotiques ciprofloxacine-ceftazidime et ciprofloxacine-gentamicine, ont montré une efficacité totale sur la souche d'*E. aerogenes*, une efficacité partielle sur la souche de *P. aeruginosa* et une indifférence sur la souche de *K. pneumoniae*.



**DISCUSSION**

## VII.DISCUSSION

Cette étude menée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le DANTEC de Dakar a été réalisée sur trois espèces bactériennes isolées d'infections respiratoires (*P.aeruginosa*, *E.aerogenes* et *K.pneumoniae*).

Nous avons utilisé la technique de « l'échiquier » considérée comme la plus fastidieuse à mettre en œuvre, mais qui demeure la plus complète pour étudier les associations d'antibiotiques à temps fixe, et qui n'est pas souvent applicable en microbiologie de routine.

En effet, elle consiste à étudier différentes concentrations d'antibiotiques seules et associées sur les souches bactériennes, et à déterminer les plus faibles concentrations qui entraînent une inhibition de la croissance.

Le choix des antibiotiques utilisés dans les deux associations a été effectué en fonction de la nature des souches bactériennes, plus précisément des résultats de l'antibiogramme standard, de la localisation de l'infection, de leur capacité à diffuser dans le foyer infectieux mais également de la cinétique de la bactéricidie ; d'autant plus que les bêta-lactamines sont des antibiotiques bactéricides temps-dépendant avec une nécessité de répéter les doses au bout d'un certain temps alors que les quinolones et les aminosides sont des antibiotiques bactéricides concentration-dépendant (activité dépendant du pic de concentration *in vivo*).

D'où l'intérêt de les associer parce qu'ils conservent plus longtemps leur activité au foyer infectieux. De plus les bêta-lactamines facilitent l'accès des aminosides à leur cible de par leur action sur la paroi bactérienne [9].

En effet, ces associations sont largement utilisées en thérapeutique anti-infectieuse, précisément dans le protocole de traitement des infections sévères [2]. De nombreuses études ont montré un effet synergique de ces associations d'antibiotiques sur les infections nosocomiales dues aux Entérobactéries [13,15] ou aux *P.aeruginosa* [3,11].

Le nombre de souches pourrait être très limité pour apprécier l'efficacité des deux associations antibiotiques testées. Néanmoins, l'utilisation de cet échantillonnage faible a permis de valider notre méthode avec une très bonne corrélation ( $r = 0,95$ ) des CMI obtenues sur celles attendues (Cf. figure 9 et Tableau VI). Cette corrélation a été également obtenue avec les trois antibiotiques testés sur les souches étudiées ; avec respectivement  $r = 0,97$  pour la ceftazidime,  $r = 0,90$  pour la ciprofloxacine et  $r = 0,94$  pour la gentamicine.

L'étude des associations antibiotiques a montré une différence de sensibilité en fonction des souches.

L'étude de l'association de ciprofloxacine et ceftazidime sur la souche de *P. aeruginosa* a montré, soit une synergie partielle soit une indifférence avec des FIC index compris entre 0,605 et 1,008 (Cf. figure 15 et tableau IX).

Cette association étudiée sur la souche d'*E. aerogenes* a montré, soit une synergie totale soit une synergie partielle avec des FIC index compris entre 0,27 et 0,60 (Cf. figure 16 et tableau X).

Par contre, avec la souche de *K. pneumoniae*, cette association était indifférente avec les FIC index compris entre 1,015 et 1,125 (Cf. figure 17 et tableau XI).

L'association de ciprofloxacine et ceftazidime est une des plus fréquentes dans le traitement de première intention dans les infections nosocomiales en attendant les résultats de l'antibiogramme, surtout si l'espèce *P. aeruginosa* est suspectée [2, 19].

L'inefficacité de cette association sur la souche de *K. pneumoniae* pourrait s'expliquer par la résistance de la souche testée sur les deux antibiotiques (Cf. tableau II) ; contrairement à la souche d'*E. aerogenes* qui était sensible à ces deux antibiotiques séparément.

L'étude de l'association ciprofloxacine et gentamicine sur la souche de *P. aeruginosa* a montré, soit une synergie partielle soit une indifférence avec des FIC index compris entre 0,73 et 1,125 (Cf. figure 20 et tableau XIV) [9].

Cette association était indifférente sur la souche de *K. pneumoniae* avec des FIC index compris entre 1,02 et 1,5 (Cf. figure 22 et tableau XVI).

Cependant avec la souche d'*E. aerogenes* cette association avait une synergie totale ou partielle avec des FIC index compris entre 0,245 et 0,605 (Cf. figure 21 et tableau XV).

Les associations constituées d'un aminoglycoside et d'une fluoroquinolone sont connues synergiques, et sont testées en majorité sur des souches de *P. aeruginosa* et de *K. pneumoniae* isolées d'infections respiratoires particulièrement sur des souches d'origine nosocomiale avec une efficacité plus ou moins observée [15].

Cette association de ciprofloxacine et gentamicine peut être prescrite en première intention au même titre que l'association ciprofloxacine et ceftazidime en fonction du degré de gravité de l'infection à doses optimales en attendant les résultats d'un antibiogramme [19].

L'association ciprofloxacine et gentamicine a montré une efficacité de 41,2% et 51,5% respectivement sur des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* productrices de BLSE isolées de divers prélèvements [19].

Pour la souche de *P. aeruginosa* montrant une synergie partielle aux deux associations testées ; d'autres associations peuvent être étudiées en l'occurrence la combinaison fosfomycine et amikacine, colistine et ciprofloxacine etc [12].

Quant à la souche de *K. pneumoniae* résistante aux deux associations testées, d'autres associations peuvent être proposées à savoir la combinaison d'un carbapénème et de la colistine ou d'un aminoglycoside etc [12].

En réalité, l'utilisation des associations d'antibiotiques dans le traitement d'infection due à une bactérie résistante ou des germes multiples doit prendre en compte les données de résistance locale mais aussi du contexte clinique et de la localisation de l'infection.

## **RECOMMENDATIONS**

Au terme de cette étude quelques recommandations nous semblent indispensables :

- Nécessité de réaliser le diagnostic microbiologique avant toute prescription d'antibiotiques
- Eviter l'utilisation irrationnelle et abusive des antibiotiques, par le respect des posologies et des rythmes d'administration de nature à assurer des concentrations appropriées au site de l'infection
- Recourir aux associations d'antibiotiques pour :
  - Obtenir une bactéricidie accrue au foyer infectieux
  - Elargir le spectre antibactérien pour le traitement d'infections sévères et microbiologiquement non documentées
  - Eviter l'émergence des bactéries résistantes dans le foyer infectieux
- Evaluer périodiquement l'efficacité des protocoles thérapeutiques dans les services cliniques
- Promouvoir la formation initiale et continue adaptée des professionnels de la santé dans l'utilisation des antibiotiques.

## CONCLUSION

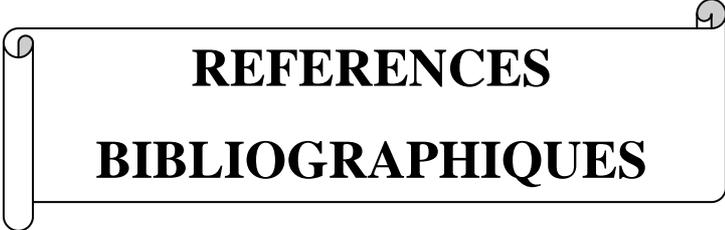
Cette étude menée à l'Unité de Recherche d'expertise et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le DANTEC de Dakar a porté sur deux (02) souches de référence (*E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) et trois (03) souches de bacilles à Gram négatif isolées d'infections respiratoires. Ces souches ont été testées avec deux associations d'antibiotiques :

- Ciprofloxacine-ceftazidime
- et Ciprofloxacine-gentamicine

Les résultats obtenus avec les souches de référence ont permis de valider notre méthode de dilution avec une très bonne corrélation des CMI obtenues sur les CMI attendues.

Les résultats de ces deux associations d'antibiotiques ont montré une très bonne efficacité sur la souche d'*E. aerogenes* (synergie totale), une activité moyenne sur la souche de *P. aeruginosa* (synergie partielle) et une indifférence sur la souche de *K. pneumoniae*. De ce fait, les associations ciprofloxacine-ceftazidime et ciprofloxacine-gentamicine peuvent être une alternative intéressante dans l'antibiothérapie d'infections respiratoires à *E. aerogenes*.

Pour les espèces *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* d'autres associations d'antibiotiques pourraient être testées : aminosides-bêta-lactamines, fluoroquinolones-bêta-lactamines et inhibiteurs de bêta-lactamases.



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**1- Boukadida J., Salem N., Hannachi N., Monastiri K. et Snoussi N.**

Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu.  
*Arch Pédiatr* 2002; 9: 463-8.

**2- Devrim Dundar, Metin Otkun**

*In-vitro* Efficacy of Synergistic Antibiotic Combinations in Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains.  
*Yonsei Med Journal*. 2010 ; 51(1): 111-116.

**3- Faure K., Kipnis K., Guery B.**

Prise en charge des pneumonies liées à *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Rev.Tun. Infectiol.* 2008; 2(1): 1-8.

**4. Foweraker J.E., Laughton C.R., Brown D.F., Bilton D et al.**

Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis  
*Antimicrob Agents Chemotherapy* 2009, 53(11): 4809-4815.

**5- Gangoué Piéboji J., Koulla-Shiro S., Ngassam P., Adiogo D., Njine T.**

Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and out patients at Yaoundé Central Hospital, Cameroon  
*International Journal of Infectious Diseases*, 2004; 8: 147-154.

**6- Lewis R.E., Diekema D.J., Messer S.A., Pfaller M.A., Klepser M.E.**

Comparison of E-test, Checkerboard dilution and Time Kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species  
*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002; 49: 345-351.

**7- Mendelson MH., Gurtman A., Szabo S., Neibart E., Meyers BR., Policar M., Cheung TW, Lillienfeld D, Hammer G, Reddy S, et al.**

*Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS.  
*Clin Infect Dis* 1994; 18(6): 886-95

**8- Montravers P., Fagon JY., Chastre J., Lesco M., Dombret MC., Trouillet JL et al.**

Follow-up protected specimen brushes to assess treatment in nosocomial pneumonia.

*Am Rev Respir Dis* 1993; 147 : 38-44.

**9- Ndongue Biné Mariam.**

Validation d'une méthode d'étude *in vitro* des associations d'antibiotiques sur des souches de bacilles à gram négatif

*Thèse de Pharmacie, DAKAR, 2014 ; n°84.*

**10- Nworu c. S., Esimone C.O.**

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

*Trop J Pharm Research* 2006; 5 (2): 605-11.

**11- Oie S., Fukui Y., Yamamoto M., Masuda Y., et al.**

*In vitro* antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*.

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

**12- Pranita D. Tamma, Sara E. Cosgrove et Lisa L. Maragakis.**

Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria.

*Clin Microbiol Rev* 2012; 25 (3): 450- 470.

**13- Puerto A.S., Fernandez J.G., Castillo J.L., Pine M.J.S., Angulo G.P.**

*In vitro* activity of  $\beta$ -lactam and non  $\beta$ -lactam antibiotics in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli*.

*Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 135–139.

**14- Rand K., Houk H.J., Brown P., Bennet D.**

Reproducibility of the Microdilution Checkerboard method for antibiotic synergy.

*Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (3): 613-15.

**15- Safdar N., Handelsman J., Maki DG.**

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

A meta-analysis

*Lancet Infect Dis* 2004; 4: 519-527.

**16- Seguin P., Mallédant Y.**

Prise en charge des pneumonies communautaires graves.

*In : Sfar, éd. Conférences d'actualisation 2000 ; 685-702.*

**17- Seye G.N.K.**

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

*Thèse de Pharmacie, DAKAR 1993, n°82.*

**18- White R.L., Burgess D.S., Manduru M., Bosso J.A et al.**

Comparison of Three Different *in Vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E-test.

*Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40 (8):1914-18.

**19- Zackaria Al - Muharrmi, Akbar Rafay, Abdullah Balkhair, Ali A. Jabri.**

Antibiotic Combination as Empirical Therapy for Extended Spectrum Beta-Lactamase.

*Ann Burns and Fire Disasters* 2008; 21: 210-218.