

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**  
**FACULTE DE MEDECINE, PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE**



**Année: 2016**

**Numéro: 115**

**ETUDE DE LA VALIDATION DE LA SENSIBILITE DES  
BACILLES A GRAM NEGATIF AVEC LES GALERIES MICRO  
CSB<sup>®</sup>.**

**DOMAINE: SCIENCES, TECHNOLOGIES ET SANTE**  
**MENTION: BIOLOGIE, NUTRITION ET PATHOLOGIE HUMAINE**  
**MEMOIRE DE MASTER II**  
**MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE**

**Présenté et soutenu publiquement**

**Le 30 Juillet 2016**

**Par:**

**Amadou KANE**

---

**Jury**

<b>Président</b>	M <sup>r</sup>	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur
<b>Membre</b>	M <sup>me</sup>	Ndeye Coumba TOURE	KANE	Professeur
	M <sup>r</sup>	Makhtar	CAMARA	Professeur
	M <sup>me</sup>	Halimatou DIOP	NDIAYE	Professeur
<b>Directeur de mémoire</b>	M <sup>r</sup>	Abdoulaye	SECK	Maitre-Assistant

## **IN MEMORIUM**

### **A Mon Chér Père**

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

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

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

Que la terre de Gadiobé te soit légère.

### **A Ma Grand Mère**

Les mots me manquent chère grand-mère ;

Ton amour et ta tendresse me manquent tellement ;

Que je ne donnerai pas pour t'avoir aujourd'hui à mes côtés ;

Le vide que ta disparition a laissé en moi restera éternel ;

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

Que les portes du Paradis te soient grandes ouvertes et que la terre de Gadiobé te soit légère.

## **Je dédie ce travail**

### **A Ma Chère Mère RAMATA ALY SARR**

Aucun mot ne pourra décrire mon amour pour toi ;

Femme travailleuse, infatigable, courageuse, exemplaire, modèle de dévouement et de générosité. Tu nous as bien éduqués dans le droit chemin, tu as veillé à ce qu'on ne manque de rien. Je prie pour que le tout puissant vous accorde une longue vie et beaucoup de santé.

### **A mon oncle DAHIROU ALY SARR**

Vous êtes plus que notre oncle ;

Vous êtes un père, un conseiller, un ami, un soutien ;

Aucun mot ne pourra témoigner l'estime que j'ai pour vous ;

A travers ce document, je vous témoigne toute ma gratitude, je vous remercie de tout cœur et je prie pour que le tout puissant vous accorde une longue vie et beaucoup de santé.

### **A mes frères et sœurs**

Merci de tout cœur pour le soutien et les conseils. Qu'Allah nous unisse d'avantage et qu'il nous guide dans le droit chemin.

### **A Saidou Ousmane SARR et Néné Gallé SARR**

Je vous témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

### **A mes TANTES et ONCLES**

#### **Dr Bayal CISSE**

Merci pour votre compréhension. Votre gentillesse et votre ouverture me touchent profondément.

### **A tout le personnel de l'Institut Pasteur de DAKAR (IPD)**

#### **A mes Ami (e) s**

#### **A la famille SARR**

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

### **A Penda SOW et tout le personnel du DISTRICT SANITAIRE DE PETE**

#### **A MES COLLEGUES**

## **A NOS MAITRES ET JUGES**

### **Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE**

Vous nous avez donné la chance en nous confiant ce travail. Nous avons découvert en vous un homme simple, gentil, passionné par sa discipline, rigoureux et exigeant toujours un travail de qualité.

Plus qu'un Maître, jamais dédicace ne pourra exprimer les forts sentiments que nous avons à votre égard. Nous vous disons un grand Merci.

### **Professeur Ndeye Coumba TOURE KANE**

Je vous témoigne toute ma gratitude et mes sincères remerciements. Je suis profondément marqué par votre modestie et votre simplicité. La richesse de vos cours et leur clarté nous amènent à vous vouer une grande admiration. Vous avez cultivé avec vos étudiants des relations précieuses basées sur le respect. Votre modestie facilite le contact. Vous êtes une référence. Soyez assurée de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

### **Professeur Halimatou DIOP**

Vous nous avez honorés en acceptant de faire parti du jury. Je vous témoigne à travers ce document tous mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

### **Professeur Makhtar CAMARA**

Mes remerciements les plus distingués. A travers ce document je vous témoigne ma profonde gratitude.

### **Dr Abdoulaye Seck**

Merci pour l'encadrement, Merci pour votre disponibilité. Merci pour tout.

### **A Amadou DIOP**

Je te témoigne ma gratitude à travers ce document. Merci de votre disponibilité, votre gentillesse.

A tout le personnel du **LABORATOIRE DE RECHERCHE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE DE L'HOPITAL ARISTIDE LE DANTEC**, particulièrement à **Abdoulaye DIOP, Dior DIENG, Fatou Bintou, Adja Thiané.**

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>BGN</b>	: Bacille à Gram négatif
<b>BGNNF</b>	: Bacille à Gram négatif Non Fermentaire
<b>CCS</b>	: Concentration Critique Supérieure
<b>CCI</b>	: Concentration Critique Inférieure
<b>LEV</b>	: Lévoﬂoxacine
<b>ATM</b>	: Aztréonam
<b>CRO</b>	: Ceftriaxone
<b>GEN</b>	: Gentamicine
<b>AN</b>	: Amikacine
<b>CIP</b>	: Ciproﬂoxacine
<b>COL</b>	: Colistine
<b>AMP</b>	: Ampicilline
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>MH</b>	: Muëller Hinton
<b>NaOH</b>	: Hydroxyde de Sodium
<b>BLSE</b>	: Bêta-lactamase à spectre élargi
<b>CA-SFM</b>	: Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>S</b>	: Sensible
<b>I</b>	: Intermédiaire
<b>R</b>	: Résistant
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Sulfure d'Hydrogène
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide
<b>MEVAG</b>	: Milieu d'Etudes de la Voix d'Attaque des Glucides
<b>ARN</b>	: Acide Ribonucléique
<b>ADN</b>	: Acide Desoxyribonucléique
<b>HALD</b>	: Hôpital Aristide Le Dantec

## Liste des tableaux

Tableau I : Principales infections dues aux pathovars d' <i>E. coli</i> .....	5
Tableau II : Caractéristiques des différents pathovars d' <i>E. coli</i> .....	6
Tableau III : Antibiotiques utilisés pour déterminer la sensibilité des souches étudiées	21
Tableau IV : Concentration critiques supérieure et inférieure des souches étudiées (Référence et clinique) .....	22
Tableau V : Solvants et diluants des antibiotiques utilisés .....	22
Tableau VI : Profil de sensibilité de la souche de référence <i>Escherichia coli</i> 25922 .....	25
Tableau VII : Profil de sensibilité de la souche de référence <i>P. aeruginosa</i> 27853 .....	26
Tableau VIII : Profil de sensibilité de la souche clinique <i>Escherichia coli</i> .....	26
Tableau IX : Profil de sensibilité de la souche clinique <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
Tableau X : Profil de sensibilité de la souche <i>Escherichia coli</i> 25922 sur les galeries Micro CSB®.....	27
Tableau XI : Profil de sensibilité de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 sur les galeries Micro CSB®.....	28
Tableau XII: Profil de sensibilité de la souche clinique <i>Escherichia coli</i> sur les galeries Micro-CSB®.....	28
Tableau XIII : Profil de sensibilité de la souche clinique <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur les galeries Micro-CSB®.....	29
Tableau XIV : Corrélacion entre la micromethode et l'antibiogramme standard pour <i>E. coli</i> .....	31
Tableau XV: Corrélacion entre la micromethode et l'antibiogramme standard pour <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> .....	32

## Liste des schémas et figures

Figure 1 : Les différents antigènes chez <i>E. coli</i> .....	3
Figure 2 : Structure du noyau bêta-lactame.....	11
Figure 3 : Structure chimique des aminosides.....	12
Figure 4 : Structure de la famille de base des cyclines .....	14
Figure 5 : Structure chimique des polypeptides .....	15
Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques .....	15
Figure 7: Profil d'une souche d' <i>Escherichia coli</i> à l'antibiogramme .....	16
Figure 8 : Disposition des antibiotiques sur les minigalleries Micro CSB® .....	23
Figure 9 : Courbe traduisant la corrélation entre la micromethode et l'antibiogramme standard pour <i>E. coli</i> .....	31
Figure 10 : Courbe traduisant la corrélation entre la micromethode et l'antibiogramme standard pour <i>P. aeruginosa</i> .....	32

## Table des matières

Introduction .....	1
I. Généralités sur <i>Escherichia coli</i> .....	2
I.1. Taxonomie.....	2
I.2. Historique .....	2
I.3. Caractères bactériologiques.....	2
I.3.1 Les caractères morphologiques et cultureux.....	2
I.3.2 Les caractères biochimiques. ....	3
I.4 Caractères antigéniques.....	3
I.5 Habitat .....	4
I.6 Les différents pathovars d'E. coli .....	4
I.7 La sensibilité aux antibiotiques de <i>E.coli</i> .....	7
II. Généralités sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
II.1 Définition .....	7
II.2 Taxonomie .....	8
II.3 Caractères bactériologiques .....	8
II.3.1 Caractères morphologiques et cultureux .....	8
II.3.2 Pigments élaborés.....	8
II.3.3 Caractères biochimiques.....	8
II.4 Habitat.....	9
II.5 La sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	9
III. Rappels sur les antibiotiques .....	10
III.1 Définition.....	10
III.2 Classification des antibiotiques .....	10
III.2.1 Les Bêta-lactamines .....	10
III.2.2 Les aminosides.....	12
III.2.3 Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS) .....	13
III.2.4 Les cyclines.....	13
III.2.5 Les phénicolés.....	14
III.2.6 Les quinolones .....	14
III.2.7 Les polypeptides .....	14
IV. Généralités sur l'antibiogramme .....	16
IV.1 Définition.....	16

IV.2 Intérêts de l'antibiogramme.....	16
IV.3 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.....	16
IV.4 Antibiogramme en milieu liquide.....	17
V. La résistance aux antibiotiques.....	17
V.1. Notion de résistance.....	17
V.2 Types de résistance.....	17
V.2.1 La résistance naturelle.....	17
V.2.2 La résistance acquise.....	18
V.2.3 La résistance clinique.....	18
DEUXIEME PARTIE : Travail expérimental .....	19
I. Objectifs de l'étude .....	19
II. Cadre de l'étude.....	19
III. Souches utilisées .....	19
IV. Matériels.....	19
IV.1. Matériels pour la conservation .....	19
IV.2 Matériels pour la culture et l'identification.....	20
IV.3 Matériels pour la détermination de la sensibilité.....	20
V. Méthodologie.....	20
V.1 Mode opératoire.....	20
V.1.1 Protocole .....	21
V.1.2 Préparation des milieux.....	23
V.2 Contrôle de qualité des tests effectués.....	23
V.2.1 Contrôle de stérilité des milieux .....	23
V.2.2 Contrôle de qualité des microplaques CSB® .....	23
V.2.3 Contrôle des paramètres dynamiques .....	23
V.3 Determination de la sensibilité (macro methode).....	24
V.4 Determination de la sensibilité (micro methode).....	25
VI. Résultats .....	25
VI.1 Contrôle des milieux .....	25
VI.2 Résultats macrométhode.....	25
VI.3 Profils de sensibilité sur antibiogramme standard des souches de référence.....	25
VI.4 Profil de sensibilité des 2 souches cliniques sur antibiogramme standard.....	26
VI.5 Profil de sensibilité des souches de référence sur les galeries Micro CSB® .....	27
VI.6 Profil de sensibilité des souches cliniques sur les galeries Micro CSB® .....	28

VI.7 Validation .....	30
VII. Discussion.....	34
Conclusion.....	36
Références bibliographiques .....	37

## **Introduction**

L'émergence et la dissémination de bactéries multi résistantes aux antibiotiques sont une préoccupation majeure pour le microbiologiste et le clinicien. En effet, l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques entraîne des changements dans l'écologie bactérienne particulièrement au niveau des hôpitaux [9].

L'identification et l'étude de la sensibilité des bactéries au laboratoire sont devenues plus faciles, plus rapides et plus fiables avec la mise sur le marché des galeries d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

L'utilisation de ces galeries au laboratoire rend le prix des examens bactériologiques parfois inaccessible par les populations à ressources limitées.

C'est dans ce contexte, que des travaux réalisés au sein de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec, ont abouti à la mise au point de mini galeries Micro-CSB<sup>®</sup> d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de nombreuses bactéries.

L'efficacité et la fiabilité de ces minigaleries Micro CSB<sup>®</sup> dans l'étude de la sensibilité bactérienne ont été démontrées et validées par des études antérieures [5, 7, 13].

L'identification et la détermination du profil de sensibilité rapide du germe isolé sont capitales pour une meilleure prise en charge de l'infection par le clinicien.

L'objectif de notre travail était d'étudier la réduction du temps d'incubation en 6 heures de ces minigaleries Micro-CSB<sup>®</sup> pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif (BGN).

# PREMIERE PARTIE

## **I. Généralités sur *Escherichia coli***

### **I.1. Taxonomie**

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et à la classe des *gamma-protobacteria*. *Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*. Cette bactérie, décrite pour la première fois par le pédiatre allemand Theodor Escherich en 1885 sous le nom de «*Bacterium coli commune*» a fait l'objet d'un très grand nombre d'études.

Le genre *Escherichia* comprend en outre 4 autres espèces isolées chez l'homme : *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia fergusonii* et, *Escherichia albertii* la dernière en date [3, 10].

### **I.2. Historique**

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe entre 1937 lorsque O. Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes.

Cette famille a connu un essor avec la découverte de nouveaux genres et espèces suite aux travaux de Brenner et Grimont [3, 10].

En 1972, Edward et Ewing intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae* alors qu'en 1973, 31 genres et 139 espèces étaient identifiés [3, 10].

En 1985, Farmer et coll. décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques [10].

### **I.3. Caractères bactériologiques**

#### **I.3.1 Les caractères morphologiques et culturels**

C'est un bacille à Gram négatif de 2 à 4 µm de longueur et de 0,4 à 0,6 µm de largeur. *Escherichia coli* pousse sur un milieu ordinaire pendant 24 heures à 37° C. Elle donne des colonies rondes, translucides [10].

Les colonies d'*Escherichia coli* sont de forme circulaire, de taille irrégulière, de couleur blanc-opaque ; de surface bombée et brillante ; avec une consistance gluante [10].

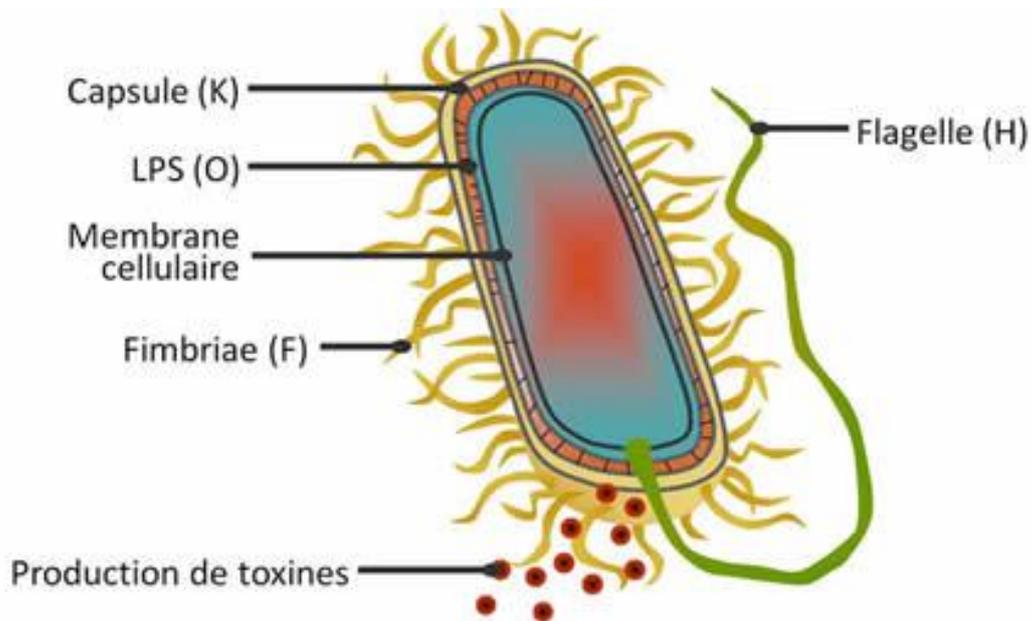
### I.3.2 Les caractères biochimiques

*Escherichia coli* exprime les caractères généraux des entérobactéries. C'est des bacilles à Gram négatif (2 à 4 microns de long sur 0,4 à 0,6 microns de large), mobiles avec une ciliature péritriche ou immobiles, poussent sur milieux de culture ordinaires, aérobies-anaérobies facultatifs, fermentent le glucose avec ou sans production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites, oxydase négatif.

*Escherichia coli* fermente les sucres (lactose et glucose), réduit les nitrates en nitrites, métabolise le tryptophane en indole [10].

### I.4 Caractères antigéniques

L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les LPS (lipopolysaccharides) présents sur la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif. L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle (ciliature péritriche) permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène K de surface n'est pas toujours présent mais s'il est présent, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O [3, 10].



**Figure 1 : Les différents antigènes chez *E. coli* [3]**

### **I.5 Habitat**

*E. coli* est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. L'appellation commune « colibacille » est une contraction de « bacille du colon » rappelant son caractère de bactérie commensale du tube digestif. Chez l'homme, il représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie ( $10^6$  à  $10^8$ ) bactéries par gramme de selles chez l'adulte. A ce titre, *E. coli* constitue un bon indicateur d'une contamination fécale, dans l'eau, les aliments ou le sol [10].

### **I.6 Les différents pathovars d'*E. coli***

La présence de facteurs de virulence spécifiques (facteurs de colonisation, toxines, etc.) permet de regrouper les souches d'*E. coli* en pathovars. Chaque pathovar est associé à un syndrome infectieux caractéristique. L'identification d'une souche à l'espèce *E. coli* par les techniques classiques n'est pas suffisante pour apprécier la responsabilité de celle-ci dans l'infection intestinale, il est nécessaire d'identifier le pathovar auquel appartient la souche par la caractérisation des facteurs de virulence [10].

Les souches d'*E. coli* responsables d'infections intestinales sont actuellement classées dans 6 pathovars définis sur la base des facteurs de pathogénicité et des signes cliniques engendrés. Ils sont désignés par ECEP (*E. coli* Entéropathogène) ou EPEC (Enteropathogenic *E. coli*) et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau I et II [10].

**Tableau I : Principales infections dues aux pathovars d'*E. coli* [9].**

<b>Pathovars</b>	<b>Infections intestinales</b>
<b>ETEC</b>	-Syndrome cholérique. -Épidémies chez les enfants dans les pays en voie de développement. -Diarrhées du voyageur.
<b>EPEC</b>	-Diarrhées infantiles aiguës ou chroniques. -Épidémies dans les maternités ou les crèches.
<b>EIEC</b>	-Syndrome dysentérique. -Diarrhées chez les adultes.
<b>EHEC</b>	-Colites hémorragiques. -Syndromes hémolytique et urémique.
<b>EAggEC</b>	-Diarrhées persistantes

**ETEC** : Enterotoxigenic *Escherichia coli*

**EPEC** : Enteropathogenic *Escherichia coli*

**EIEC** : Enteroinvasive *Escherichia coli*

**EHEC** : Entero-hémorragiques *Escherichia coli*

**EAggEC** : Enteroaggregative *Escherichia coli*

**Tableau II : Caractéristiques des différents pathovars d'*E. coli* [9]**

<b>Pathovars</b>	<b>Sérogroupe les plus fréquents</b>	<b>Principaux facteurs de pathogénicité</b>	<b>Principe d'identification</b>
<b>EPEC</b>	18-44-55-86-111-112-114-119-125-126-127-128 <sup>ab</sup> -142	Facteurs d'adhésion : Bfp (adhésion localisée) Attachement-effacement : gène <i>eae</i>	Recherche du gène codant pour les <i>Bfp</i> et du gène <i>eae</i> Sérotypage O
<b>ETEC</b>	6-8-15-20-25-27-63-78-80-85-115-128 <sup>ac</sup> -139-148-153-159-167	Facteurs d'adhésion : CFA/I, CS Entérotoxines : LT et ST	Recherche des Entérotoxines LT et ST
<b>ECEI</b>	28 <sup>ac</sup> -29-124-136-143-144-152-164-167	Pouvoir invasif (plasmide pINV)	Pouvoir invasif Recherche du plasmide pINV, du locus <i>ial</i>
<b>EHEC</b>	157-26-91-103-111-128	Cytotoxines : <i>Sxt 1</i> et <i>Sxt 2</i> Attachement-effacement : gène <i>eae</i>	Sérotypage O dont O157:H7 Recherche des gènes codant les toxines Stx 1 et Stx 2 Recherche du gène <i>eae</i>
<b>EAEC</b>	3-4-7-9 <sup>ab</sup> -15-21-51-55-77-86-91-92-106-111-126-127	Facteurs d'adhésion AAF/I (adhésion agrégative) Entérotoxines EAST-1	Mise en évidence de l'adhésion agrégative Recherche d'EAST-1
<b>DAEC</b>	4-15-28-44-50-55-69-75-86-125-126-127-128	Facteurs d'adhésion AIDA/I et Afa/Dr	Recherche des gènes codant pour <i>AIDA/I</i> et <i>Afa/Dr</i>

<b>ETEC</b>	: Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
<b>EPEC</b>	: Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
<b>EIEC</b>	: Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
<b>EHEC</b>	: Enterohemorragiques <i>Escherichia coli</i>
<b>EAggEC</b>	: Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
<b>DAEC</b>	: Diffuse adhering <i>Escherichia coli</i>

Les souches d'*Escherichia coli* peuvent être également responsables d'infection urinaire. Une infection urinaire est une infection bactérienne de l'urètre (urétrite) ou de la vessie (cystite). Elle peut remonter jusqu'au rein et provoquer alors une pyélonéphrite. Ce sont les infections bactériennes les plus fréquentes, quel que soit l'âge. Il arrive que des bactéries (*Escherichia coli* dans 90% des cas), pénètrent le système urinaire par le biais de l'urètre, le canal d'évacuation de l'urine. Elles s'y développent alors et créent une inflammation. Les infections urinaires sont plus fréquentes chez la femme parce que l'urètre est court et se trouve à proximité de l'anus où les *Escherichia coli* prolifèrent [3, 10].

### **I.7 La sensibilité aux antibiotiques de *E.coli***

*E. coli* est naturellement sensible aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif. Cependant, des souches résistantes aux antibiotiques sont de plus en plus fréquentes. Ces résistances acquises sont marquées par une grande diversité [16].

Des souches d'*E. coli* résistantes aux carbapénèmes sont décrites aussi bien en ville qu'à l'hôpital avec une prévalence faible.

Ces résistances sont, en grande majorité d'origine plasmidique car *E.coli* peut aisément acquérir des réplicons par transfert horizontal (conjugaison). Il peut s'agir parfois de plasmides épidémiques conférant une multi résistance [10, 16].

## **II. Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa***

### **II.1 Définition**

*Pseudomonas aeruginosa* (du latin aeruginosus = couvert de rouille) appelé bacille pyocyanique (du grec *puon* = pus et du grec *kuanos* = bleu foncé) a été isolée en 1882 par Gessard.

*Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type du genre, elle est la plus facile à être identifiée [8].

## **II.2 Taxonomie**

Le genre *Pseudomonas* est depuis toujours un genre pléthorique avec 160 espèces répertoriées en 1957. L'édition 1974 du Bergey's Manual retenait 29 espèces dont 13 d'intérêt médical ; en 1984, il conservait 30 espèces principales [1, 8].

## **II.3 Caractères bactériologiques**

### **II.3.1 Caractères morphologiques et culturels**

C'est un bacille à Gram négatif 1 à 3 µm de long et 0,5 à 1 µm de large. Il est parfois recouvert d'une pseudo capsule appelée «slime» qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie [1, 8].

Il peut être cultivé facilement sur beaucoup de milieux en atmosphère anaérobie en présence de nitrates. Il dégage une odeur aromatique caractéristique de suringat due à la production d'ortho-amino-acéto-phénone, intermédiaire du métabolisme du tryptophane et non lié à la production de pigment. Un milieu sélectif comme le milieu de Drigalski convient pour leur culture.

Des milieux sélectifs à base de cétrimide additionnés d'antibiotiques (exemple : acide nalidixique) sont proposés pour la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* dans des produits très contaminés ou dans les eaux (hydrologie) [8].

### **II.3.2 Pigments élaborés**

*Pseudomonas aeruginosa* produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture : la pyocyanine, bleu vert, soluble dans le chloroforme et la pyoverdine, jaune vert fluorescent et soluble dans l'eau. Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir ou rouge). Certaines souches sont non pigmentées [8].

La production de pigments est favorisée sur les milieux de King "A" pour la pyocyanine et "B" pour la pyoverdine [8].

### **II.3.3 Caractères biochimiques**

*Pseudomonas aeruginosa* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Les milieux

MEVAG (Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) ou de Hugh et Leifson permettent de mettre en évidence cette propriété

Comme la plupart des *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* possède une oxydase. D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic de l'espèce. *Pseudomonas aeruginosa* ne produit pas l'Indole, n'hydrolyse pas l'urée, ne produit pas H<sub>2</sub>S et réduit les nitrates en nitrites [8].

#### **II.4 Habitat**

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont caractérisées par leur caractère ubiquiste ; elles sont retrouvées dans les eaux (eaux douces polluées et non polluées, stagnantes ou courantes, eaux de mer), sol, végétaux, etc.

Elles peuvent être présentes dans les poussières en suspension dans l'air. La contamination des aliments ou des denrées alimentaires (végétaux crus) par ces bactéries n'est pas exceptionnelle et peut constituer un mode de contamination. Leurs exigences nutritives modestes leur permettent de survivre et de se multiplier sur des surfaces humides. De ce fait, elles sont fréquemment rencontrées en milieu hospitalier aussi bien dans l'environnement humide proche du malade (évier, siphons, objets et linges de toilettes, etc.) que dans de nombreux liquides parmi lesquels les solutions d'antiseptiques [1, 8].

*P. aeruginosa* est une espèce fréquemment isolée en pathologie infectieuse. Elle peut être rencontrée au niveau du tube digestif, de la gorge, du nez ou de la peau. Ce portage augmente de façon significative avec le temps d'hospitalisation [8].

#### **II.5 La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques**

*Pseudomonas aeruginosa* est réputé pour sa résistance aux antibiotiques qui pose de sérieux problèmes thérapeutiques et favorise sa dissémination en milieu hospitalier. La résistance naturelle du bacille pyocyanique relève d'une mauvaise perméabilité de la membrane externe et de la production constante d'une bêta-lactamase inductible.

Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe (modification des porines) ou à la production d'enzymes inactivantes. Ces deux mécanismes peuvent coexister et associer ainsi leurs effets [14].

*Pseudomonas aeruginosa* est résistante aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, aux tétracyclines, aux macrolides, au chloramphénicol, à la rifampicine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole [14].

La résistance acquise aux bêtalactamines est fréquente par production de pénicillinase inactivant la ticarcilline, les acyluréidopénicillines, la cefsulodine et le céfopérazone ou par dérégulation de la céphalosporinase naturelle [14].

La résistance acquise aux quinolones peut être due à une imperméabilité observée dans 15% des cas.

La résistance acquise à la fosfomycine est due à une diminution de la perméabilité [14].

### **III. Rappels sur les antibiotiques**

#### **III.1 Définition**

Un antibiotique est une substance naturelle, synthétique ou semi synthétique qui a pour but d'inhiber la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou de tuer les bactéries (effet bactéricide) [2, 6].

#### **III.2 Classification des antibiotiques**

La classification des antibiotiques peut se faire selon leur origine (naturelle, synthétique ou semi-synthétique), leur mode d'action, leur spectre d'activité et leur nature chimique [2, 6].

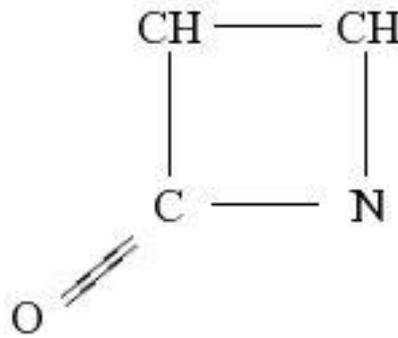
Il existe plusieurs familles d'antibiotiques.

##### **III.2.1 Les Bêta-lactamines**

Les bêta-lactamines représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame (figure 2). Nous distinguons 4 sous-familles : les pénames (pénicillines), les pénèmes, les monobactams et les céphèmes.

Les spectres d'activité de chaque sous-famille sont très différents en fonction de leurs particularités structurales.

La résistance par production de bêta-lactamases a conduit au développement d'inhibiteurs (Acide clavulanique, EDTA, cloxacilline, ions chlorures) de ces enzymes, qui associés à certaines bêta-lactamines en restaurent l'activité antibactérienne. Les bêta-lactamines sont en général bien tolérées exceptées des manifestations immuno-allergiques diverses et éventuellement croisées qui sont rencontrées avec la grande majorité des bêta-lactamines [2, 6, 9, 11, 12].



**Figure 2 : Structure du noyau bêta-lactame [2]**

✓ Les pénicillines

Les pénicillines regroupent :

- les pénicillines naturelles groupes G et V ;
- les pénicillines du groupe M (oxacilline) ;
- les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline) ;
- les carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline) ;
- les acyluréidopénicillines (piperacilline, mezlocilline) ;
- les amidino-pénicillines (pivmécillinam) [14-16].

✓ Les céphalosporines

Il existe 4 générations de céphalosporines actuellement :

- 1<sup>ère</sup> génération (Céfaloine, Céfadril, Céfadroxil, Céfradine) ;
- 2<sup>ème</sup> génération (Céfuroxime, Céfémone, Céfoxitine) ;
- 3<sup>ème</sup> génération (Céftriaxone, latomoxef, Céftazidime, Céfoxitine) ;
- 4<sup>ème</sup> génération (Céfépime, Cefpirome) [14, 16].

✓ Les monobactames

Les monobactames sont une classe d'antibiotique de type bêta-lactamines (exemple : Aztréonam).

Le mode d'action des bêta-lactamines est la liaison à la protéine liant les pénicillines (PLP ou PBP). Ils se lient davantage aux PBP-3 [9, 11] (Figure 6).

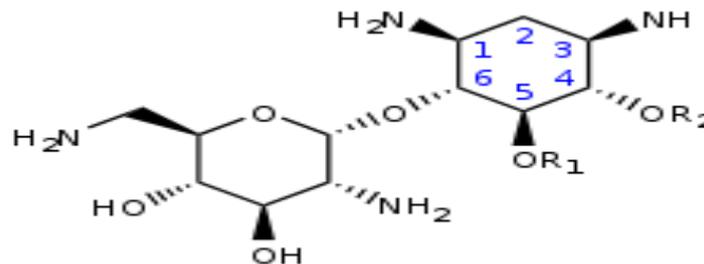
✓ Les pénèmes

Les carbapénèmes sont les bêta-lactamines qui ont le spectre d'activité antimicrobienne le plus large. L'imipénème est un carbapénème à spectre large. Il est associé à un inhibiteur de son catabolisme, la cilastatine, qui est un inhibiteur d'une enzyme rénale, la déhydropeptidase I qui métabolise et inactive l'imipénème [15].

L'ertapénème et le méropénème sont aussi un carbapénème, non inactivé par la déhydropeptidase, ayant des propriétés proches de celles de l'imipénème.

### III.2.2 Les aminosides

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre possédant une structure aminoglycosidique (figure 3) [19].



**Figure 3 : Structure chimique des aminosides [11]**

Les aminosides sont divisés en 3 grands groupes :

- 1<sup>ère</sup> génération : Streptomycine, Kanamycine, Néomycine, etc;
- 2<sup>ème</sup> génération : Amikacine, Gentamicine, Tobramycine, etc ;
- 3<sup>ème</sup> génération : Nétilmicine [10, 11,14].

Les aminosides pénètrent dans la membrane externe des bacilles à Gram négatif par les porines et/ou la bicouche lipidique qu'ils désorganisent, mais également pénètrent par la membrane cytoplasmique par transport actif dépendant du gradient électro-chimique [14].

Ils se fixent ensuite sur le ribosome et perturbent la synthèse protéique (production de polypeptides aberrants, arrêt de la synthèse) [14].

Ils interagissent avec des protéines des sous-unités 30S et 50S et surtout l'ARN 16S de la petite sous-unité. Ainsi, ils inhibent les étapes d'initiation, de translocation et de recyclage. [15] (Figure 6).

### **III.2.3 Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS)**

Ce sont des antibiotiques répartis en 4 groupes: macrolides ; synergistines ; lincosamides ; et kétolides.

Ce sont des classes différentes mais ils ont les mêmes mécanismes d'action et de résistance ainsi que la même pharmacocinétique. Ce sont des antibiotiques très répandus sont très utilisés dans les infections courantes.

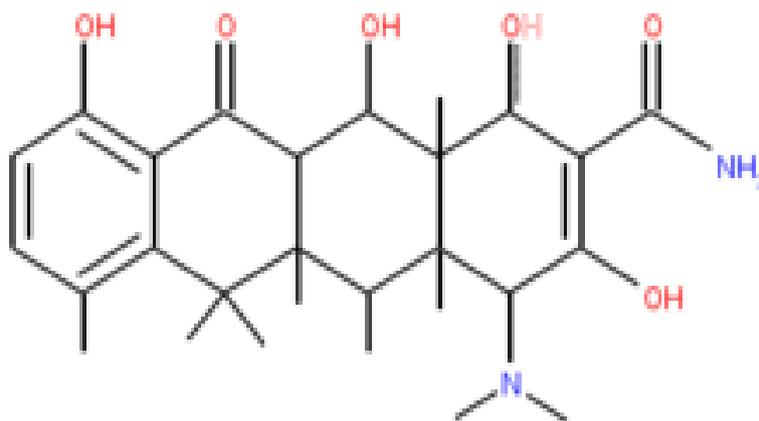
Ils ont un spectre d'activité limité sur les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, les mycoplasmes et les bacilles à Gram négatif anaérobies [9,12].

Ces molécules, bien que structurellement distinctes, possèdent de nombreuses propriétés communes justifiant leur regroupement. En effet, ce sont des antibiotiques bactéricides ou bactériostatiques selon la dose, agissant au niveau de la sous-unité 50 S ribosomale, caractérisés par une forte liposolubilité et une très bonne distribution tissulaire et intracellulaire [9,16] (Figure 6).

### **III.2.4 Les cyclines**

Les cyclines ou tétracyclines constituent une famille d'antibiotiques dérivés de la tétracycline. Ces molécules ont pour caractéristique de posséder quatre cycles accolés (d'où leur nom) (figure 4). Elles sont capables de pénétrer les cellules eucaryotes. On les utilise donc en particulier pour cibler les bactéries parasites intracellulaires. Ces molécules sont bactériostatiques [11-12, 16].

Les cyclines sont des inhibiteurs de la traduction des protéines. Ils se lient à la sous-unité 30S du ribosome où se situe le centre de décodage de l'ARN messager. Cette liaison empêche la fixation des ARNt sur le ribosome et donc la formation de l'interaction entre le codon et l'anticodon. Ceci empêche la lecture du message génétique [14-15] (Figure 6).



**Figure 4 : Structure de la famille de base des cyclines [13]**

### III.2.5 Les phénicolés

Ce sont des antibiotiques dérivés de l'acide dichloro-acétique avec une activité bactériostatique à large spectre.

Le principal antibiotique de cette famille est le chloramphénicol. Ces antibiotiques ont un spectre d'action très large.

Une résistance plasmidique due à la production d'une "chloramphénicol acétyltransférase" est décelable chez certaines entérobactéries [9,15].

Ce type de molécule se fixe sur le ribosome de la cellule pour inhiber la synthèse protéique des bactéries pathogènes freinant ainsi leur multiplication [9,14] (Figure 6).

### III.2.6 Les quinolones

Les quinolones et fluoroquinolones forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprend les dérivés de l'acide nalidixique découvert en 1962. L'ajout de l'atome de fluor dans les années 1970 a permis d'augmenter fortement la pénétration des quinolones dans les cellules (plus de 200 fois) : d'où la naissance des fluoroquinolones, puissants antibiotiques capables de lutter contre une grande variété de germes chez l'homme et l'animal.

L'apparition sur le marché dans les années 1980 de la norfloxacine, norfloxacine, ciprofloxacine, péfloxacine et lévofloxacine ont permis aux fluoroquinolones de devenir des antibiotiques de référence pour de nombreuses infections, comme les pyélonéphrites aiguës [4, 22].

Les quinolones bloquent la transcription et la répllication du génome bactérien. Ils ont une activité bactéricide concentration-dépendante et ils ont pour cible les ADN topo-isomérases : ADN gyrase et topo-isomérase IV [4, 22] (Figure 6).

### III.2.7 Les polypeptides

Ce sont des molécules en chaîne qui comportent plus de 50 acides aminés reliés par des liaisons peptidiques (figure 5). Ils constituent une famille d'antibiotiques dont des molécules très toxiques qui ne permettent qu'un usage très limité. La colistine appartient à cette famille d'antibiotique [6, 9, 11].

Le mode d'action est lié à un effet polycationique désorganisant les groupes phosphates des lipopolysaccharides de la membrane des bacilles à Gram négatif. Cette interaction est responsable d'une augmentation de la perméabilité membranaire et d'une fuite du contenu intracellulaire, à l'origine de la mort de la bactérie. Ce mécanisme d'action peut être responsable d'une synergie avec d'autres antibiotiques apparaissant inefficaces sur l'antibiogramme notamment par imperméabilité, d'où l'intérêt en pratique clinique de tester les associations avec de la colistine [12] (Figure 6).

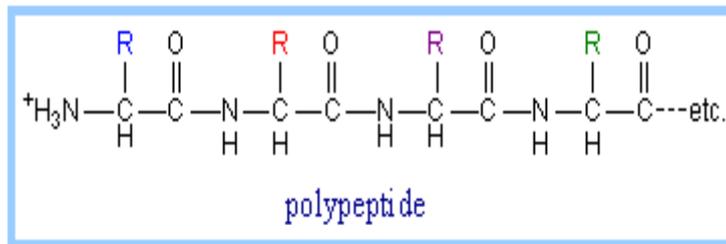


Figure 5 : Structure chimique des polypeptides [12].

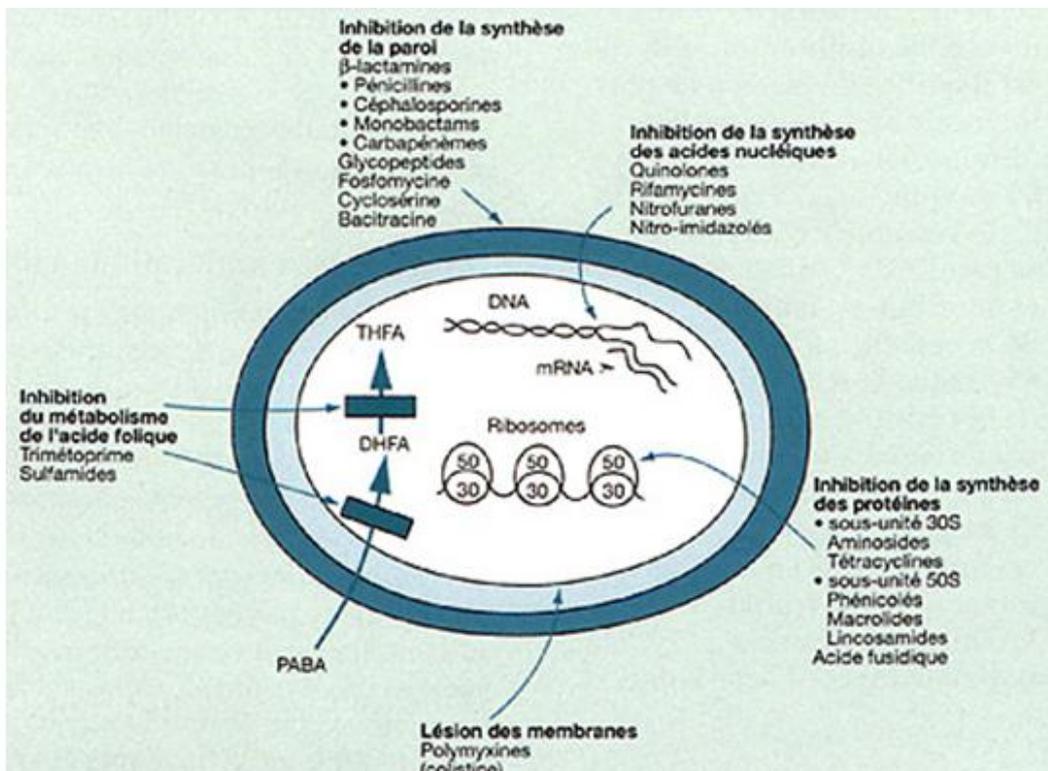


Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques [11]

## IV. Généralités sur l'antibiogramme

### IV.1 Définition

Un antibiogramme est un test qui permet de définir le profil de sensibilité aux antibiotiques d'une souche bactérienne donnée [2].

### IV.2 Intérêts de l'antibiogramme

Les intérêts de l'antibiogramme sont :

- Thérapeutique : l'antibiogramme favorise un choix judicieux des antibiotiques.
- Epidémiologique : il contribue à la surveillance de la résistance bactérienne dans le temps, ce qui permet une adaptation de l'antibiothérapie probaliste. Il permet également la comparaison des phénotypes de résistance [9].
- Diagnostique : il contribue à l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistance naturelle [9].

### IV.3 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

Des disques de papier buvard, imprégnés de l'antibiotique à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques sont entourés d'une zone d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture. Les diamètres d'inhibition correspondent à la concentration minimale inhibitrice [2, 9, 14, 15] (Figure 7).



Figure 7: Profil d'une souche d'*Escherichia coli* à l'antibiogramme [14]

#### **IV.4 Antibiogramme en milieu liquide**

Les méthodes de dilution sont les méthodes de référence pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro dilution) ou de cupules (méthode de micro dilution) contenant l'antibiotique [14, 15].

### **V. La résistance aux antibiotiques**

#### **V.1. Notion de résistance**

Plusieurs définitions de la résistance des bactéries aux antibiotiques ont été décrites. Selon les auteurs :

- ✓ une souche est dite “résistante” lorsqu’elle supporte une concentration d’antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ;
- ✓ une souche est dite résistante lorsque la concentration d’antibiotique qu’elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration pouvant être atteinte *in vivo* ;
- ✓ une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu’une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d’une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique. Il existe plusieurs types de résistances bactériennes aux antibiotiques [2, 6].

#### **V.2 Types de résistance**

##### **V.2.1 La résistance naturelle**

La résistance naturelle ou “intrinsèque” correspond à la résistance de toutes les souches d’une même espèce ou d’un même genre bactérien à un antibiotique. Le mécanisme de cette résistance est variable mais son support génétique est généralement chromosomique. La résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l’espèce [2, 6].

### **V.2.2 La résistance acquise**

La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une résistance à un antibiotique par une souche normalement sensible. Elle n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible, à l'inverse de la résistance naturelle qui est caractéristique de l'espèce. La résistance acquise est évolutive, elle varie en fonction du temps, de la localisation (épidémie), de l'utilisation des antibiotiques. L'acquisition de la résistance peut être liée à un support plasmidique ou à une mutation chromosomique. Cette acquisition de résistance observée *in vitro* et *in vivo* pour la plupart des bactéries aux antibiotiques montre tout l'intérêt de l'étude de la sensibilité des bactéries au laboratoire [6].

### **V.2.3 La résistance clinique**

Elle se traduit par l'échec thérapeutique. Plusieurs facteurs entrent en cause dans ce type de résistance :

- les facteurs environnementaux (cations, protéines inhibitrices, etc.) ;
- la pharmacocinétique ;
- le choix judicieux de l'antibiotique ;
- les mécanismes développés par les bactéries [6].

# DEUXIEME PARTIE

## **DEUXIEME PARTIE : Travail expérimental**

### **I. Objectifs de l'étude**

L'objectif général de ce travail était d'optimiser et de valider l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGNNF) en utilisant les galeries Micro CSB<sup>®</sup>. L'optimisation consistait à réduire le délai pour la détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées.

### **II. Cadre de l'étude**

Ce travail a été réalisé au niveau des Laboratoires de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'UCAD II et de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec (HALD). Cette étude a été réalisée entre Mai 2015 et Août 2015.

### **III. Souches utilisées**

Deux souches de référence ont été utilisées pour cette étude : *Escherichia coli* 25922 ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC. Nous avons également utilisé 2 souches (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) isolées d'infection urinaire pour la validation.

### **IV. Matériels**

#### **IV.1. Matériels pour la conservation**

- Tubes nunc
- Portoirs
- Tubes stériles à vis
- Anse de platine

#### **IV.2 Matériels pour la culture et l'identification**

- Boîtes de Pétri en matière plastique
- Pipettes Pasteur
- Bec Bunsen
- Etuve
- Anse calibrée
- Microscope optique

- Micropipettes
- Embouts stériles
- Becher rempli d'eau de javel
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Four à micro-ondes
- Agitateur magnétique
- Papier buvard

#### **IV.3 Matériels pour la détermination de la sensibilité**

- Boîtes de Pétri
- Ecouvillons stériles
- Tubes à hémolyse
- Eau physiologique stérile
- Pince
- Microplaques (8 puits à fond rond)
- Disques d'antibiotiques

### **V. Méthodologie**

#### **V.1 Mode opératoire**

##### **V.1.1 Protocole**

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques consistait à ajouter au milieu MH deux concentrations critiques (supérieure et inférieure) d'un antibiotique donné (tableau III). Après une incubation à 37° C, la croissance bactérienne était détectée grâce au virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) pour les entérobactéries et par la présence d'une turbidité du bouillon MH pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires.

**Tableau III : Antibiotiques utilisés pour déterminer la sensibilité des souches étudiées**

<b>Antibiotiques Utilisés</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
<b>Amikacine</b>	+	+
<b>Céftriaxone</b>	+	+
<b>Ciprofloxacine</b>	+	+
<b>Aztreonam</b>	+	+
<b>Colistine</b>	+	+
<b>Gentamycine</b>	+	+
<b>Ampicilline</b>	+	-
<b>Levofloxacine</b>	-	+

### **V.1.2 Préparation des milieux**

#### **- Gélose MH**

Une gélose MH était préparée et répartie dans des boîtes de pétri pour réaliser le réisolement des différentes souches étudiées et permettre la réalisation de l'antibiogramme standard.

#### **- Préparation du bouillon MH**

Le bouillon MH était préparé selon les recommandations du fabricant et additionné de glucose et de rouge de phénol pour étudier les bactéries fermentaires. Il était également utilisé pour étudier la présence d'une turbidité du bouillon MH reflétant la croissance des bacilles non fermentaires.

#### **- Préparation des CCS et CCI**

Les concentrations critiques supérieure et inférieure de chaque antibiotique étaient préparées à partir d'une solution mère.

Les concentrations d'antibiotique utilisées pour les souches sont répertoriées dans le tableau IV.

**Tableau IV : Concentration critiques supérieure et inférieure des souches étudiées  
(Référence et clinique)**

Antibiotiques	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CCS (µg/ml)	CCI (µg/ml)	CCS (µg/ml)	CCI (µg/ml)
<b>AN</b>	32	16	32	16
<b>GEN</b>	16	8	16	4
<b>CRO</b>	64	8	64	8
<b>ATM</b>	32	8	32	16
<b>CIP</b>	4	1	4	2
<b>LEV</b>	-	-	8	2
<b>AMP</b>	32	8	-	-
<b>COL</b>	8	2	8	2

La dilution de chaque antibiotique était réalisée à l'aide de solvant et diluant appropriés ( tableau VI).

**Tableau V : Solvants et diluants des antibiotiques utilisés**

Antibiotiques	Solvant	Diluant
<b>LEV</b>	½ H <sub>2</sub> O dans 0,1 mol/L NaOH	Eau distillée
<b>ATM</b>	Solution bicarbonate de sodiun saturée	Eau distillée
<b>CRO</b>	Eau distillée	Eau distillée
<b>GEN</b>	Eau distillée	Eau distillée
<b>AN</b>	Eau distillée	Eau distillée
<b>AMP</b>	Tampon Phosphate pH 7 0,1M	Tampon Phosphate pH 7 0,1M
<b>CIP</b>	Eau distillée	Eau distillée
<b>COL</b>	Eau distillée	Eau distillée

## **V.2 Contrôle de qualité des tests effectués**

Chaque lot de milieu préparé était soumis à un contrôle de stérilité et d'efficacité avant d'être utilisé pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques.

### **V.2.1 Contrôle de stérilité des milieux**

Un millilitre du bouillon MH préparé était mis dans un tube à hémolyse stérile incubé à l'étuve à 37° C pendant 24h à 48h. Le bouillon était considéré stérile à l'absence de trouble.

Chaque boîte contenant de la gélose MH préparée était placée à l'étuve à 37° C pendant 24h à 48h. Les boîtes étaient considérées stériles en l'absence d'apparition de colonies.

### **V.2.2 Contrôle de qualité des microplaques CSB®**

#### **- Test de stérilité**

Avant leur utilisation, les plaques déshydratées contenant les concentrations critiques supérieures et inférieures étaient incubées sans inoculum pendant 24h à 37° C.

Le milieu contenu dans les plaques était considéré comme stérile en absence de virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

#### **- Test d'efficacité**

Le bouillon MH mis en présence de la souche de référence et de l'indicateur coloré est incubé à 37° C pendant 24 heures. Le milieu était considéré comme efficace en cas de changement de coloration du milieu MH.

### **V.2.3 Contrôle des paramètres dynamiques**

Le pH de chaque milieu préparé était vérifié à l'aide d'un pH-mètre et devait être compris entre  $7,4 \pm 0,2$ .

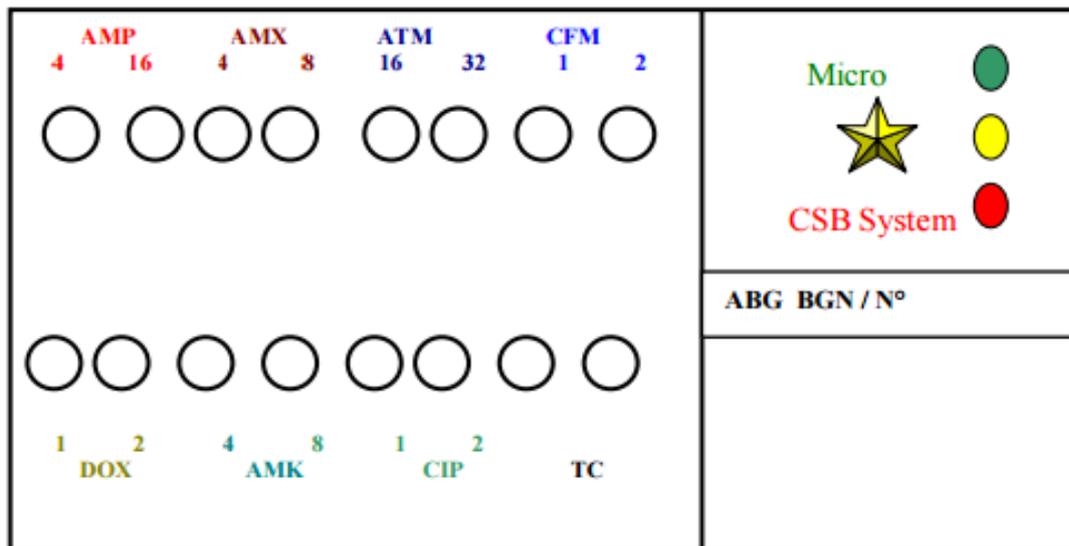
## **V.3 Détermination de la sensibilité (macro méthode)**

Pour les souches d'*Escherichia coli* (référence et clinique) ; 1ml du bouillon MH était mis dans des tubes additionné de glucose et de rouge de phénol (indicateur coloré), ensuite un volume de 100µl d'un inoculum de 3 Mac Farland d'*E. coli* était ajouté à chaque tube.

Pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* (référence et clinique) ; 1 ml du bouillon MH était réparti dans des tubes. Ensuite un volume de 100 µl d'un inoculum de 3 Mac Farland de *P. aeruginosa* était ajouté.

Les tubes étaient ensuite incubés dans l'étuve à 37° C ; et une detection d'un changement de l'indicateur coloré ou la présence d'une turbidité correspondant à une croissance bacterienne était réalisée chaque 2 heures pendant une durée de 6 heures.

#### V.4 Determination de la sensibilité (micro methode)



**Figure 8 : Disposition des antibiotiques sur les minigaleries Micro CSB<sup>®</sup>**

Les cupules contenant les différentes concentrations d'antibiotiques à tester étaient déshydratées dans l'étuve pendant 48 heures à une température de 40°C.

Ensuite, 100 µl d'un inoculum de 3 Mac Farland de la souche à tester était ajouté dans le bouillon MH additionné de glucose et de rouge de phénol pour les bactéries fermentaires.

Pour les bactéries non fermentaires, seul un volume de 100 µl d'un inoculum de 3 Mac Farland était ajouté dans le bouillon MH.

Un volume de 100 µl de l'inoculum 3 Mac Farland de la souche à tester était distribué dans les cupules contenant les antibiotiques déshydratés et dans celles servant de témoin pour la croissance.

La plaque était ensuite incubée à 37° C sous papier buvard humide pour empêcher la déshydratation.

La lecture était effectuée toutes les 2 heures (pour une durée de 6 heures) pour détecter le changement de coloration du milieu, correspondant au virage du rouge de phénol pour les entérobactéries et la présence d'une turbidité du milieu MH pour les bactéries non fermentaires.

Ce test permettait de vérifier la croissance ou l'absence de croissance bactérienne dans les cupules.

## **VI. Résultats**

### **VI.1 Contrôle des milieux**

Les tests de contrôle (stérilité et fertilité) des milieux utilisés tout au long de cette étude étaient tous positifs.

### **VI.2 Résultats macrométhode**

Les tests macrométhodes (3 tests par germe) réalisés sur les souches de référence et clinique ont permis de montrer que les milieux utilisés permettaient la croissance des bactéries au bout de 6 heures d'incubation.

### **VI. 3 Profils de sensibilité sur antibiogramme standard des souches de référence**

Les souches de référence ont montré un profil sensible pour tous les antibiotiques testés (tableaux VI et VII).

**Tableau VI : Profil de sensibilité de la souche de référence *Escherichia coli* 25922**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Diamètres (mm)</b>		<b>Profil</b>
	<b>obtenus</b>	<b>EUCAST 2016</b>	
<b>AMP</b>	19	15-22	S
<b>CIP</b>	37	30-40	S
<b>CRO</b>	30	29-35	S
<b>ATM</b>	30	28-36	S
<b>AMK</b>	18	19-26	S
<b>GEN</b>	22	19-26	S

**Tableau VII : Profil de sensibilité de la souche de référence *P. aeruginosa* 27853**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Diamètres (mm)</b>		<b>Profil</b>
	<b>obtenus</b>	<b>EUCAST 2016</b>	
<b>LEV</b>	22	19-23	S
<b>GEN</b>	21	17-23	S
<b>CIP</b>	40	25-33	S
<b>ATM</b>	22	23-29	S
<b>AMK</b>	18	18-26	S

#### **VI.4 Profil de sensibilité des 2 souches cliniques sur antibiogramme standard**

Les souches cliniques ont montré un profil sensible pour tous les antibiotiques testés sur antibiogramme standard (tableaux VIII et IX).

**Tableau VIII : Profil de sensibilité de la souche clinique *Escherichia coli***

<b>Antibiotiques</b>	<b>Diamètres (mm)</b>		<b>Profil</b>
	<b>obtenus</b>	<b>EUCAST 2016</b>	
<b>AMP</b>	20	S $\geq$ 14 R < 14	S
<b>GEN</b>	20	S $\geq$ 17 R < 14	S
<b>CIP</b>	25	S $\geq$ 22 R < 19	S
<b>CRO</b>	39	S $\geq$ 23 R < 20	S
<b>ATM</b>	37	S $\geq$ 24 R < 21	S
<b>AMK</b>	22	S $\geq$ 16 R < 13	S

**Tableau IX : Profil de sensibilité de la souche clinique *Pseudomonas aeruginosa***

Antibiotiques	Diamètre (mm)		Profil
	obtenu	EUCAST 2016	
LEV	35	S $\geq$ 20 R<17	S
GEN	25	S $\geq$ 15 R<15	S
CIP	40	S $\geq$ 25 R<22	S
ATM	22	S $\geq$ 50 R<16	S
AMK	19	S $\geq$ 18 R<15	S

**VI.5 Profil de sensibilité des souches de référence sur les galeries Micro CSB<sup>®</sup>**

Les profils de sensibilité des souches de référence déterminées sur les galeries Micro-CSB<sup>®</sup> 3 fois sont mis dans les tableaux XI et XII.

**Tableau X : Profil de sensibilité de la souche *Escherichia coli* 25922 sur les galeries Micro CSB<sup>®</sup>**

Antibiotiques	Profil Jour 1	Profil Jour 2	Profil Jour 3
ATM	S	S	S
AMK	S	S	S
CIP	S	S	S
CRO	S	S	S
AMPI	S	S	S
GENTA	S	S	S

**Tableau XI : Profil de sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* 27853 sur les galeries Micro CSB®**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Profil J1</b>	<b>Profil 2</b>	<b>Profil J3</b>
<b>ATM</b>	S	S	S
<b>AMK</b>	S	S	S
<b>CIP</b>	S	S	S
<b>CRO</b>	S	S	S
<b>GENTA</b>	S	S	S
<b>LEVO</b>	S	S	S

J : Jour

**VI.6 Profil de sensibilité des souches cliniques sur les galeries Micro CSB®**

Les profils de sensibilité des souches cliniques déterminées sur les galeries Micro-CSB® 3 fois sont mis dans les tableaux XII et XIII.

**Tableau XII: Profil de sensibilité de la souche clinique *Escherichia coli* sur les galeries Micro-CSB®**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Profil J1</b>	<b>Profil J2</b>	<b>Profil J3</b>
<b>ATM</b>	S	S	S
<b>AMK</b>	S	S	S
<b>CIP</b>	S	S	S
<b>CRO</b>	S	S	S
<b>AMP</b>	S	S	S
<b>GEN</b>	S	S	S

J : Jour

**Tableau XIII : Profil de sensibilité de la souche clinique *Pseudomonas aeruginosa* sur les galeries Micro-CSB®**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Profil J1</b>	<b>Profil J2</b>	<b>Profil J3</b>
<b>ATM</b>	S	S	S
<b>AMK</b>	S	S	S
<b>CIP</b>	S	S	S
<b>CRO</b>	S	S	S
<b>GEN</b>	S	S	S
<b>LEV</b>	S	S	S

J : Jour

Les profils de sensibilité obtenus sur antibiogramme standard et sur les galeries Micro CSB® ont montré une corrélation des résultats de sensibilité obtenus avec ces 2 techniques aussi bien sur les souches de référence que sur les souches cliniques.

## VI.7 Validation

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

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

$$y = a x_i + b$$

$$a = \frac{\Sigma y}{N} - b \frac{\Sigma x}{N}$$

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

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

$r$  = coefficient de corrélation ;  $x_i$  = données observées ;  
 $a$  = pente de la droite ;  $b$  = ordonnée à l'origine ;  
 $N$  = nombre de paires ( $x$  ;  $y$ )

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

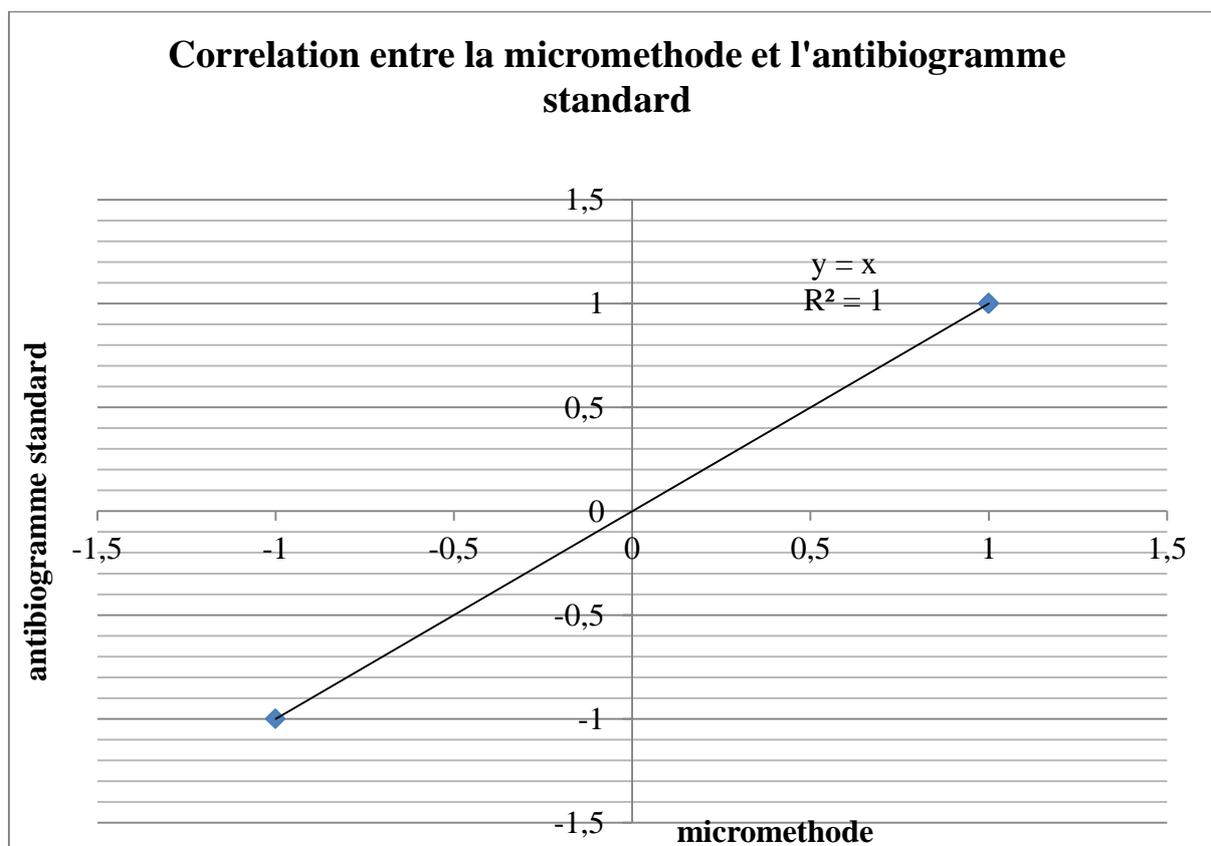
- $r = 0,2$  à  $0,4$  : Corrélation faible ou quasi absence de corrélation.
  - $r = 0,4$  à  $0,6$  : Corrélation moyenne.
  - $r = 0,6$  à  $0,8$  : Bonne corrélation.
  - $r = 0,8$  : Corrélation élevée.
  - $r = 1$  où  $-1$  : Corrélation parfaite
- 
- $a = 0$  : pas de corrélation
  - $a < 0$  : proportionnalité inverse
  - $a > 0$  : corrélation positive

Soit : **S** (Sensible) = 1 ; **I** (Intermédiaire) = 0 ; **R** (Résistant) = -1

*Escherichia coli*

**Tableau XIV : Corrélation entre la micromethode et l'antibiogramme standard pour *E. coli***

Antibiotiques	Galeries Micro CSB <sup>®</sup>	Antibiogramme Standard
AMP	1	1
GEN	1	1
CIP	1	1
CRO	1	1
ATM	1	1
AMK	1	1



**Figure 9 : Courbe traduisant la corrélation entre la micromethode et l'antibiogramme standard pour *E. coli***

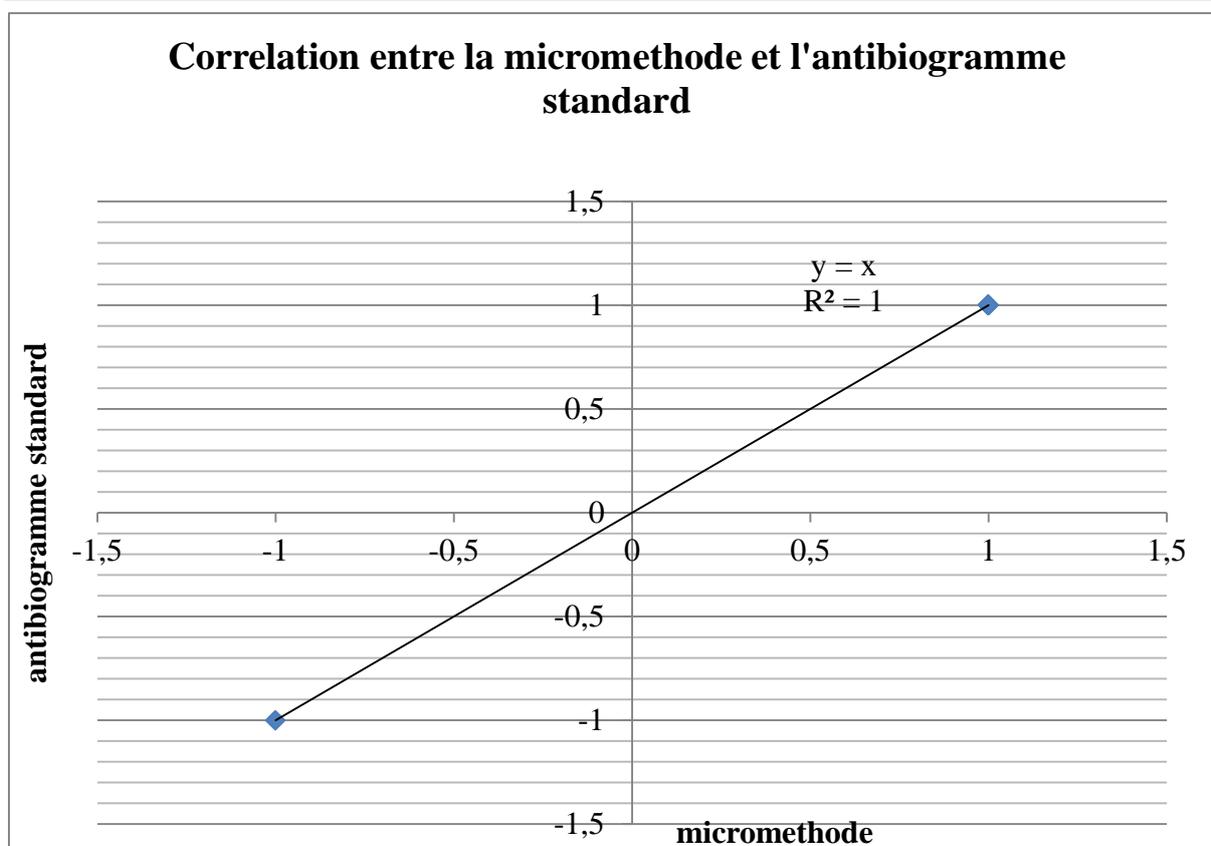
La corrélation entre les profils de sensibilités des souches d'*E. coli* obtenus par la microméthode et ceux obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé est parfaite.

L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme :  $y = x$ , avec  $r = 1$ . La valeur de la pente ( $a$ ) est supérieure à zéro donc la corrélation est positive. Ce qui montre que notre microméthode peut être considérée comme technique de référence.

*Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau XV: Corrélation entre la microméthode et l'antibiogramme standard pour *P. aeruginosa***

Antibiotiques	Galleries Micro CSB <sup>®</sup>	Antibiogramme Standard
LEV	1	1
GEN	1	1
CIP	1	1
ATM	1	1
AMK	1	1



**Figure 10: Courbe traduisant la corrélation entre la microméthode et l'antibiogramme standard pour *P. aeruginosa***

La corrélation entre les profils de sensibilités des souches de *Pseudomonas aeruginosa* obtenus par la microméthode et ceux obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé est parfaite.

L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme :  $y = x$ , avec  $r = 1$ . La valeur de la pente (**a**) est supérieure à zéro donc la corrélation est positive. Ce qui montre que notre microméthode peut être considérée comme technique de référence.

## VII. Discussion

Ce travail a été réalisé dans le but d'optimiser et de valider l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif.

Pour ce travail, nous avons utilisé deux souches de référence et deux souches cliniques, ce qui constitue un faible échantillonnage. Néanmoins, les résultats des souches de référence testées trois fois nous ont permis de valider notre technique et les résultats de l'étude des profils de sensibilité. Un inoculum de 3 Mac Farland a été utilisé pour la microméthode, comme recommandé dans des travaux antérieurs pour étudier l'identification et le profil de sensibilité des bacilles à Gram négatif [5, 7].

Les résultats des souches de contrôle et celles cliniques obtenus avec les galeries Micro CSB<sup>®</sup> concordaient avec ceux de l'antibiogramme standard.

En effet, toutes les souches étudiées montraient un profil sensible aux différents antibiotiques testés aussi bien sur galeries Micro CSB<sup>®</sup> après 6 heures d'incubation qu'à l'antibiogramme standard selon les recommandations du CA-SFM.

En 1985, des études réalisées par Le Noc et coll sur les microplaques ont montré une concordance de 96 à 99 % entre les tests de sensibilité par méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose et les tests effectués sur microplaques [17, 18, 19].

Il apparaît donc, que l'étude du profil de sensibilité des bacilles à Gram négatif est réalisable en 6 heures sur galeries CSB<sup>®</sup>. Une étude antérieure avait montré la capacité de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries par cette microméthode après une incubation de 18 à 24h [21].

En 1986, des études menées par Gayral JP et coll sur la sensibilité sur microplaques réalisées ont montré un système de lecture rapide (ATB rapide) mais automatisé qui permet de déterminer le profil de sensibilité des bactéries au bout de 4 à 5 heures d'incubation à 37° C [17, 18, 19].

Ainsi, cette microméthode peut être utilisée dans les laboratoires de bactériologie dans les pays en voie de développement pour déterminer le profil de sensibilité des souches isolées de prélèvements à visée diagnostique dans un délai de 6 heures, permettant une prise en charge précoce des infections bactériennes. Pour cela, d'autres travaux semblent nécessaires sur un échantillonnage plus large.

Cette microméthode peut être améliorée en testant des bacilles à Gram négatif avec des profils de sensibilité différents. Dans notre étude, toutes les souches testées étaient sensibles aux

antibiotiques. L'utilisation de souches présentant des profils de résistance ou de sensibilité intermédiaire serait souhaitable pour conforter les résultats déjà obtenus.

En effet, des discordances ont été observées entre les méthodes de diffusion sur gélose et les méthodes sur microplaques. Ainsi, des divergences ont été observées avec les disques de cotrimoxazole, de doxycycline, de chloramphénicol et d'acide nalidixique [19, 20].

De même, cette microméthode présente une limite car elle ne permet pas de détecter les souches productrices de BLSE.

Malgré cette limite, les galeries Micro CSB<sup>®</sup> présentent plusieurs avantages. C'est un test facile à réaliser par le technicien avec une inoculation directe de la culture à partir d'une culture pure. Il est aussi pratique avec un conditionnement individuel et des réactifs prêts à l'emploi. L'interprétation des résultats par méthode colorimétrique est réalisée directement à l'œil nu [20].

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que ce système de microplaque est un moyen très précis pour tester la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries [17,18, 19].

## Conclusion

Cette étude réalisée entre Mai et Août 2015 avait pour objectif d'optimiser et de valider l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif avec les galeries Micro CSB<sup>®</sup> entérobactéries constituées de cupules contenant des antibiotiques déshydratés. Pour chaque antibiotique deux concentrations étaient étudiées (CCI et CCS).

Ainsi, nous avons déterminé le profil de sensibilité de deux souches de référence (*Escherichia coli* 25922 ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC) et de deux souches cliniques (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) avec les Micro CSB<sup>®</sup> entérobactéries.

Les résultats ont montré que toutes les souches (référence et clinique) étudiées étaient sensibles aux différents antibiotiques testés aussi bien avec la méthode d'antibiogramme standard qu'avec les microplaques CSB avec une durée d'incubation de 6 heures pour cette dernière technique. Ce qui montre une bonne concordance avec ces deux techniques.

L'utilisation des microplaques CSB entérobactéries en 6 heures d'incubation permet de disposer du profil de sensibilité des souches bactériennes de cette famille. Ce qui constitue un gain de temps appréciable pour la prise en charge de l'infection causée par ces germes par le clinicien qui va disposer du résultat du profil de sensibilité du germe identifié après 6 heures d'incubation.

Cependant, une étude devrait être réalisée avec l'utilisation d'un nombre significatif d'isolats présentant différents profils (sensible, intermédiaire et résistant) aux antibiotiques afin de comparer les résultats d'antibiogramme standard avec ceux des microplaques CSB entérobactéries.

Cette technique présente néanmoins des inconvénients avec la non détection des souches d'entérobactéries productrices de BLSE.

Malgré ces insuffisances, l'amélioration de cette technique microméthode pourrait être une alternative pour les laboratoires des pays à ressources limitées pour une bonne prise en charge des patients avec détermination du profil de sensibilité des bacilles à Gram négatif isolés de prélèvements à visés diagnostic.

## Références bibliographiques

- 1) **Auajjar N, Attarassi B, Elhaloui N E, Badoc A.** 2006. Multi résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers *Bull Soc. Pharm.* 145 : 61-76.
- 2) **Bentley R, Bennett J W.** 2003. « *What Is an Antibiotic? Revisited* », *Adv in Appl Microbiol*, 52:303-331.
- 3) **Bosgiraud C, Vidon D, Choisy C.** 2003. *Escherichia coli*. page:155–162. In Choisy C, Vidon D. *Microbiologie générale et santé* ; Editions ESKA, Paris.
- 4) **David C. Hooper.** 2003. **Quinolone.** In David C. Hooper, Ethan Rubinstein. *Antimicrobial Agents*. Editeur ASM Press, 3<sup>e</sup> édition, p 41-67.
- 5) **Drame B.** Microméthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques, Thèse Pharmacie n° 86, 2001, Dakar,.
- 6) **Gillespie, S.H.** 2005. Antibiotic résistance. *Methods and protocols*. Human Press, Totowa, New Jersey. 287 p.
- 7) **Gueye Oulimatou,** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif, Thèse de Pharmacie n°36, 2007, Dakar.
- 8) **Husson M, Harf-Monteil C, Monteil H.** 2007. Le genre *Pseudomonas*. p 1123-1133. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Précis de Bactériologie Clinique*, Editions EKSA, Paris.
- 9) **Levy, S.** 2002. *The Antibiotic Paradox: How Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers* Perseus Cambridge, 2nd Edition. Page 353.
- 10) **Livrelli V, Bonnet R, Joly B, Darfeuille-Michaud A.** 2007. *Escherichia coli* et autres *Escherichia*. p 989-1011. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Précis de Bactériologie Clinique*, Editions EKSA, PARIS.
- 11) **Lorian, V.** 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5<sup>th</sup> édition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. 889 p.
- 12) **Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H., Pfaller M A, and Tenover F C.** 2003. *Manual Of clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> édition .American Society for Microbiology, Washington D.C. 2113 p.
- 13) **Ndir Ibrahima,** Mise au point micro méthode d'identification des entérobactéries, Thèse Pharmacie., n°5, 1996, Dakar.
- 14) **Nordmann, P.** 2006. Bêta-lactamines et *Pseudomonas aeruginosa*. Page 163-179. In Courvalin P, Leclercq R, Bringen E. *Antibiogramme*. 2<sup>ème</sup> Edition. Editions EKSA, Paris.

- 15) **Pagès J M.** 2004. « Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques », *Méd Sciences*, 20 : 346-351.
- 16) **Philippon A.** 2006. Bêta-lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. Page 179-205. In Courvalin P, Leclercq R, Bringen E. *Antibiogramme*. 2<sup>ème</sup> Edition. Editions EKSA, Paris.
- 17) **Robert J, Gayral JP, Carret G, Flandrois JP, Le Noc P, Albertini MT, Gallice E.** 1986. Rapid ATB. A new system of antibiotic testing in 4 hours. Description and parameters of variation. *Pathol Biol* 34(5):600-3.
- 18) **Robert J, Le Noc P, Carret G, Couix C, Flandrois JP, Gayral JP.** 1985. Evaluation of the Rapid-ATB system for testing the sensitivity of staphylococci to antibiotics. Comparison with the agar dilution reference method. *Pathol Biol* 33(9):906-10.
- 19) **Robert J, Le Noc, Carret G.** 1985. Evaluation of a new rapid antibiogram method, the Rapid-ATB system. Comparison with the agar dilution reference method and the standard antibiogram. *Pathol Biol* 33(5):350-3.
- 20) **Seck Kène Bougoul,** Microméthode d'étude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes, des staphylocoques et des entérobactéries. Thèse Pharm, n°54, 2004, Dakar.
- 21) **Sow Mame Fatou,** Utilisation de Méthodes Biométriques pour la Validation de l'Identification de Cocci à Gram positif. Thèse Pharm, n° 48, 2007, Dakar.
- 22) **Vincent T. Andriole.** 2006. The Quinolones. In Vincent T. Andriole; Editeur Butterworth-Heinemann, 3<sup>e</sup> édition. p 517.