
JE DEDIE

CE

TRAVAIL.....

A Dieu et à son Prophète Mohamed (P.S.L.)

A mon grand-père El Hadji Dame THIAM

Si je suis là aujourd'hui c'est parce que le bon DIEU a entendu tes prières.
Mame quand je te vois vieillir et devenir maladif, j'ai un pincement au coeur et j'ai mal.
Je continue à implorer le bon DIEU pour qu'il te garde encore avec nous et que je puisse continuer à ;te montrer combien tu m'es cher.

A ma grand-mère Rokheya SECK :

« In Memorium »

Que la terre de Pikine te soit légère et que DIEU t'acueille dans son paradis à coté du Prophète(P.S.L.). Que ton ame repose en paix.

Amine

A ma grand-mère Mariétou THIAM

Pour ton soutien durant les moments les plus difficiles de notre vie.

A mon Père Alioune THIAM

Ta simplicité, ta modestie, ton humilité et ton honéteté mon beaucoup marqué. Ta récompense devrait dépasser ce travail. Tu as consenti maints sacrifices pour la réussite de tes enfants. Que DIEU te laisse à nos cotés.

A ma mère Nogaye WADE

« In Memorium »

Que DIEU t'acueille dans son paradis à coté du prophète. Que la terre de la ville sainte de Touba te soit légère.

Que ton ame se repose en paix.

Amine.

A ma tante Sophie SOW

Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Je n'ai jamais ressenti l'absence de ma maman puisque vous l'avez toujours été pour moi.

Merci de ta patience, de ton indulgence. Merci d'avoir sacrifier ta vie pour moi.

Je t'aime comme une véritable Maman. Tu as été à la fois un père et une mère pour moi et Dieu en témoigne. Ta récompense devrait dépasser ce travail. Que le bon DIEU te laisse encore à nos cotés.

A mon grand-frère Amath THIAM.

« In Memorium »

S'aurait été ta présence mais nous ne pouvons rien contre la volonté du Seigneur. Merci de tes conseils et que ton ame repose en paix. Que DIEU t'acueille dans son paradis à coté du Prophète. Que la terre de Pikine te soit légère.

Amine.

A mon père Mapenda THIAM et son épouse Adama DIAW

Merci de vos conseils et de vos soutiens.

A Assane WADE et Dame THIAM

A mon Père Ass THIAM.

Merci de ton soutien.

A feu Macoura THIAM.

A mes frères et sœurs : Ablaye, Kalidou Alassane (Alex), Mbathio, Falilou, Pape Mamadou, Pape Ablaye, Pape Oumar, Ramatoulaye, Rokhaya, Mohamed, El Hadji Malick et Coumba Aïcha ce travail est le vôtre.

A mes tantes paternelles.

Marie THIAM et sa famille.

Ndèye Marième THIAM et sa famille.

Rama THIAM et sa famille.

Alarba THIAM et sa famille.

Maguette THIAM et sa famille.

Mbathio THIAM et sa famille.

Fatou THIAM et sa famille.

Merci de votre soutien.

Aux familles : DIAW, SOW, DIOKHANE, NDIAYE.

A mon Père Mor THIAM et sa famille. Je leur dis merci.

A mon oncle Amar Asta WADE et sa famille ; ce travail est le vôtre. Que DIEU te laisse à nos cotés.

A mes tantes maternelles :

Khady THIAM et sa famille.

Sokhna THIAM et sa famille.

Cheikh Amadou KOUROUMA et sa famille.

Merci de tes conseils.

A mes amis qui ont été toujours fidèles à notre amitié :

Amadou DIA, Amadou T. MBAYE, Papis KOUROUMA.

A feu Ousmane DIALLO.

A Ousmane DIOUF et sa femme.

A tous mes compagnons de classe de la C.I.

Aux familles MBAYE, DIALLO, GUEYE, DIAGNE, SALL, NDIAYE.

Je leur dis merci.

A mes co-thésards : Mor DIEYE, Mademba NDIAYE, Ameth SOW (E.F.T.P.), Ahmad M. THIONGANE (L.T.), Lamine DIOUF, Bernard CAMPAL mon amie Katy DIOUF, et tous ceux qui ont partagé ces moments d'études pharmaceutiques longues et pénibles. Je leur dis merci.

A ceux qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'élaboration et la rédaction de ce travail.

Au personnel du Laboratoire National de Contrôle de Médicaments : Docteur Mamadou F. BARRY, aux techniciennes Maty, Mme SANTOS, Mère DIOR.

Au pharmacien Ndèye Khoudia DIOKHANE Grande Pharmacie Sahn et son personnel.

Merci pour votre encadrement et votre soutien durant mon stage de fin de cycle.

A toute personne à qui j'ai fait connaissance depuis ma naissance. Je leur dis merci

SOMMAIRE

INTRODUCTION	8
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	10
I - DEFINITION	10
I.1 - Asepsie – Antiseptie	10
I.2 Désinfection	10
II - MODE D’ACTION DES ANTISEPTIQUES	12
II.1 ALTERATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE	13
II.2 ACTION SUR LE METABOLISME	14
II.3 OXYDATION ET DENATURATION DES PROTEINES	14
III - CLASSIFICATION	14
III.1 OXYDANTS	15
III.1.1 Peroxyde d’hydrogène et Dérivés	15
III.1.2 Chlore et dérivés	16
III.1.3 Iode	17
III.2 - Alcools	18
III.3 - Métaux lourds et leurs sels	19
III.4 - Agents tensio-actifs	21
III.4.1 - Tensio-actifs cationiques de charges positives	21
III.4.2 - Tensio-actifs anioniques de charges négatives	22
III.4.3 - Tensio-actif amphotère	22
III.5 - Savons	22
III.6 - Phénols	23
III.7 - Chlorhexidine	23
III.8 - Carbanilides.....	23
III.9 - Les Salicylanides	24
III.10 - Hexamidine	24
III.11 - Les colorants	24
III.12 - 8 hydroxy quinoléine.....	25
IV - METHODES D’ETUDE IN VITRO	26
IV.1 - CHOIX DES SOUCHES (27).....	26
IV.2 - METHODE DU COEFFICIENT PHENOL (16).....	27
IV.3 - METHODE DE FILTRATION SUR MEMBRANE.....	27
IV.4 - METHODE DE DILUTION NEUTRALISATION	28
IV.5 - METHODE DITE DE PORTE GERMES (16)	28
IV.6 - METHODE DE DENOMBREMENT	28
IV.6.1 - Méthode de dénombrement utilisé dans la dilution neutralisation.....	28
IV.6.2 - Méthodes des empreintes (27).....	28
IV.6.3 - Méthode de l’écouvillonnage	29
IV.6.4 - Epreuve de rinçage	29
IV.7 - METHODE DE MESURE PAR UN ENSEMENCEMENT A SITES MULTIPLES (24)	30
V - FACTEURS INFLUENÇANTS	31
V.1 - MICRO-ORGANISME	31
V.2 - L’ANSEPTIQUE.....	31
V.3 - ENVIRONNEMENT	32
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONEL	33
I - APPAREILLAGE ET VERRERIE	33
I.1 - APPAREILLAGE	33
I.2 - VERRERIE A PETIT MATERIEL	33
I.3 – STERILISATION	34

II - ANTISEPTIQUES.....	35
II.1 - Bromure de Céthexonium (BIOCIDAN®)	35
II.2 – CHLORAMINE (HYDROCLONAZONE®)	35
II.3 – ACIDE PARA HYDROXY BENZOÏQUE (NISAPULVOL®)	36
II.4 – OXYDE DE ZINC (DERMOCUIVRE®)	37
II.5 – CHLORURE DE BENZALKONIUM (Dermobacter®).....	37
III - NEUTRALISANTS.....	38
IV - DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DES ANTISEPTIQUES (2)...	39
IV.1 – PRINCIPE	39
IV.2 – CONDITIONS OPERATOIRES.....	39
IV.2.1 – Souches de référence	39
IV.2.2 – Milieux de culture.....	39
IV.2.2.1 – Gélose pour entretien des souches	39
IV.2.2.2 - Gélose pour dénombrement	40
IV.2.2.3 - Liquide de préparation des suspensions Bactériennes	40
IV.3 - PREPARATION DE L'INOCULUM.....	41
IV. 4 - ESSAI PRELIMINAIRE.....	41
IV.5 - ESSAI PROPREMENT DIT.....	42
V - DETERMINATION DE L'ACTIVTE FONGICIDE DES ANTISEPTIQUES (3).....	45
V.1 - PRINCIPE	45
V.2 - CONDITIONS OPERATOIRES.....	45
V.2.1 - Souche	45
V.2.2 - Milieux de culture.....	45
V.2.2.1 - Milieu de SABOURAUD	45
V.2.2.2 - Gélose pour dénombrement des cellules de levures.....	46
V.2.2.3 - Liquide de préparation des suspensions de levures.....	46
V.3 - Préparation de l'inoculum	46
V.4 - Essai préliminaire	47
V.5 - Essai proprement dit.....	47
VI - DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPORICIDE DES ANTISEPTIQUES	51
VI.1 - PRINCIPE.....	51
VI.2 - CONDITIONS OPERATOIRES	51
VI.2.1 - Souche.....	51
VI.2.2 - Milieux de culture	52
VI.2.2.1 - Bouillon pour inoculum de <i>Bacillus</i>	52
VI.2.2.2 - Gélose pour préparation de spores de <i>Bacillus</i>	52
VI.2.2.3 - Gélose pour dénombrement des spores.....	53
VI.2.4 - Dilution des suspension de spores	53
VI.3 - PREPARATION DE L'INOCULUM.....	54
VI.4 - ESSAI PRELIMINAIRE.....	54
VI.5 - ESSAI PROPREMENT DIT.....	55
RESULTATS SUR L'ACTIVITE IN VITRO DES DIFFERENTS PRODUITS TESTES	
.....	59
I- RESULTATS PRELIMINAIRES	59
II - RESULTATS PROPREMENT DIT :.....	64
DISCUSSION.....	74
A - ETUDE COMPAREE DES DIFFERENTES METHODES.....	74
I - METHODES AFNOR	74
I.1 - Validité des essais préliminaires	74
I.2 - Validité des essais proprement dits	74
I.3 - Avantages	75
I.4 - Limites de la méthode	75
II - AUTRES METHODES.....	76

B - ANALYSE DES RESULTATS	77
I - BROMURE DE CETHEXONIUM	77
II - OXYDE DE ZINC.....	78
III - L'ACIDE PARAHYDROXY BENZOÏQUE.....	78
IV - CHLORURE DE BENZALKONIUM	79
V - CHLORAMINE	80
CONCLUSION.....	81
BIBLIOGRAPHIE.....	83

INTRODUCTION

L'importance de l'usage des substances appelées antiseptiques ne fait que croître depuis quelques années. Ceci entraîne une conséquence indispensable : l'application de leur activité. (12, 42)

Les antiseptiques sont des médicaments destinés à l'usage externe, qui agissent de façon non spécifique et non sélective tant sur les germes pathogènes que sur la flore microbienne normale de la peau, dont ils rompent l'équilibre. Ils sont utilisés à des fins préventives vis à vis des infections ; cependant certains permettent de contribuer au traitement des infections localisées, superficielles ou profondes. Ils doivent répondre à un certain nombre de critères. Il leur faut posséder une efficacité antibactérienne, antifongique, et antivirale vis à vis des micro-organismes présents sur le revêtement cutané et muqueux. Cette activité doit être obtenue rapidement et maintenue.

En 1985 le marché français avait été évalué à 14000 antiseptiques et désinfectants soit 23,5 Milliard de F.cfa. Ce sont donc des produits largement utilisés, à l'hôpital d'abord mais aussi dans différentes industries. (16)

L'emploi fréquent d'antiseptiques est le maillon primordial de la chaîne d'hygiène à l'hôpital car c'est la contamination manuportée qui représente la première cause de surinfection hospitalière. (47)

Aux USA, la Société Américaine de Microbiologie (ASM) après une étude ayant porté sur 16 hôpitaux américains, conclut que chaque hôpital utilisait en

moyenne 14,5 formulations différentes d'antiseptiques. (ce chiffre varie de 8 à 22).

Dans ce cadre le LNCM., (Laboratoire National de Contrôle des Médicaments) veut se rassurer en mettant en œuvre des techniques pour déterminer l'activité bactéricide, fongicide et sporicide des antiseptiques. Il peut utiliser des techniques soit in vitro soit in vivo.

Nous avons utilisé une technique in vitro : la méthodologie de la norme AFNOR NFT-72.150, NFT-72.200, NFT-72.230 qui sont les méthodes par dilution neutralisation consistant en une détermination de l'activité bactéricide fongicide et sporicide des antiseptiques utilisés à l'état liquide, miscible à l'eau et neutralisables. (2, 3, 4)

Le but de ce travail est de standardiser les différentes méthodes mises en œuvre pour un contrôle de qualité de cinq formes d'antiseptiques (comprimés, poudre, pommade, solution, collyre), sur des souches référencées de collection.

Ce travail comprend trois parties :

- ⇒ La première est consacrée à une revue bibliographique relative aux antiseptiques
- ⇒ La deuxième traite la méthodologie
- ⇒ La troisième expose et commente les résultats de la technique.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I - DEFINITION

I.1 - Asepsie – Antiseptie

Un milieu est dit septique lorsqu'il contient des micro-organismes et/ou des spores : il est aseptique dans le cas contraire.

Des conditions rigoureuses d'asepsie sont requises en milieu hospitalier, dans les services dits à haut risque.

Dans les paillasses, on cherche, par tous les moyens possibles, à éviter les souillures lors des manipulations par les micro-organismes.

L'antiseptie vise à éradiquer les micro-organismes constituant la flore normale des tissus vivants (la peau et les muqueuses) et, à éviter leur pénétration dans l'organisme et leur transmission à d'autres personnes ou à l'environnement.

Les agents antiseptiques sont donc des substances chimiques capables de détruire les micro-organismes ou d'arrêter leur développement ou leur action.

Selon l'AFNOR (Association Française de Normalisation), on appelle « antiseptique » tout produit ou procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans les conditions définies. (1)

Le résultat de cette opération est limité aux formes végétatives et aux spores présents au moment de l'opération.

I.2 Désinfection

Le terme « désinfection » est donc un terme générique désignant toute action à visée antibactérienne, antifongique et antivirale quelque soit le niveau de

résultat utilisant un produit pouvant justifier in vitro des propriétés autorisées à le qualifier de désinfectant ou antiseptique soit une réduction de la flore 99,999% (abaissement de la flore de 10^5). Il devrait toujours être accompagné d'un qualificatif (désinfection de matériel, sols, locaux, mains, plaies etc...).

Les désinfectants sont des produits utilisés sur des supports inertes exclusivement (sols, matériels), les produits ayant des propriétés antimicrobiennes et toxicologiques adéquates pour un usage sur les tissus vivants sont appelés antiseptiques.

La désinfection vise à éradiquer les micro-organismes présents sur les matériels médico-chirurgicaux et risquant d'être introduits dans l'organisme lors de leur utilisation. Si la qualité première des désinfectants est leur qualité antimicrobienne, pour autant ils ne doivent ni dégrader les matériels par un pouvoir corrosif excessif, ni présenter un risque de toxicité pour le personnel et les malades lors de leur utilisation. (23)

La désinfection d'une surface inerte avec un désinfectant est donc une opération au résultat momentané de même que celle d'un revêtement cutané ou d'une plaie avec un antiseptique. Elle doit entraîner une diminution de la flore présente et donc du risque infectieux d'origine exogène.

Les désinfectants et les antiseptiques en raison de leur toxicité, ne peuvent être administrés à l'homme que par voie générale. (1)

Selon l'AFNOR, un désinfectant est un produit au procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions déterminées.

L'antisepsie et la désinfection, ainsi que la stérilisation sont des composantes de l'asepsie dont l'objectif est en s'appuyant sur un ensemble de procédures

médicales et chirurgicales rigoureuses afin d'éviter la pénétration des microbes dans l'organisme.

II - MODE D'ACTION DES ANTISEPTIQUES

Tous les agents antibactériens chimiques ne peuvent pas servir comme antiseptiques.

Certains comme les cyanures sont de redoutables poisons dont la toxicité élevée interdit leur emploi.

Le choix dépendra de l'usage de la technique. Il n'existe pas en effet d'agents idéals capables d'agir aussi efficacement dans tous les cas. Certains sont très actifs mais toxiques pour les tissus, donc utilisables sur les seuls objets inanimés. D'autres ont un pouvoir pénétrant élevé : ils sont solubles mais instables.

D'autres sont rapidement inactivés au contact de matières organiques.

D'autres, enfin, peuvent être corrosifs ou teinter les corps avec lesquels ils entrent en contact, engendre une chaleur ou une sensation désagréable.

L'antiseptique idéal devrait donc posséder tout un ensemble de finalité difficile à réunir. La plus importante serait un spectre antibactérien étant (Gram positif, Gram négatif, mycobactéries) de nature bactéricide, ainsi qu'une activité fongicide, sporicide et virucide ; en fait il est regrettable qu'il n'existe pas encore.

L'activité des antiseptiques vis à vis des micro organismes peut s'exercer selon des modalités extrêmement diverses. (38)

Les antiseptiques ont une toxicité non sélective liée à un mécanisme d'action beaucoup plus brutal et la désinfection étant une opération au résultat

momentané permet d'éliminer ou de trier les micro organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés en fonction des objectifs visés.

Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération, et est moins spécifique que celui des antibiotiques.

Leurs cibles sont donc multiples, par opposition aux antibiotiques dont les qualités principales sont de «frapper vite, fort et juste» en d'autres termes les antiseptiques ont une cible spécifique ou bien une cible privilégiée.

L'action des antiseptiques et désinfectants ne s'exerce en général que pour des concentrations élevées et est beaucoup plus rapide que celle des antibiotiques ; selon les produits , la concentration et le temps de contact, elle peut être bactériostatique ou bactéricide, fongistatique ou fongicide, sporistatique ou sporicide.

Etant donné les conditions d'utilisation, ces produits ont une activité bactéricide rapide en quelques minutes et si possible également sporicide, fongicide et virucide. (18)

Cependant il est possible de généraliser et d'établir un certain nombre de schémas qui rassemblent à peu près tous les mécanismes actuellement connus. (38)

II.1 ALTERATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

L'altération de sa structure entraîne une fuite, une désorganisation du métabolisme, la dégénérescence de la cellule et finalement sa mort.

Les agents liposolubles (composés phénoliques, savons et surtout les détergents) agissent directement, puisque la membrane n'est autre qu'une barrière lipoprotéinique. (38)

II.2 ACTION SUR LE METABOLISME

Les cyanures, les fluorures sont de véritables poisons respiratoires, inutilisables comme agents antiseptiques. Les colorants boriques (bleu de méthylène, violet de gentiane) réagissent au contact des acides ribonucléiques présents en abondance dans le cytoplasme. (38)

Ces combinaisons inactivent toutes les fonctions de la bactérie. D'autres sont des agents mutagènes (acide et dérivés), des agents chelateurs (dérivés de la quinolone)

II.3 OXYDATION ET DENATURATION DES PROTEINES

Les agents oxydants comme l'eau oxygénée, les dérivés halogènes oxydent les groupements SH libres des enzymes et les altèrent irréversiblement.

Les métaux lourds comme le mercure et ses dérivés organiques ou inorganiques se combinent avec ces même groupements SH et les inactivent.

Les alcools agissent d'une façon comparable à celle de la chaleur en coagulant les protéines.

III - CLASSIFICATION

Il est possible de définir un certain nombre de groupes d'agents désinfectants ou antiseptiques sur la base de leur parenté chimique et de leur mode d'activité précédemment définis. Seuls les plus courants seront décrits. (18, 22, 38)

III.1 OXYDANTS

Les oxydants exercent leur action par libération d'oxygène naissant qui réagit avec des protéines et les cystéines enzymatiques cellulaires. Ils sont fortement inactivés par les matières organiques. (16, 20, 37)

III.1.1 Peroxyde d'hydrogène et Dérivés

Le peroxyde d'hydrogène et tous les composés susceptibles de donner naissance à de l'eau oxygénée (Perborates et persulfat alcaline) sont des antiseptiques puissants.

- Le peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse et utilisé comme antiseptique à 3% ($3\% \cong 10$ volumes) et comme désinfectants en solution à 6-10%. Sa décomposition est rapide dans l'intestin d'où sa toxicité. Au contact avec la peau ou les muqueuses, il peut provoquer des irritations ou des brûlures. Son action sur les yeux et particulièrement dangereux.
- Le permanganate de potassium est utilisé comme antiseptique en solution aqueuse à 0,01%. Son utilisation est limitée du fait de la coloration cutanée intense qu'il provoque et de la sécheresse des téguments.
- Le peroxyde de Benzoyle est un agent oxydant utilisé dans le traitement de l'acné mais pouvant entraîner une décoloration des cheveux et de certaines fibres textiles.
- L'Ozone (O_3) est utilisé comme désinfectant pour traiter l'eau de consommation, il a de plus l'avantage de détruire les substances qui colorent l'eau ou génératrice de mauvais goût. (6)

III.1.2 Chlore et dérivés

Le chlore est un antiseptique découvert par O.W. HOLMES à Boston en 1835 et utilisé par SEMMELWEIS à Vienne en 1847. (6)

Le chlore est l'un des antiseptiques les plus connus. Il est universellement employé pour la stérilisation des eaux de boisson, des eaux de piscines, le traitement des eaux polluées et des objets contaminés (Tableau I ci-dessous)

Tableau 1 : différentes formes de chlore en solution dans l'eau.

Chlore	Composition	Formule	Activité
Chlore actif	Chlore élémentaire	Cl ₂	+++
	Acide hypochloreux	HClO	(maximal)
Chlore libre	Chlore élémentaire	Cl ₂	++
	Acide hypochloreux	HClO	(suivant teneur en HClO)
	Hypochlorites	ClO	
Chlore combiné	Monochloramines	NH ₂ Cl	+
	Dichloramines	NHCl ₂	(faible)
	Trichloramines	NHCl ₂	
Chlore total	Chlore élémentaire	Cl ₂	++
	Acide hypochlorique	HClO	(suivant la teneur en HClO)
	Hypochlorite	ClO	
	Hypochlorique		
	Chloramines		

Sous forme gazeuse, le chlore est un produit dangereux, de manipulation délicate. Les composés liquides sont les hypochlorites de calcium en chlorure de chaux et en mélange d'hypochlorite de chlorure et d'hydroxyde de calcium.

L'hypochlorite de sodium, mieux connue sous le nom d'eau de javel, inventé en France en 1789 par BERTHOLET titre 10-20° chlorométrique (le degré

chlorométrique exprime le nombre de litres de chlore dégagé par kilogramme de produit. (6)

Le dioxyde de chlore est un désinfectant actif utilisé dans la stérilisation de l'eau. Il est capable en outre de supprimer les goûts désagréables en détruisant les substances qui les engendrent.

En thérapeutique, on fait appel à des solutions d'hypochlorite plus diluées comme la liqueur de Labarraque ou soluté de Dakin.

Les chloramines constituent une seconde catégorie de composés chlorés. Les atomes d'hydrogène de leur groupement aminé, sont remplacés par des atomes de chlore. Les chloramines ont une activité plus prolongée que les hypochlorites mais leur efficacité est généralement moins élevée.

Tous les composés chlorés agissent selon un mécanisme rigoureusement semblable en formant de l'acide hypochloreux (ClOH)

L'oxygène naissant libéré au cours de cette réaction a un pouvoir oxydant intense. Les formes sporulées sont plus résistantes : elles exigent pour leur inactivation des doses 100 fois plus élevées. (18)

III.1.3 Iode

L'iode est un désinfectant, par son action principalement bactéricide et fongicide. Les formes utilisées sont :

- Teinture d'iode à 5% dans l'alcool 95°
- Alcool iodé 1% dans l'alcool 60°

Cependant l'iode libre a l'inconvénient d'être toxique et irritant pour les tissus. Le plus utilisé est le polyvinylpyrrolidone iode (PVPI)

- 4% solution moussante

- 10% en gynécologie et dermatologie
- 1% en ophtalmologie

Les iodophores sont des produits relativement récents formés de complexes d'iode et de substances qui assurent la solubilité et le transport. Ils ont l'avantage d'être moins irritants et d'avoir un faible pouvoir colorant ; l'iode étant libéré par les molécules de façon lente et progressive, il n'y a pas d'accumulation d'iode libre.

III.2 - Alcools

Dans ce groupe nous pouvons utiliser soit des :

- Monoalcools (éthylrique, méthylique, propylique, isopopylique, benzylique).
- Dialcool (glycols)

Ils sont bactéricides sur les formes Gram négatifs des bactéries. Ils agissent par dénaturation des protéines. Cette action exigeant une certaine quantité d'eau ; ainsi l'alcool éthylique légèrement dilué (60°-70°) est plus actif que l'alcool absolu. (6)

Dans le domaine alimentaire l'éthanol est utilisé pour la conservation (des fruits).

III.3 - Métaux lourds et leurs sels

Tableau 2 : principaux métaux et sels de métaux lourds

Métal	Composés	Usage
Mercure	<ul style="list-style-type: none"> • Inorganiques : <ul style="list-style-type: none"> Chlorure mercurique Biodure de mercure Cyanure de mercure Oxyde de mercure • Organiques : <ul style="list-style-type: none"> - Aromatiques : <ul style="list-style-type: none"> Mercurescéine Mercurobutol Borate de phényl Mercure - Aliphatiques : <ul style="list-style-type: none"> Merthiolate de sodium 	<p>Pommade antiseptique</p> <p>Antisiphilitique</p> <p>Désinfectant</p> <p>Ophtalmologie</p> <p>Antiseptique peau - muqueuse</p> <p>Antiseptique vaginal externe</p> <p>Antiseptique vaginal externe</p> <p>Antiseptique peau</p> <p>Antiseptique de la peau et muqueuses de même désinfectant et conservateur biologique</p>
Argent	<p>Nitrate d'argent</p> <p>Préparations colloïdales minérales ou organiques</p>	<p>1% en ophtalmie gonococcique du nouveau-né</p> <p>Principalement en ORL et ophtalmologie</p>
Cuivre	Sulfate de cuivre	Collyre pommade puissant antifongique
Zinc	<p>Sulfate de zinc</p> <p>Oxyde de zinc</p>	<p>Collyre</p> <p>Pommade cutanée</p>
Or	<p>Chlorure d'or</p> <p>Cyanure d'or</p>	Intérêt historique utilisé autrefois contre la tuberculose

Les sels des métaux lourds sont efficaces. Les plus connus sont les sels d'argent, de mercure, de cuivre, de zinc et même les sels d'or. Tous inactivent la cellule en précipitant les enzymes ou en se combinant avec les groupements

thiol (SH), ce qui explique que leur tonicité s'exerce aussi bien sur les cellules de l'hôte que sur les cellules bactériennes.

On distingue :

⇒ **Délivrés du Mercure (18)**

Ils sont de deux types :

- Sels et composés inorganiques ont un effet irritant voir toxique : chlorure mercurique, chlorure mercureux (calomel HgCl_2) oxycyanure, de mercure oxyde Jaune de mercure.
- Les dérivés organiques ou organomercuriels sont beaucoup mieux tolérés. Le mercure s'y trouve lié à un atome de carbone d'une chaîne aliphatique (alkylmercuriels) ou d'un cycle aromatique arylmercuriels).

Les principaux sont :

- Le mercurothilate sodique ou Thiomersal (Merthiolate*)
- La mercurescéine sodique ou membranaire (Mercurochrome*)
- Le nitrate de phénylmercure (Méthaphène*)
- Le borate phénylmercure (Merfène*)
- Le mercurobutol (Mercryl*)

⇒ **Dérivés de l'argent (18)**

Leur activité est due à l'ion Ag^+ qui se fixe sur divers groupements des protéines (notamment enzymatiques) et de l'ADN.

Divers sels minéraux et organiques sont utilisés (surtout le nitrate, parfois le tartrate, le lactate), les protéinates d'argent et l'argent colloïdal.

Un complexe argent-sulfadiazine est proposé pour le traitement des brûlures.

⇒ **Dérivés du cuivre et zinc**

Ils sont employés aujourd'hui du fait de leur sensibilité, leur stabilité et leur bonne tolérance. Le zinc et le cuivre sont souvent utilisés en association sous forme de pommade en dermatologie. Par contre le sulfate de zinc est souvent utilisé en ophtalmologie.

III.4 - Agents tensio-actifs

Les surfactifs sont des composés amphotères.

Un pôle hydrophile ionique ou polaire (carboxylats, sulfates, ammonium quaternaires, hydroxyles amines etc.) qui permet à la molécule portée d'être soluble dans l'eau. (34)

Un pôle hydrophobe ou apolaire comme les longues chaînes carbonnée $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n$ - dits « grasse » qui rendent la molécule portée soluble dans les solvants apolaires (benzene, hexane ect.).

On distingue selon la charge électrique

III.4.1 - Tensio-actifs cationiques de charges positives

Ce groupe est constitué principalement des ammoniums quaternaires dont la structure pentavalente avec un azote dont l'un des radiaux fixés sur cette chaîne est une longue chaîne carbonnée linéaire ou cyclique. Ces surfactifs sont les plus importants.

Exemple : Bromure de céthexonium (Biocidan*)

Chlorure de Benzalkonium

III.4.2 - Tensio-actifs anioniques de charges négatives

Leur activité étant souvent modérée en raison de leur association pour renforcer l'action d'autres antiseptiques, en favorisant leur dissolution ou leur préparation. Ce sont des détergents : (38)

Exemple : Mercryl Laurylé (Lauryl sulfate de sodium + Mercurobutol)

III.4.3 - Tensio-actif amphotère

Le pôle hydrophile comporte à la fois une charge positive et une charge négative.

Ces tensio-actifs sont plus actifs sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Pseudomonas et Serratia peuvent se développer dans les solutions de ces produits.

III.5 - Savons

Les savons sont des sels sodiques ou potassiques d'acides gras de poids moléculaire élevé.

Exemple : - Acide oléique

- Acide Linoléique
- Acide Ricinoléique

Le ricinoléate de sodium possède des propriétés antiseptiques propres, et est utilisé en hygiène buccopharyngée. (38)

III.6 - Phénols

Les phénols sont découverts en 1867 par LISTER. Ces composés sont doués des propriétés bactériostatiques ou bactéricides marquées grâce à leur groupement phénol. Autrefois ils étaient utilisés comme des désinfectants extrêmement répandus et populaires. Actuellement le phénol est remplacé par des antiseptiques moins caustiques.

Ils sont peu actifs sur les formes sporulées mais bactéricides et fongicides. Leur action est favorisée par la présence de sels de sodium, inhibée en présence de soude et atténuée par les matières organiques. (18)

III.7 - Chlorhexidine

C'est un antiseptique à large spectre appartenant à la famille des Biguanides et est souvent employé sous formes de sels solides. On utilise le diglucomate (Hibitane*) en solution aqueuse ou alcoolique où son activité est meilleure.

Les matières organiques, les pH alcalins et les tanins les inhibent alors que les ammoniums quaternaires les renforcent. (18)

La chlorhexidine est active sur les bactéries à Gram positif et sur le *Candida albicans* mais pas d'activité sporicide.

Le contact du produit avec les yeux est à éviter.

III.8 - Carbanilides

Ce sont des diphénylurées. Le trichlorocarbanilide est le plus utilisé, (5) et constitue le principe actif de plusieurs spécialités :

Cutisan*

Nobacter*

Septium*

Solubacter*

Il se présente comme un antiseptique bactériostatique actif seulement sur les bactéries Gram positifs et de façon minime sur les bacilles Gram négatifs.

L'association avec les savons et les détergents est favorable. (18, 26, 29, 38)

III.9 - Les Salicylanides

Encore dénommés salicylanilides, ce sont des amides de l'acide salicylique et d'aniline. Mais les dérivés di et tribromés sont les plus utilisés. Nous avons aussi des dérivés chlorés et difluorométhylés.

Ils sont souvent utilisés en association avec les phénols et les ammoniums quaternaires. Les salicylanides sont des antiseptiques qui agissent surtout sur les bactéries Gram positif et sont de toxicité faible.

Ils se présentent sous forme de savons. (18, 45)

III.10 - Hexamidine

L'hexamidine (Hexomidine*) est un antiseptique actif surtout sur les Gram positifs. (6)

III.11 - Les colorants

La plupart sont utilisé comme antiseptique à usage local quelques un seulement par voie digestive.

Ils font parties des composés chimiques très diverses et leur degré d'activité est variable.

- Les dérivés du triphénylméthane

- Vert malachite, vert brillant : utilisés dans le traitement des plaies superficielles.
- Violet de gentiane : désinfectant à usage externe. Ces dérivés sont plus actifs sur les bactéries à gram négatif.
- Les dérivés de l'acridine (aminacrine, proflavine, diflavine, acriflavine) : ne sont bactériostatique qu'aux concentrations d'utilisation.

Leur mécanisme d'action est assez précis : ils empêchent la synthèse de l'ARN en se fixant sur l'ADN entre deux paires de bases adjacentes.

- L'éosine est un dérivé de la fluorescéine dont l'activité antibactérienne est très faible.

III.12 - 8 hydroxy quinoléine

Leur activité est liée à leur pouvoir chélateur sur les ions métalliques. Ils sont utilisés comme antiseptiques de la peau et des muqueuses (8-hydroxy quinoléine, oxyquinol et le chlorquinaldol) d'autres part pour le traitement d'infections urinaires ou intestinales (nitroxoline, clioquinol, methyloxine, chloquinaldol, broxyquinoline).

Les antiseptiques sont de type bactériostatiques plus actifs sur les Gram positif.

IV - METHODES D'ETUDE IN VITRO

L'établissement de méthodes d'études codifiées et fiables a été retenu comme premier objectif, ceci lors de la création de la société française de microbiologie, par le groupe d'étude des antiseptiques. (16)

Le groupe d'étude des antiseptiques a établi deux postulats dont découlent les principes des méthodes d'études :

- Un antiseptique ou un désinfectant doit entraîner la mort des micro-organismes présents au moment de l'application.

C'est donc une activité microbicide qui est exigée (et non une activité microbiostatique) ;

- Un antiseptique ou un désinfectant doit agir sur tous les micro-organismes y compris les virus ; il doit être bactéricide, sporicide et virucide. Dans le cas où son action serait sélective, cela doit être précisé.

Sur ces bases, il est apparu nécessaire d'étudier successivement les propriétés bactéricides, fongicides, sporicides et virucides des substances et préparations propres comme antiseptique ou désinfectant.

IV.1 - CHOIX DES SOUCHES (27)

La nécessité de limiter le nombre d'essais à un petit nombre de souches tout en conservant un large éventail de micro-organismes et en retenant ceux qui sont fréquemment reconnus comme responsables de problème microbiologique a conduit à sélectionner certaines souches appartenant aux espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, pour l'activité

bactéricide, *Candida albicans* pour l'activité fongicide ; *Bacillus subtilis* pour l'activité sporicide.

IV.2 - METHODE DU COEFFICIENT PHENOL (16)

Cette ancienne méthode utilise le phénol comme désinfectant standard et le bacille typhique comme germe test. Le choix date de l'époque où le principale désinfectant en usage est le phénol et la maladie infectieuse la plus répandue, la fièvre typhoïde.

La technique consiste à comparer dans des conditions identiques l'action d'une série de dilutions du phénol avec l'antiseptique testé.

Cette méthode est critiquable, parce que l'action du phénol, sur les micro-organismes, n'est pas obligatoirement comparable à celle du désinfectant que l'on étudie. D'autre part la sensibilité du bacille typhique choisi comme souche standard n'est pas nécessairement la même que celle d'un autre espèce.

IV.3 - METHODE DE FILTRATION SUR MEMBRANE

Elle est fondé sur la filtration des différentes concentrations d'antiseptiques ou désinfectants en présence de micro-organismes dans l'inoculum.

Ces membranes, lavées plusieurs fois sont ensuite déposées sur un milieu de culture contenant le neutralisant. Cette méthode est en général choisie en l'absence de neutralisant efficace, plusieurs lavages peuvent suffire à éliminer l'antiseptique.

Elle permet d'apprécier la vitalité de toute bactérie mise au contact de l'antiseptique mais ne convient pas pour les antiseptiques non filtrables.

IV.4 - METHODE DE DILUTION NEUTRALISATION

Cette méthode de suspension est utilisée pour la détermination d'activité bactéricide, fongicide et sporicide. Elle est couramment appliquée. (2, 3, 4)

IV.5 - METHODE DITE DE PORTE GERMES (16)

Les bactéries sont des substances inertes dites porte-germes puis mise au contact du désinfectant à étudier ou de ses dilutions durant un temps donné.

Les micro-organismes ont résisté ou survécu à l'agent antibactérien après culture. Ces portes germes ont des bandelettes de papier filtre de qualité standard que l'on immerge dans une culture de 24 h en bouillon d'une bactérie-test.

Ils sont utilisés tels quels à l'état humide ou après dessiccation durant 24 h à 37°C.

IV.6 - METHODE DE DENOMBREMENT

IV.6.1 - Méthode de dénombrement utilisé dans la dilution neutralisation

Elle se fait sur un milieu de culture gélosé de 15 ml de gélose pour dénombrement. Après incubation à la température optimale de culture des micro-organismes recherchés les colonies sont dénombrées. Cette méthode est plus utilisée. Pour cela nous utilisons un comptage de colonies pour dénombrer les micro-organismes.

IV.6.2 - Méthodes des empreintes (27)

Le ruban adhésif est appliqué sur une surface mesurée ou le matériau à examiner. On le fait adhérer par pression de la main puis l'ayant détaché, le

dépose sur un milieu de culture gélosé et sec durant quelques dizaines de secondes.

Après incubation à la température optimale de culture des bactéries recherchées, les colonies sont dénombrées. Cette méthode donne d'excellents résultats pour rechercher les salmonelles, les staphylocoques pathogènes, les streptocoques, les entérobactéries à l'aide de milieux sélectifs.

Les techniques plus récentes comme pétri-film permettent une récupération directe des germes sur un substrat de culture.

IV.6.3 - Méthode de l'écouvillonnage

Elle est utilisée pour l'examen des surfaces irrégulières. Dans ces conditions, nous arrivons à récupérer 50% des micro-organismes, dans des zones à explorer.

IV.6.4 - Epreuve de rinçage

L'épreuve de rinçage permet de rechercher d'une façon pratique l'action des ammoniums quaternaires sur les surfaces contaminées.

Elle consiste à utiliser de petits gobelets remplis, en premier lieu avec du lait écrémé stérilisé auquel nous ajoutons un mélange de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*.

Après 15 min de contact, le gobelet est vidé, rempli par exemple avec une solution d'ammonium quaternaires, puis vidé à nouveau.

Les bactéries présentes sur les parois internes après écouvillonnage et culture sont dénombrés. Le même essai est réalisé sur un gobelet témoin sans antiseptique.

IV.7 - METHODE DE MESURE PAR UN ENSEMENCEMENT A SITES MULTIPLES (24)

Un ensemenceur en Plexiglas comportant 32 tiges (dont les anses sont calibrées) de 3 mm de diamètre. Ces tiges immergés à 0,5 cm de profondeur dans un liquide aqueux transportent une goutte qui, déposée sur une plaque d'agar, donne un spot d'environ 6 à 7 mm de diamètre. Nous possédons également de plaques de Plexiglas creusés et de 64 cupules pouvant contenir 1 ml de liquide aqueux.

Pour chaque expérience nous disposons :

- de 2 ensemencements :

l'un pour mettre l'innoculum au contact de l'antiseptique

l'autre pour repiquer les survivants.

- de 2 plaques :

l'une qui reçoit les inocula

l'autre qui contient les différentes dilution de l'antiseptique et du tampon à pH=7.

Ce matériel, après lavage rigoureux, est stérilisé à l'oxyde d'éthylène ou par irradiation.

La plus petite concentration de l'antiseptique n'ayant permis la culture d'aucune colonie ou au maximum d'une colonie est à exprimer.

V - FACTEURS INFLUENÇANTS

L'action antimicrobienne dépend :

- ⇒ du micro-organisme lui-même
- ⇒ de l'agent antimicrobien
- ⇒ de l'environnement où se situe l'action.

V.1 - MICRO-ORGANISME

Une espèce bactérienne, par exemple, présente des sensibilités diverses vis à vis des agents antimicrobiens.

L'état physiologique influe sur la vitalité et sur la sensibilité. Les germes en phase exponentielle de croissance sont plus résistants aux agents microbiens que ceux âgés de 24 h en plus.

Les formes sporulées ont une résistance toute particulière aux agents physiques ou chimiques.

Dans une population bactérienne il peut aussi exister des différences individuelles de sensibilité.

Tous les autres facteurs étant assez semblables, plus le nombre de germes est élevé, plus le temps exigé pour leur destruction est allongée.

V.2 - L'ANSEPTIQUE

Pour chaque agent il faut définir un spectre d'activité c'est à dire la liste des espèces vis à vis desquelles il exerce son pouvoir bactéricide, fongicide, sporicide et virucide ou bactériostatique, fongistatique, sporostatique.

Les désinfectants (formol etc....) ou les antiseptiques (alcool etc....) ont un spectre très large : ils sont polyvalents. Certains facteurs influencent l'efficacité:

⇒ l'intensité pour les agents physiques

⇒ la concentration pour les agents physiques.

Un antiseptique peut être fongistatique, sporostatiques et bactériostatique à une concentration initiale et morbicide à concentration double.

La stabilité chimique de l'eau oxygénée à une action limitée à cause de sa décomposition rapide.

La solubilité qui favorise le contact et la pénétration du produit dans la cible cellulaire.

V.3 - ENVIRONNEMENT

Il conditionne l'activité de l'agent antiseptique, qu'il s'agit du milieu de culture dans lequel se développe, l'expérience du tissu au milieu duquel agit un antiseptique, de l'objet ou du matériel que l'on veut désinfecter.

La température peut augmenter ou inhiber l'activité . La turbidité du milieu peut s'opposer à la pénétration de l'antiseptique et à son contact avec le micro-organisme.

Nous soulignerons enfin l'effet important exercé par les matière organiques lorsqu'elles sont présentes dans le milieu. Elles sont susceptibles de réduire considérablement l'efficacité d'un agent antiseptique.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONEL

I - APPAREILLAGE ET VERRERIE

I.1 - APPAREILLAGE

- Appareil de stérilisation à chaleur sèche : four poupinelle
- Appareil de stérilisation à chaleur humide : autoclave
- Etuve bactériologique réglée à 37° C.
- Bain marie thermostat
- Balance analytique de précision
- Chronomètre
- Agitateur produisant une agitation de type vortex
- PH – mètre parfaitement calibré
- Centrifugeuse permettant de réaliser une accélération de l'ordre de 98 000 ms
- Microscope à contraste de phase
- Spectrophotomètre
- Boîtes de pétri rondes de 90 mm de diamètre
- Etuve bactériologique réglée à 30° C

I.2 - VERRERIE A PETIT MATERIEL

Matériel classique de laboratoire

Tubes stériles, fioles coniques de 50 ml, flacons

Pots de centrifugation en verre

Bille de verre 2 – 4 mm

Cuves pour spectrophotomètre.

Pour éviter les problèmes liés en réglage de la verrerie, nous avons utilisé dans la mesure du possible du matériel de verre neutre stérile à usage unique.

I.3 – STERILISATION

Stérilisation par la chaleur humide : autoclave

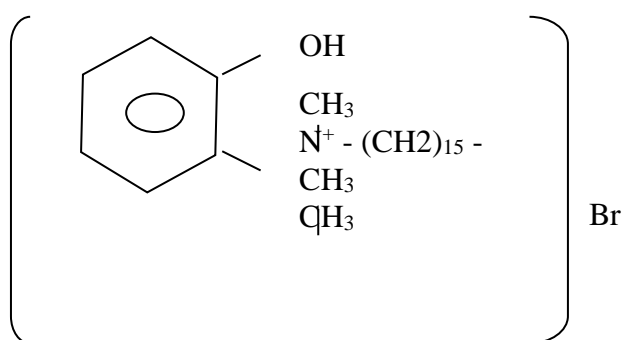
Stérilisation sèche 170° C au moins pendant 1h min : poupinelle

Stérilisation par filtration sur des membranes ayant des pores de 0,45µm (neutralisant).

II - ANTISEPTIQUES

II.1 - Bromure de Céthexonium (BIOCIDAN®)

Le bromure de cethexonium se présente sous forme de poudre blanche dont la formule est $C_{24}H_{50}BrNO$ et PM 448,59. Il est soluble dans l'eau, et dans le chloroforme.



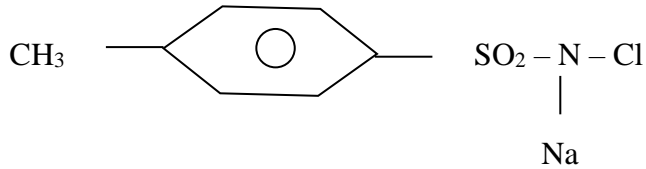
L'analyse du collyre du bromure de cethexonium (BIOCIDAN®) se fait à sa concentration initiale de 250 mg/l.

II.2 – CHLORAMINE (HYDROCLONAZONE®)

La chloramine se présente sous forme de poudre cristalline blanche de saveur amère et à faible odeur de chlore. Elle contient environ 25% de chlore actif et est soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther, le chloroforme et les substances huileuses. Une solution dans l'eau à 5% montre un pH compris entre 8 et 10.

Elle est stable en milieu alcalin mais est plus active en milieu acide. La Chloramine T est utilisée comme antiseptique des plaies et en clinique à la concentration de 1,5%. Elle a été également utilisée en bain de bouche à 1% pour faire disparaître la mauvaise haleine et pour son action spermicide.

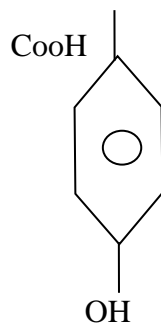
La chloramine T est utilisée à la dose de 0,01g/l en milieu légèrement acide pour désinfecter les eaux polluées et les transformer en eaux propres à la consommation.



La chloramine utilisée se présente sous forme de comprimés d'HYDROCLONAZONE®. L'analyse se fait en dissolvant un comprimé dans 500 ml d'eau distillée, puis attendre 1 h de temps pour son déroulement

II.3 – ACIDE PARA HYDROXY BENZOÏQUE (NISAPULVOL®)

L'acide para hydroxy benzoïque est peu soluble dans l'eau et est utilisé comme conservateur dans les lotions et crèmes cutanés.



Il se présente sous forme de poudre cristalline blanche ou de cristaux incolores peu soluble dans l'eau, soluble dans l'eau bouillante, soluble facilement dans l'alcool, l'éther et dans les huiles grasses.

L'acide para- hydroxy benzoïques étant la poudre de NISAPULVOL®, le principe actif est obtenu en dissolvant la poudre dans 50 ml de méthanol.

II.4 – OXYDE DE ZINC (DERMOCUIVRE®)

L'oxyde de zinc se présente sous forme de poudre lisse, amorphe, légère, blanche ou blanc jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'alcool. L'oxyde de zinc se dissout dans les acides minéraux situés de PM 81,4.

Fortement chauffé, l'oxyde de zinc prend une coloration jaune qui disparaît par refroidissement.

L'oxyde de zinc utilisé, est la pommade de DERMOCUIVRE®. Ainsi pour obtenir le principe actif il faut extraire 2g de cette pommade dans un mélange cyclohexane, acide chlorhydrique dilué dans les proportions 50 : 50. Nous recueillons la phase aqueuse pour les tests.

II.5 – CHLORURE DE BENZALKONIUM (Dermobacter®)

Le chlorure de benzalkonium se présente sous forme de poudre ou pâte gélatineuse de couleur blanche ou sous forme de crème d'odeur aromatique et d'un goût amer. Il est très soluble dans l'eau, l'alcool et l'acétone ; peu soluble dans le benzène, insoluble dans l'éther. Les solutions aqueuses sont alcalines et moussantes.

Le chlorure de benzalkonium utilisé est une solution donc l'analyse se fait directement.

III - NEUTRALISANTS

Ils sont divers et variés suivant la famille des antiseptiques :

- Le thiosulfate de sodium à 0,5 % pour la chloramine
- L-cystéine à 0,15 % pour l'oxyde de zinc
- Tween 80 à 3 % avec du jaune d'œuf frais à 5 % pour le bromure de céthexonium
- Tween 80 à 4 % avec du jaune d'œuf frais à 5 % pour l'acide parahydroxy benzoïque

La préparation se déroule dans des conditions aseptiques.

Remarque : préparation de la Lecithine

Nous avons utilisé un œuf de moins de 10 jours, bien nettoyé avec de l'alcool 70°, puis cassé pour recueillir le jaune dans un bœcher. Nous avons homogénéisé avec un agitateur stérile tout en y mettant le tween 80.

Un œuf suffit pour 100 ml de neutralisant.

Les neutralisants utilisés sont ceux préconisés par la norme AFNOR.

IV - DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DES ANTISEPTIQUES (2)

IV.1 – PRINCIPE

Cette méthode dérive de la classique méthode de dilution (ou méthode de suspension) utilisée pour la détermination de substances antibactériennes. Elle est maintenant utilisée pour la mise en œuvre des neutralisants pour supprimer les effets bactériostatiques des antiseptiques.

L'efficacité de ces neutralisants doit être appréciée au cours d'un essai préliminaire. Ce n'est qu'après ce test que l'on peut passer à l'essai proprement dit et déterminer la concentration bactéricide.

IV.2 – CONDITIONS OPERATOIRES

IV.2.1 – Souches de référence

<i>Escherichia coli</i>	ATCC	10539
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	9144
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	10541

Elles sont utilisées après trois (3) repiquages successifs sur milieu pour entretenir les souches et les gardées à l'étuve à 37°C.

IV.2.2 – Milieux de culture

IV.2.2.1 – Gélose pour entretien des souches

⇒ Composition

- Peptone tryptique de caseine 15 gr
- Peptone de soja 5 gr
- Chlorure de sodium 5 gr

- Agar-agar en poudre 18 gr
- Eau distillée qsp 1 000 ml

⇒ **Préparation**

- Dissoudre dans l'eau à ébullition.
- Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,1$.
- Répartir dans les tubes à essai en raison de 8 ml/tube.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 mn.
- Incliner en pente.

IV.2.2.2 - Gélose pour dénombrement

⇒ **composition**

- Extrait de levure déshydraté 2.5g
- peptone typique de caseine 5g
- glucose 1g
- Agar -Agar en poudre 18 g
- eau distillée qsp 1000 ml

⇒ **préparation**

- Dissoudre dans l'eau à ébullition .
- Ajuster le pH à $7.2 \pm 0,1$.
- Autoclaver à 120° pendant 20 min
- Répartir dans des flacons
- Garder en surfusion 40° 45° C puis mettre dans les boîtes de pétri.

IV.2.2.3 - Liquide de préparation des suspensions

Bactériennes

⇒ **Composition**

- Nacl 9 g
- Eau distillée 1000ml

⇒ **Préparation**

- Dissoudre dans l'eau à ébullition
- Ajuster le pH à $7.2 \pm 0,1$.
- Stériliser à 120°C pendant 20 min
- Répartir dans les tubes à essai en raison de 9 ml par tube

NB : Cette préparation est de l'eau physiologique.

IV.3 - PREPARATION DE L'INOCULUM

Nous avons prélevé à l'anse de platine sur milieu gélosé en respectant l'intégrité de la gélose une colonie de la culture. Puis nous avons procédé à la dispersion du prélèvement sur la paroi humide d'un tube stérile contenant 10 ml d'eau physiologique. Ensuite nous avons obtenu une suspension homogène dans la phase liquide après agitation au vortex (3 secondes). Cette suspension devra contenir $1. 10^8$ à $3 . 10^8$ cellules / ml (environ 0.5 Mac Farland).

IV. 4 - ESSAI PRELIMINAIRE

Pour chaque type de souche à tester nous avons utilisé le neutralisant convenable pour chaque produit et le produit à sa concentration minimale. Ainsi nous avons un témoin eau distillé-neutralisant qui après 10 min de contact à 32°C pour les antiseptiques et 20°C pour les désinfectants ou nous avons ajouté la suspension à sa dilution décimal (10^5) et après un contact de 5 min. Nous avons mis dans la gélose de dénombrement 1 ml du témoin puis incubé à l'étuve à 37° . Il permet de déterminer N' (nombre de colonies). L'autre tube constitue l'essai du produit à sa dissolution en 1/5 avec le neutralisant ainsi nous devons obtenir n (nombre de colonies) $\geq N' / 10$

Cet essai permet aussi de déterminer N (dénombrement bactéries au 10^{-6})

(cf. fig 1)

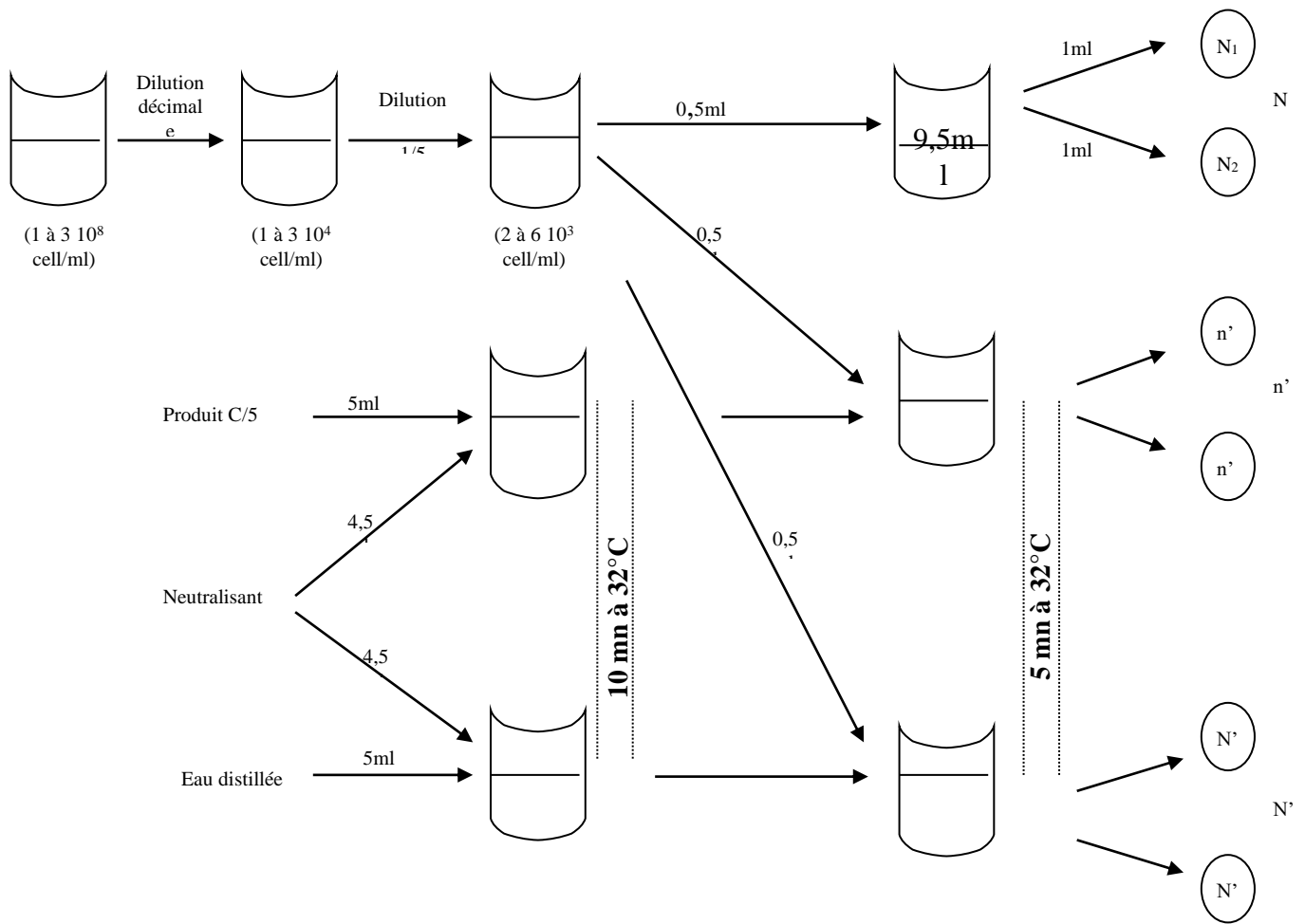
IV.5 - ESSAI PROPREMENT DIT

Dans les même conditions que pour l'essai préliminaire nous avons utilisé la même suspension $1.3.10^8$ cellules / ml dans chaque tube. Au bout de 5 min exactement nous avons transféré une fraction du mélange dans le neutralisant. Après 10 min nous avons mis 1 ml du mélange dans la gélose pour dénombrement puis incubé. Les résultat ont été confrontés à ceux d'un témoin obtenu par dénombrement des bactéries de suspension utilisée. (cf. Fig 2)

Prélever 2x1 ml de la préparation pour effectuer le dénombrement

Incuber 48 h à 37° C pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*

72 h à 37° C pour *Enterococcus Faecalis*



L : liquide de suspension bactérienne

Fig 1 : ESSAI PRELIMINAIRE

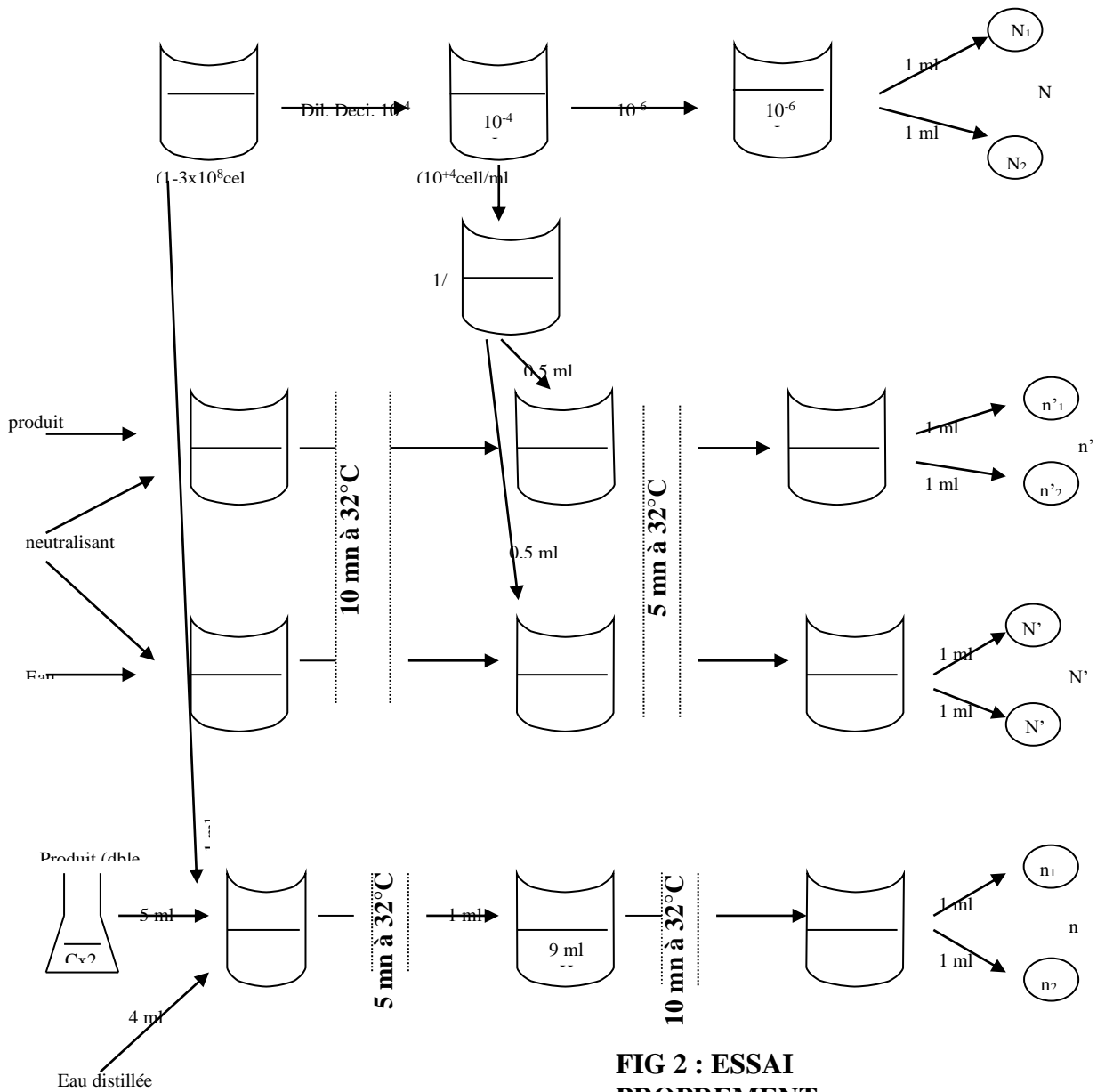


FIG 2 : ESSAI PROPONENT

V - DETERMINATION DE L'ACTIVITE FONGICIDE DES ANTISEPTIQUES (3)

V.1 - PRINCIPE

Cette méthode dérive de la très classique méthode de dilution (ou méthode de suspension) utilisée pour la détermination d'activité de substances antifongiques. Elle est maintenant couramment utilisée pour la mise en œuvre des neutralisants pour supprimer les effets fongostatiques des antiseptiques.

L'efficacité de ces neutralisants doit être appréciée au cours d'un essai préliminaire, ce n'est qu'après ce test que l'on peut passer à l'essai proprement dit et déterminer la concentration fongicide.

V.2 - CONDITIONS OPERATOIRES

V.2.1 - Souche

- *Candida albicans* :

Nous avons utilisé le milieu de SABOURAUD puis garder la souche à l'étuve à 30° C pendant 72h.

V.2.2 - Milieux de culture

V.2.2 1 - Milieu de SABOURAUD

⇒ Composition

- Bacto Néopeptone 10gr
- Bacto Dextrose 20gr
- Bacto Ager 20gr
- Eau distillée qsp 1000 ml

⇒ **Préparation**

Mélanger et porter à ébullition

Répartir dans des flacons de 150 ml

Stériliser à l'autoclave à 180°C pendant 20 min

V.2.2.2 - Gélose pour dénombrement des cellules de levures

⇒ **Composition**

- | | |
|------------------------|---------|
| ▪ Extrait de levure | 20gr |
| ▪ Glucose | 20gr |
| ▪ Agar- Agar en poudre | 18gr |
| ▪ Eau distillée qsp | 1000 ml |

⇒ **Préparation**

Mélanger et porter lentement le mélange à ébullition

Ajuster le pH à $6.8 \pm 0,1$

Répartir dans flacons de 150 ml

Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 min

V.2.2.3 - Liquide de préparation des suspensions de levures

Nous avons utilisé de l'eau physiologique (9g ce Nacl / l) stériliser à l'entoclave à 120° C pendant 20 min.

V.3 - Préparation de l'inoculum

Nous avons prélevé à l'anse sur milieu SABOURAUD en respectant l'intégrité de la surface de la gélose de notre culture. Nous avons dispersé le prélèvement sur la partie non immergée du tube contenant 10 ml d'eau physiologique.

Ensuite nous avons obtenu une suspension homogène dans la phase liquide après agitation au vortex (3 secondes). Cette suspension doit contenir $1-10^8 - 3-10^8$ cellules / ml (environ 0.5 MF).

V.4 - Essai préliminaire

Nous avons mis en contact la suspension avec un neutralisant convenable pour chaque produit. Ainsi nous avons un témoin Eau distillée – Neutralisant qui après 10 min de contact à 32° pour les antiseptiques et 20° C pour les désinfectants. Nous avons la suspension à sa dilution décimale (10^{-4}) et après un contact de 15 min. Nous avons incubé puis déterminé N'. L'autre tube constitue l'essai du produit à sa dilution 1/5 avec le neutralisant on doit obtenir :

$n \geq 0.5 N'$ ceci pour valider le neutralisant

N constitue le nombre de colonies après dilution décimale 10^{-5} de la suspension (cf. fig : 3)

V.5 - Essai proprement dit

Dans les même conditions que l'essai se déroule. Le produit est dilué à 4 concentrations différentes.

Nous allons déterminer N après dilution décimale à 10^{-5} de la suspension obtenue après 10 min de contact au bain-marie selon la nature du produit. Puis c'est le tour du neutralisant pour le tester avec la suspension décimale à sa dilution en 10^{-4} déterminée par **$N' \leq 0.5N$** avec son effet inhibiteur (fongistatique) sur les cultures.

Pour le produit à tester nous avons pris la suspension de levures $1-10^8-3-10^8$ cellules/ml pour les quatre concentrations avec de l'eau distillée. Au bout de 15 min de contact à la température convenable nous avons ajusté le neutralisant

après 10 min de contact que nous allons prélever les 2x1 ml que nous mettons dans des boîtes de pétri puis nous ajoutons (15 ml) la gélose pour dénombrement des levures n'.

La lecture se fera après 72 h dans l'étuve à 30°C. (**cf. fig : 4**)

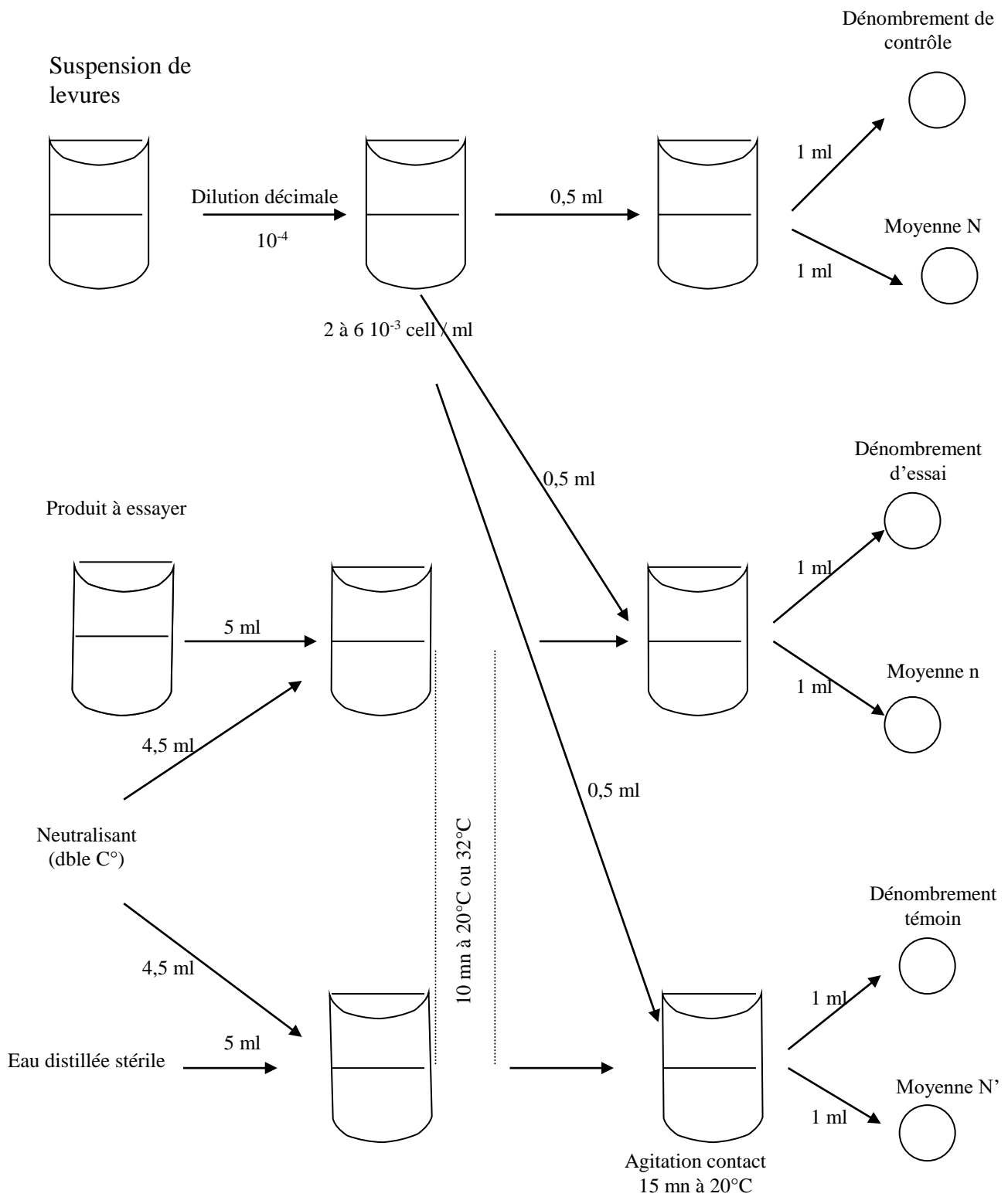
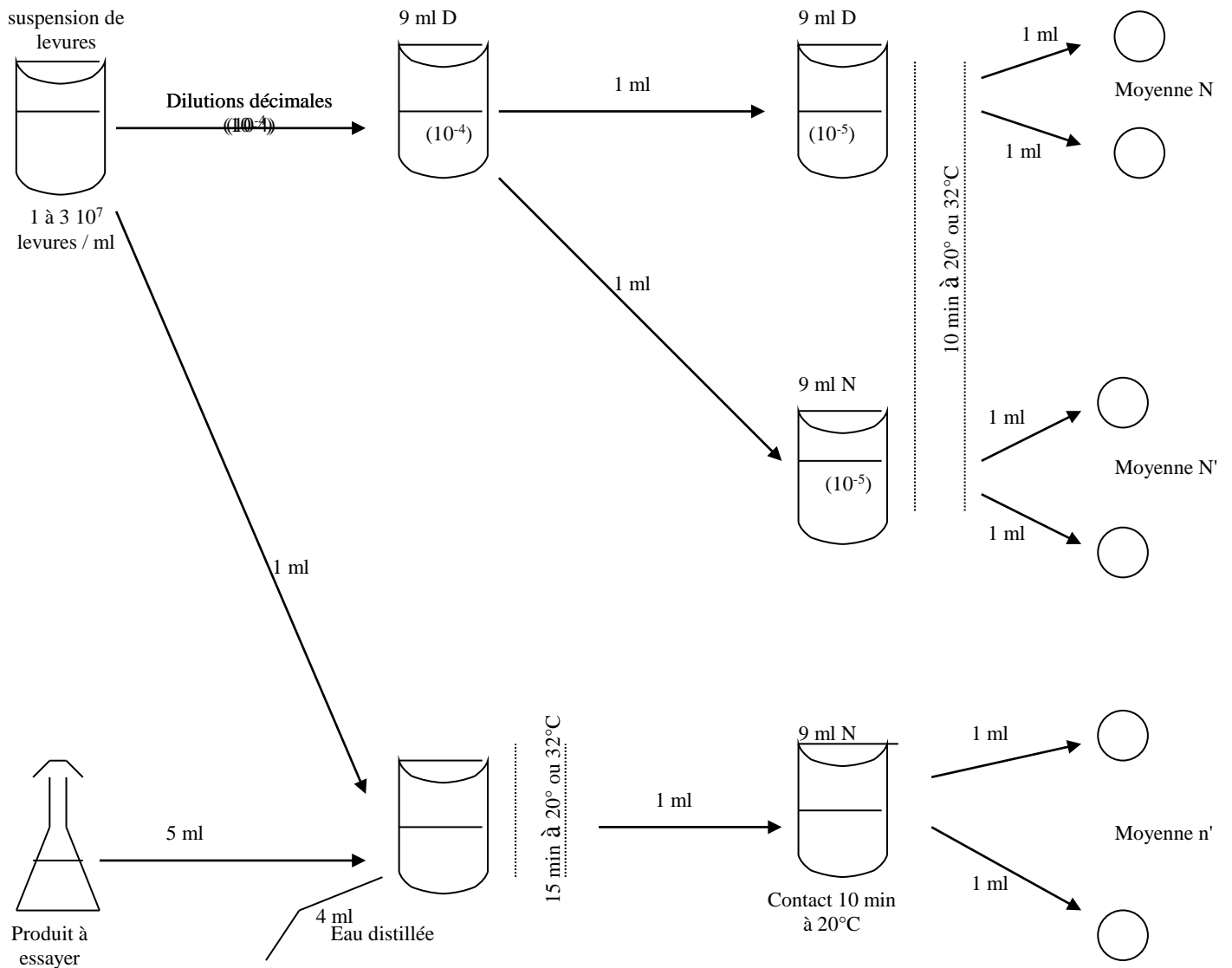


FIG 3 : ESSAI PRELIMINAIRE



D : liquide de préparation des suspensions

N : neutralisant

FIG 4 : ESSAI PROPREMENT DIT

VI - DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPORICIDE DES ANTISEPTIQUES

VI.1 - PRINCIPE

Cette méthode dérive de la très classique méthode de dilution (ou méthode de suspension) utilisée pour la détermination d'activité de substances antibactériennes. Elle est maintenant couramment utilisée pour la mise en œuvre des neutralisants pour supprimer les effets sporostatiques des antiseptiques.

L'efficacité de ces neutralisants doit être appréciée au cours d'un essai préliminaire, ce n'est qu'après ce test que l'on peut passer à l'essai proprement dit et déterminer la concentration sporicide.

VI.2 - CONDITIONS OPERATOIRES

VI.2.1 - Souche

Les spores sont obtenues à partir de *Bacillus subtilis*

Pour la préparation des spores de *Bacillus*, nous allonsensemencer le bouillon de la préparation de l'inoculum avec 10^6 spores. Nous allons incuber à 30° C, puis nous transférons 2 à 3 ml de cette culture dans deux boîtes de pétri contenant la gélose pour la préparation de spores. Ensuite nous faisons subir à la boîte diverses inclinaisons de façon à ce que l'inoculum vienne en contact avec la totalité de la surface de la gélose. Nous jetons l'excès et les boîtes sont incubées à 30° C pendant trois jours. C'est à partir du troisième jour que nous observons l'état de la culture en microscope pour voir la sporulation. S'il y a présence de spore nous retournons les boîtes dans l'étuve et regardons tous les deux jours. Cette sporulation peut durer 8 à 10 jours. Ainsi nous allons réaliser quatre (4) lavages successifs avec de l'eau distillée par centrifugation 3000 tours / min pendant 10 min. Nous transférons la dernière suspension dans un

flacon à vis et chauffons cette suspension à 75° C pendant 10 min. Après cette préparation nous pouvons réaliser l'essai ou nous allons garder cette suspension au réfrigérateur à 4° C.

VI.2.2 - Milieux de culture

VI.2.2 .1 - Bouillon pour inoculum de *Bacillus*

⇒ Composition

- Extrait de levure 2.5g
- Tryptone 5g
- Glucose 1g
- Eau distillée 1000 ml

⇒ Préparation

- Dissoudre dans l'eau à ébullition
- Ajuster le pH à $7.2 \pm 0,1$
- Répartir dans des tubes à essai à raison de 10 ml / tube
- stériliser à l'autoclave 120° pendant 20mn.

VI.2.2.2 - Gélose pour préparation de spores de *Bacillus*

⇒ Composition

- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 2g
- $MnSO_4, H_2O$ 0.04g environ 40 mg
- Agar –Agar en poudre 25g
- Eau distillée qsp 1000 ml

⇒ Préparation

- Mélanger les différentes pesés dans l'eau à ébullition

- Ajuster le pH à $7 \pm 0,1$
- Autoclaver à 120°C pendant 20 min
- Répartir dans des boîtes de pétri en raison de 15 ml / boîte
- Laisser refroidir.

VI.2.2.3 - Gélose pour dénombrement des spores

⇒Composition

- Acides aminés provenant de l'hydrolyse acide de la caseine dépourvus de vitamines appelé Casminos 1g
- Amidon soluble 1g
- Glucose 2,5g
- Extrait de levure 5g
- FeSO_4 0,1g
- MnSO_4 0,1g
- Agar- Agar en poudre 18g
- Eau distillée qsp 1000ml

⇒Préparation

- Dissoudre les différentes pesées à ébullition
- Ajuster le pH à $6.8 \pm 0,1$.
- Répartir dans des tubes à essai en raison de 15 ml / tube.

VI.2.4 - Dilution des suspension de spores

Nous utilisons de l'eau distillée stérile.

VI.3 - PREPARATION DE L'INOCULUM

Cette préparation se déroule en 5 jours au minimum et 10 jours au maximum.

Au premier jour nous avonsensemencé dans le bouillon de l'inoculum de bacilles la souche bactérienne, puis incubé à 30° pendant 24 h.

Au deuxième jour nous avons coulé dans des boîtes de pétri la gélose pour la préparation des spores 15 ml que nous laissons refroidir avant d'y transférer 2 à 3 ml du bouillon. Ces boîtes doivent subir diverses inclinaisons de façon à ce que l'inoculum vienne en contact avec la totalité de la surface gélosée. Nous jetons l'excès et incubons les boîtes à la même température pendant 3 jours.

Après 3 jours d'incubation, nous avons observé l'état de notre culture au microscope pour voir la sporulation qui par la coloration de Gram nous montre la présence ou non de spores Cette sporulation peut durer 8 à 10 jours. A la présence de spores nous avons effectué quatre lavages successifs avec de l'eau distillée stérile puis une centrifugation à 3000 tours /min pendant 10 min. Ensuite la dernière suspension est transférée dans un flacon à vis et chauffée à 75° C pendant 10 min. Outre l'essai, cette suspension peut être gardée à 4° C en réfrigérateur. Mais toutefois avant la manipulation il faudra la chauffer à 75° C pendant 10 min. Cette suspension contient entière 1 à 3-10⁸ cellules / ml (environ 0.5 AF)

VI.4 - ESSAI PRELIMINAIRE

Nous avons mis au contact la suspension avec le produit et son neutralisant convenable. Dans cette partie nous avons pris la suspension à sa dilution décimales (10⁻⁵) pour obtenir une suspension de 2.6 10³ cellules /ml et autre dilution 20^e pour le dénombrement N. (cf. Fig 5)

Nous avons un témoin : eau distillée - neutralisant après un temps de contact 1 h à 20°C en 5 min à 75° C et incuber à l'étuve pendant 72 h puis déterminer N'.

L'autre pour l'essai du produit avec les même temps que pour le témoin aussi on détermine N'.

VI.5 - ESSAI PROPREMENT DIT

Préparer 4 dilutions du produit en concentration double de celle qu'on doit utiliser et faire des dilutions au 1/10^{ème} les placer au bain-marie à 20° C ou 75° C suivant le bain-marie choisi.

Préparer 5 tubes à essai contenant 1 ml de suspension (1 à 3 10⁸ cellules/ml) + 4 ml H₂O distillée stérile les placer en bain-marie choisir contrôler la température du bain-marie.

Prélever 5 ml de chaque dilution de produit et l'ajouter dans les différents tubes de suspension de spores. Déclencher le chronomètre dès le début de l'addition. Ajouter en Vortex (3-5 secondes)

Mettre 5 min à 75° C ou 1h à 20° C en agitant toutes les 10 min jusqu'à la fin du temps de contact. Préparer 5 tubes à essai contenant 9 ml de neutralisants les placer au bain marie choisi.

A la fin du temps de contact et très rapidement agiter en vortex puis prélever 1 ml de mélange + 9 ml de neutralisant déjà préparé.

- Laisser agir pendant 10 min
- Agiter et prélever 2x1 µl de mélange et ajouter à 15 µl de gélose par dénombrement (2 boîtes de pétri)

- Après solidification mettre à l'étuve pendant 72h à 30° C en le retournant.

A la fin de l'essai mesurer le pH dans les tubes de contact. (**cf. Fig 6**)

Lecture : Dénumbrer les colonies et faire la moyenne dans $n : n \leq N / 10$.

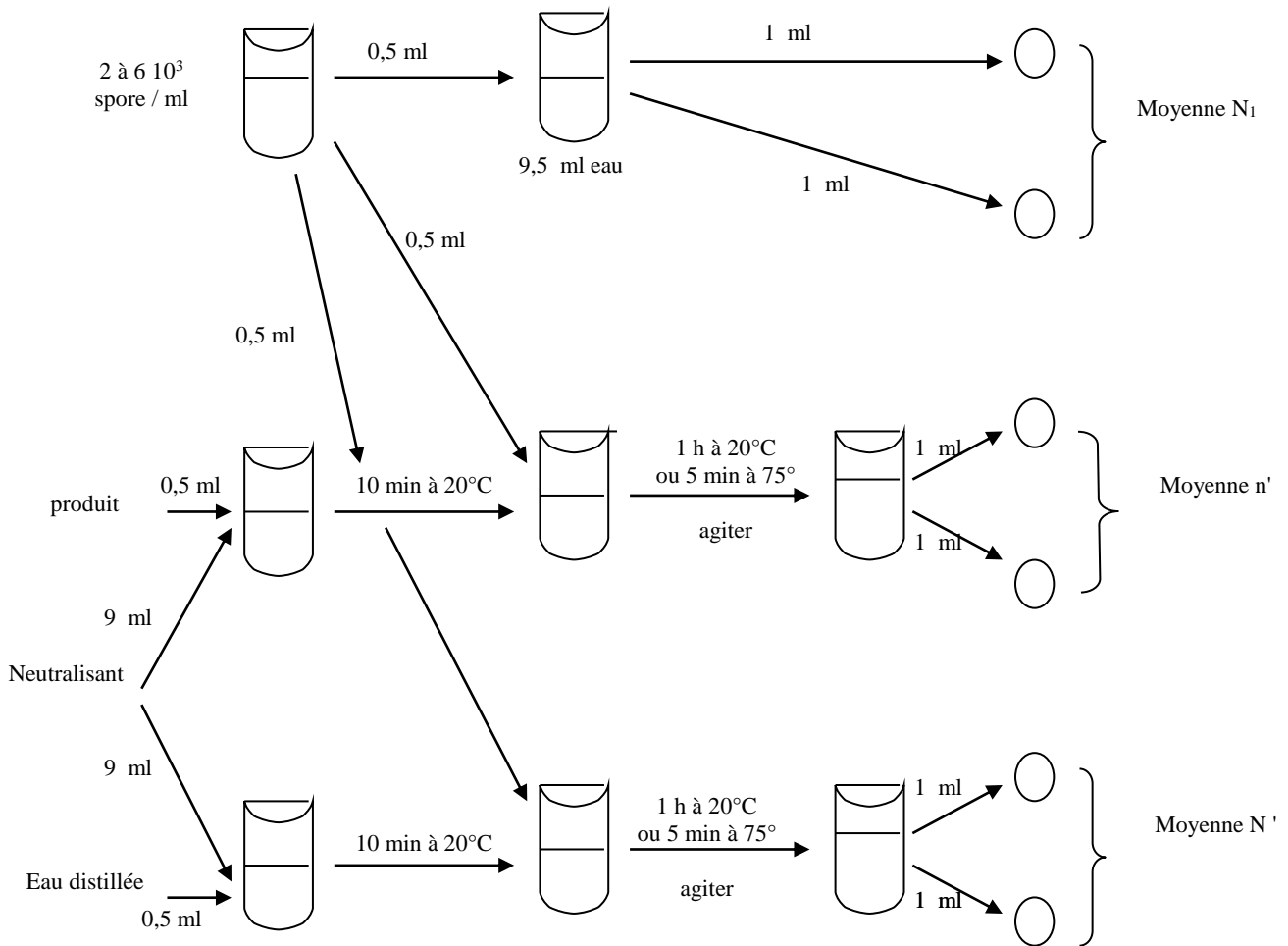


FIG 5 : ESSAI PRELIMINAIRE

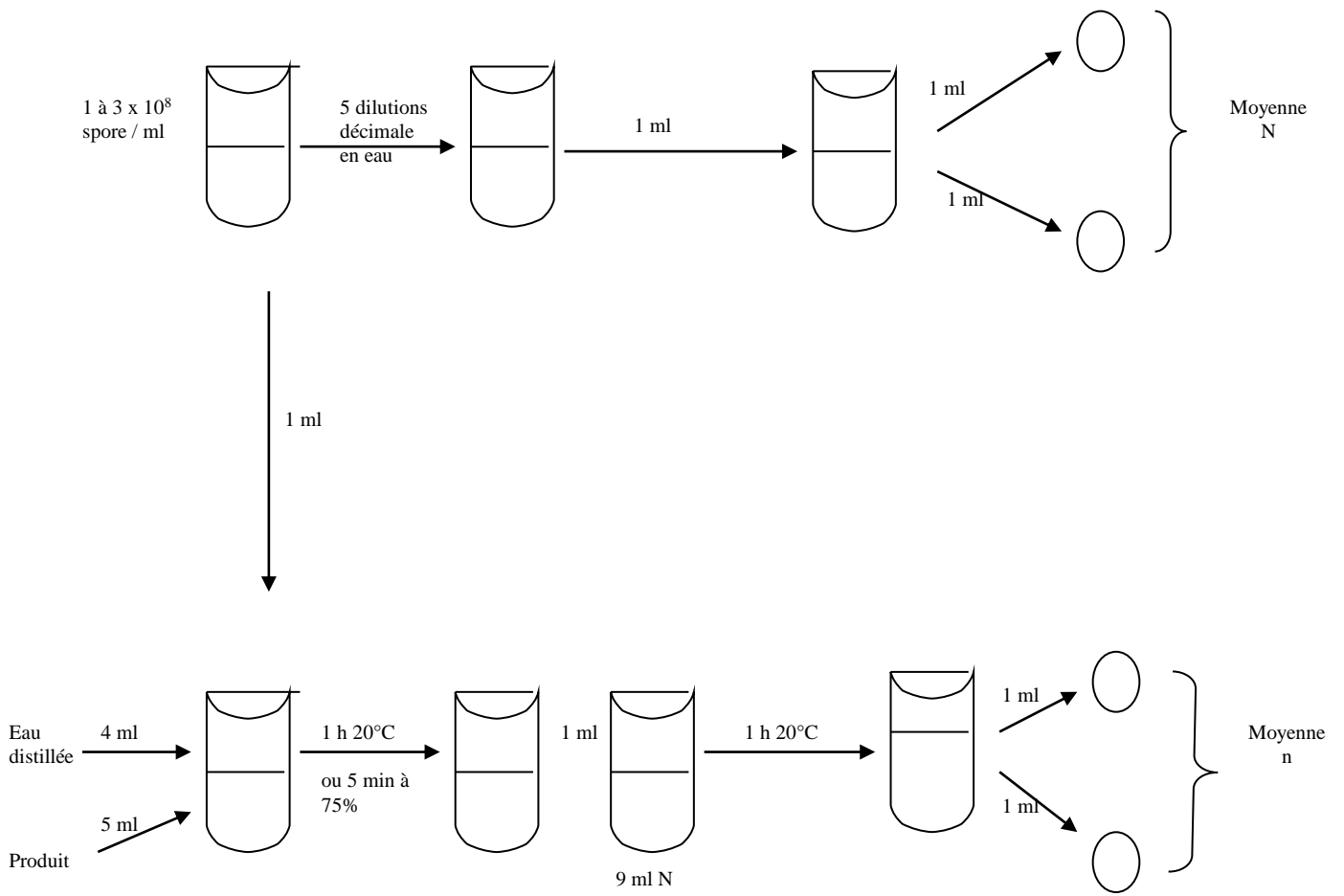


FIG 6 : ESSAI PROPREMENT DIT

RESULTATS SUR L'ACTIVITE *IN VITRO* DES DIFFERENTS PRODUITS TESTES

I- RESULTATS PRELIMINAIRES

Tableau I : Essai préliminaire Oxyde de Zinc (Dermocuire*)

souches	C° du produit (mg/l)	Neutralisant L. Cysteine 0,15%	
		N'	n
<i>E.coli</i>	8000	197	70
<i>S.aureus</i>	8000	152	40
<i>Ent.faecalis</i>	8000	200	52
<i>Bacillus subtilis</i>	8000	55	10
<i>Candida albicans</i>	8000	145	45

N' : nombre de colonies dans le témoin

n : nombre de colonies dans l'essai

Nous remarquons que $n \leq N$ donc le neutralisant est efficace

Tableau II : Essai de Bromure de Cethexonium (Biocidan*)

Souches	C° du produit (mg/l)	Neutralisant tween 80–jaune d’œuf 3%	
		N'	n'
<i>E.coli</i>	50	161	110
<i>S.aureus</i>	50	150	90
<i>Ent.faecalis</i>	50	212	104
<i>Bacillus subtilis</i>	50	+	260
<i>Candida albicans</i>	50	230	210

N' : nombre de colonies dans le témoin

n : nombre de colonies dans l'essai

Nous remarquons que $n \leq N$ donc le neutralisant est efficace

Tableau III : Essai préliminaire de l'acidulé para Hydroxy. Benzoïque (Nisapulvol*)

Souches	C° du produit (mg/l)	Neutralisant tween 80–jaune d’œuf 4%	
		N'	n'
<i>E.coli</i>	20000	295	135
<i>S.aureus</i>	20000	281	102
<i>Ent.faecalis</i>	20000	149	118
<i>Bacillus subtilis</i>	20000	+	538
<i>Candida albicans</i>	20000	195	95

N' : nombre de colonies dans le témoin

n : nombre de colonies dans l'essai

Nous remarquons que $n \leq N$ donc le neutralisant est efficace.

+ : Nombre de colonies supérieur ou égale à 1000

Tableau IV : Essai préliminaire de chloramine (Hydro clonazone*)

Souches	C° du produit (mg/l)	Neutralisant Thiosulfate de Sodium 0,5%	
		N'	n'
<i>E.coli</i>	5000	120	100
<i>S.aureus</i>	5000	142	99
<i>Ent.faecalis</i>	5000	198	164
<i>Bacillus subtilis</i>	5000	138	109
<i>Candida albicans</i>	5000	212	188

N' : nombre de colonies dans le témoin

n : nombre de colonies dans l'essai

Nous remarquons que $n \leq N$ donc le neutralisant est efficace

Tableau V : Essai préliminaire de Chlorure de Benzalkonium (Dermobacter*)

Souches	C° du produit (mg/l)	Neutralisant Tween 80 – jaune d’oeuf 3%	
		N'	n'
<i>E.coli</i>	1000	183	68
<i>S.aureus</i>	1000	119	45
<i>Ent.faecalis</i>	1000	120	100
<i>Bacillus subtilis</i>	1000	179	69
<i>Candida albicans</i>	1000	117	95

N' : nombre de colonies dans le témoin

n : nombre de colonies dans l'essai

Nous remarquons que $n \leq N$ donc le neutralisant est efficace

II - RESULTATS PROPREMENT DIT :

Tableau VI : Concentration minimale Bactéricide, Fongicide, et Sporicide en mg/l de l'oxyde de zinc (Dermocuire*)

Concentrations Nbre de colonies	Concentration minimale en mg/l			
	4000	8000	20000	40000
<i>E.coli</i>	288	148	0	0
<i>S.aureus</i>	354	125	0	0
<i>Ent.faecalis</i>	210	151	23	0
<i>Bacillus subtilis</i>	7	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	142	75	0	0

L'oxyde de zinc montre son efficacité sur toute les souches testées à la concentration initiale. Elle est plus appréciée sur les spores de *Bacillus subtilis*.

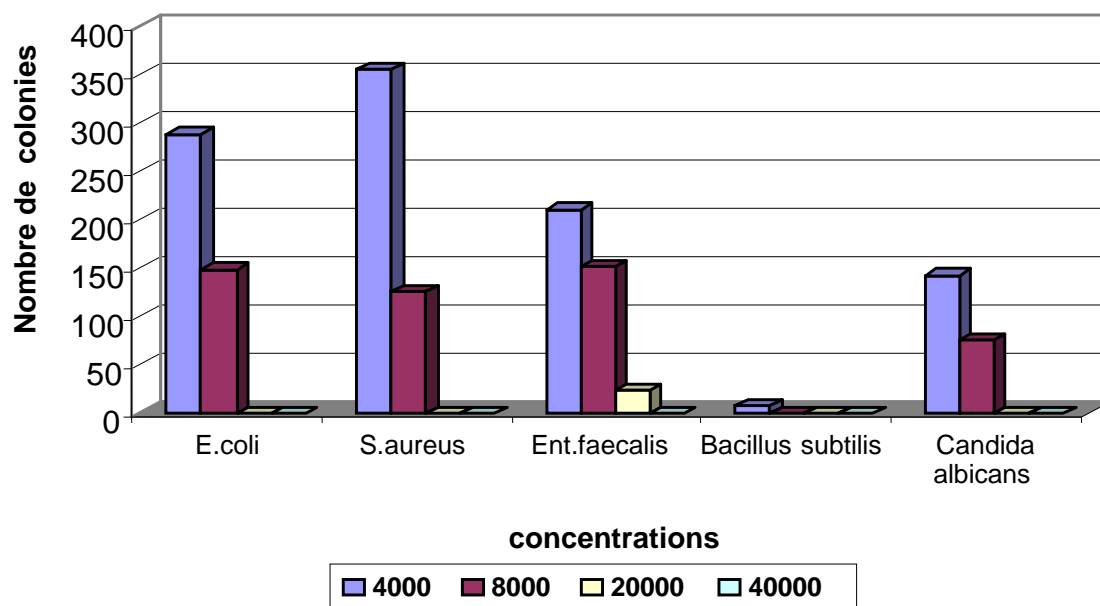


Fig 7 : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg / l de l'oxyde de zinc (Dermocuire®)

Tableau VII : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l du Bromure de cethexonium (Biocidan*)

Concentrations Nbre de col.	Concentration minimale en mg/l			
	25	50	125	250
<i>E.coli</i>	+	+	70	0
<i>S.aureus</i>	+	+	43	0
<i>Ent.faecalis</i>	+	+	358	0
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	250
<i>Candida albicans</i>	+	+	249	94

+ : nombre de colonies supérieur ou égal à 1000 cellules /ml

Le bromure de cethexonium n'est efficace que sur les bactéries. Sur les champignons et les spores nous remarquons l'apparition d'éventuelle résistance.

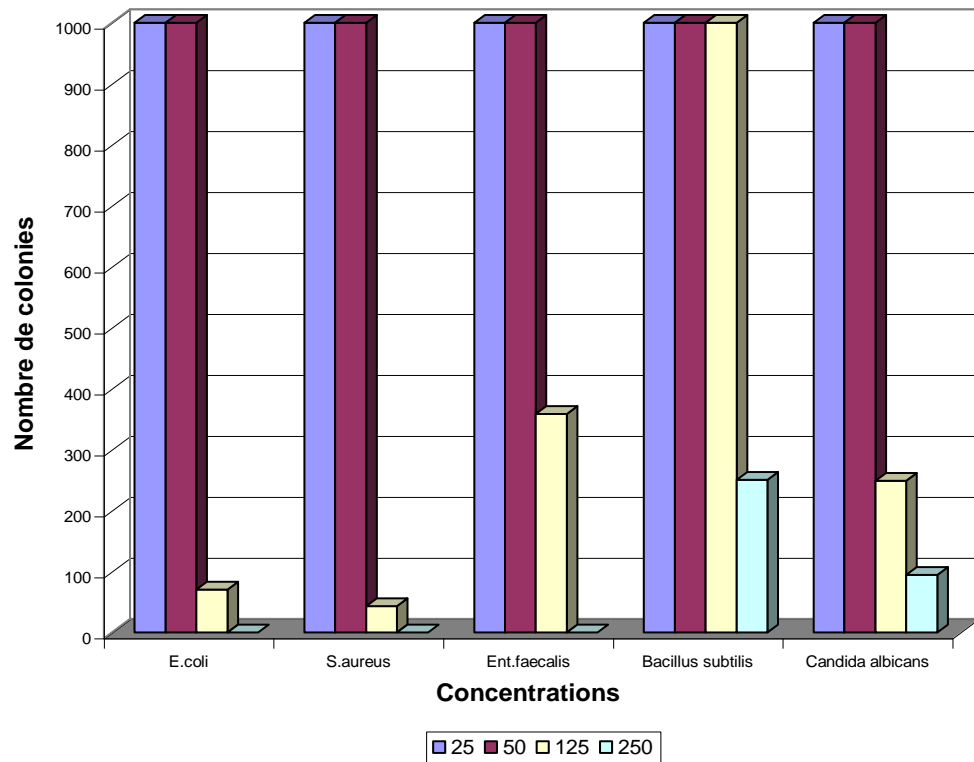


Fig 8 : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l du Bromure de cethoxonium

Tableau VIII : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l de l'acide Para-hydroxy-benzoïque (Nisapulvol*)

Concentrations Nbre de col.	Concentration minimale en mg/l			
	10	20	50	100
<i>E.coli</i>	42	0	0	0
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0
<i>Ent.faecalis</i>	173	103	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	+	740	510	385
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0

+ : nombre de colonies supérieur ou égal 1000 cel/ml

L'acide Para-hydroxy-benzoïque (Nisapulvol*) est un produit efficace surtout sur les staphylococciques et sur les champignons. Néanmoins l'apparition des résistances est observée avec les spores.

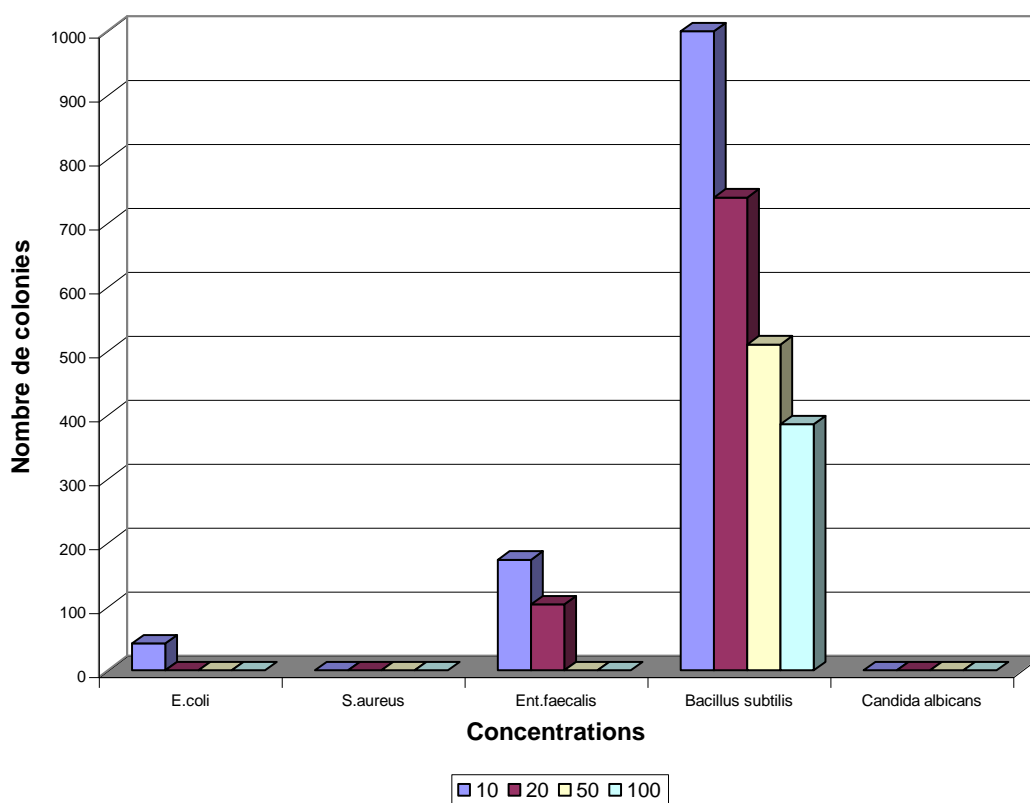


Fig 9 : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l de l'acide Para-hydroxy-benzoïque

Tableau IX : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l du Chloramine (Hydro-clonazone*)

Concentrations Nbre de col.	Concentration minimale en mg/l			
	2,5	5	12,5	25
<i>E.coli</i>	389	49	29	0
<i>S.aureus</i>	56	30	22	0
<i>Ent.faecalis</i>	+	37	18	0
<i>Bacillus subtilis</i>	160	93	33	0
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	95

+ : nombre de colonies supérieur ou égal 1000 cel/ml

La chloramine possède une activité plus marquée sur les bactéries que sur les spores. L'apparition des résistance est observée avec les champignons.

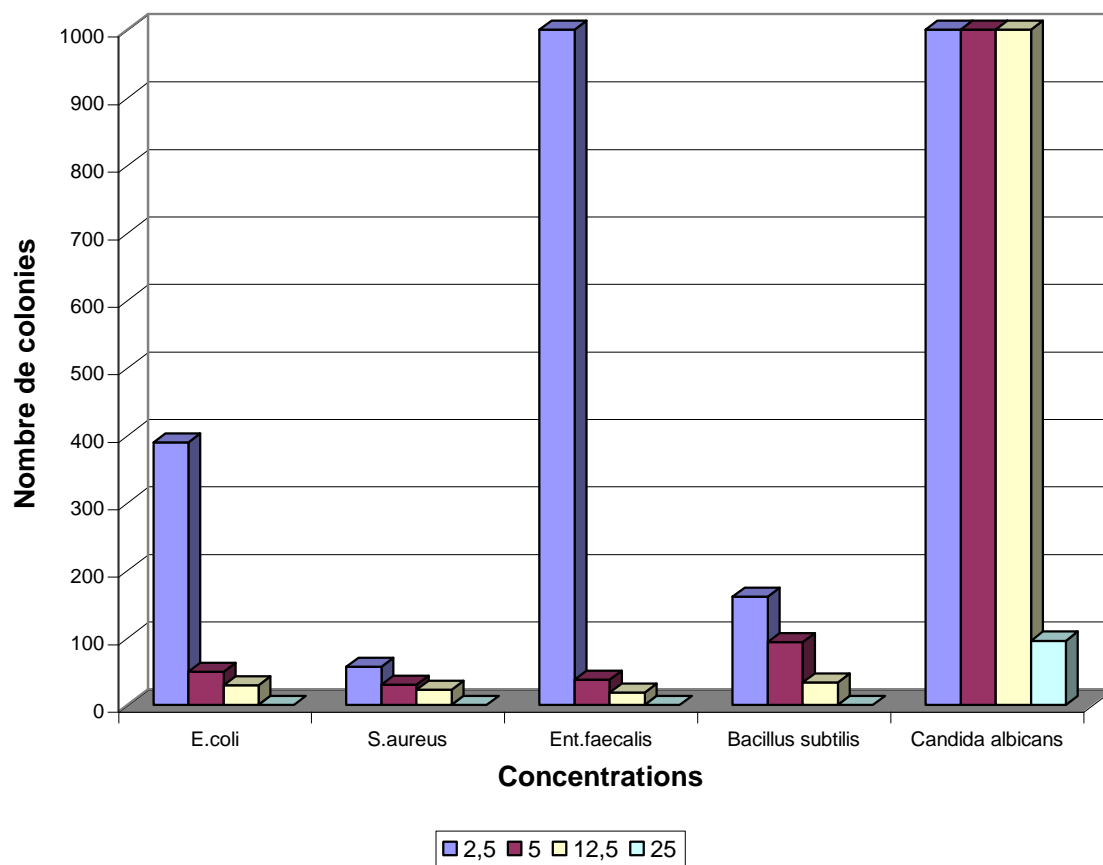


Fig 10 : concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l du Chloramine (Hydro-clonazone*)

Tableau X : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l du Chlorure de Benzalkonium (Dermobacter*)

Concentrations Nbre de col.	Concentration minimale en mg/l			
	50	1000	500	5000
<i>E.coli</i>	20	0	0	0
<i>S.aureus</i>	16	0	0	0
<i>Ent.faecalis</i>	135	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	+	254	125	83
<i>Candida albicans</i>	245	103	23	0

+ : nombre de colonies supérieur ou égal 1000 cel/ml

Le chlorure de benzalkonium possède une activité bactéricide et fongicide mais l'apparition de résistance est observée avec les spores.

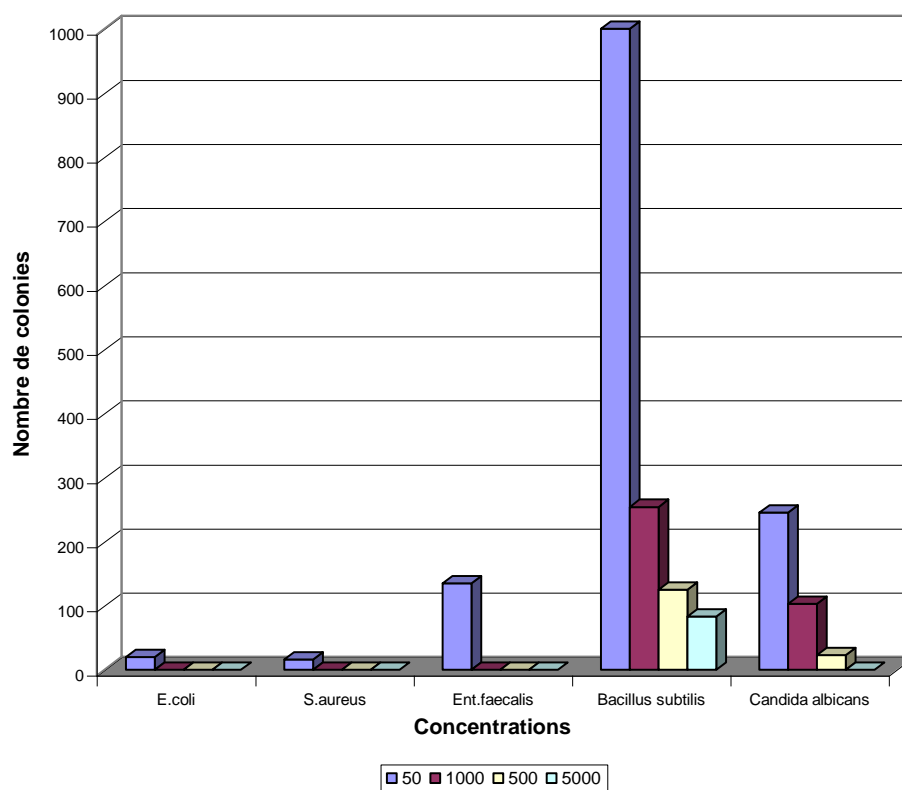


Fig 11 : Concentration minimale bactéricide, fongicide et sporicide en mg/l du Chlorure de Benzalkonium

DISCUSSION

A - ETUDE COMPAREE DES DIFFERENTES METHODES

I - METHODES AFNOR

NF. T 72.150 NF. T 72.200 NF. T 72.230

I.1 - Validité des essais préliminaires

Nous avons prouvé par des essais préliminaires tous validés, que la plupart des antiseptiques étudiés dans ce travail était utilisé : c'est donc bien une action bactéricide, fongicide et sporicide qui ont été mise en évidence lors des essais proprement dits selon respectivement les NFT 72.150, NF. T 72.200 et NF. T 72.230.

Néanmoins nous devons signaler que les effets bactériostatique, fongistatique et sporostatique sont possibles si l'antiseptique a une forte affinité pour les structures externes du micro-organisme

L'essai préliminaire selon les normes AFNOR (2, 3, 4) est suffisant pour mettre en évidence les effets bactériostatique, fongistatique et sporostatique. On peut aussi considérer à la limite que la fixation irréversible d'un antiseptique sur la paroi d'un micro-organisme conduit à des effets bactériostatique, fongistatique et sporostatique prolongé équivalent à des effets bactéricide, fongicide et sporicide réels.

I.2 - Validité des essais proprement dits

Des essais réalisés plusieurs fois ont démontré une bonne reproductibilité des résultats, ce qui leur confère une valeur indéniable.

Il nous est donc enfin permis de considérer les résultats ainsi acquis comme des données scientifiques valables.

I.3 - Avantages

La méthode dilution neutralisation est une méthode :

- ⇒ n'exigeant pas de matériels onéreux
- ⇒ relativement facile à mettre en œuvre
- ⇒ dont les résultats sont reproductibles. Cette reproductibilité a été démontrée par plusieurs équipes qui ont utilisé des essais peu parallèles

I.4 - Limites de la méthode

Les techniques de AFNOR certes référence mais : la méthode de dilution-neutralisation très classique dans son principe doit être rigoureusement appliquée pour donner des résultats que l'on attend. Ce n'est pas une méthode universelle pour être applicable elle doit mettre en œuvre un neutralisant convenable. Par ailleurs elle n'est pas la plus adéquate pour l'étude d'un grand nombre de souches et de plusieurs antiseptiques. Nous pouvons reprocher à la norme AFNOR un éventail trop restreint de souches bactériennes car même si les souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*) sont assez représentatifs pour les différentes activités déterminées du fait de leur présence dans les infections courantes. Les souches utilisées sont considérées comme des références internationales.

La méthode de l'AFNOR est aussi une technique laborieuse exigeant des manipulateurs qualifiés et imposant des contraintes parfois bien pesantes :

⇒ nécessité d'établir un calendrier de repiquage des souches pour la préparation des inoculums.

II - AUTRES METHODES

DUPAS (17) a décrit une microméthode calquée sur les méthodes AFNOR.

SURGOT et FLEURETTE (46) ont mis au point une microméthode inspirée des techniques utilisées pour des antibiotiques de principes identiques au principe de l'AFNOR qui apprécie une diminution de 5 Log 10 du nombre de microorganismes en 5 min à 21°C.

Ces normes AFNOR peuvent donc être complétées par des micro-méthodes permettant une surveillance plus facile du comportement des souches isolées. L'utilisation des micro-plaques permet l'étude de l'action de divers antiseptiques vis à vis de plusieurs souches dans une même expérience. Ces méthodes de bonne reproductibilité donnent des résultats comparables et similaires à la norme AFNOR.

B - ANALYSE DES RESULTATS

Il est difficile de comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux des autres auteurs. Même si les normes AFNOR font autorité à la matière, il existe de nombreuses méthodes de détermination de l'activité bactéricide, fongicide et sporicide. Elles répondent souvent à des objectifs variés et il n'est pas possible de les comparer les unes des autres.

Les valeurs des concentrations bactéricide, fongicide et sporicide données dans la littérature sont très nombreuses et très variables, les techniques, les souches et les substances utilisées sont très différentes.

Les comparaisons sont donc difficiles.

I - BROMURE DE CETHEXONIUM

Le bromure de cethexonium (BIOCIDAN®) est un antiseptique qui présente une bonne activité bactéricide comme tout ammonium quaternaire. Néanmoins il a une activité fongistatique et une très faible activité sporostatique car les ammoniums quaternaires se combinent avec les enveloppes sporales mais ne peuvent pas pénétrer dans la spore. Ils inhibent la recroissance bactérienne après la germination.(34, 43)

Dans notre étude les concentrations s'échelonnent de 250 à 25 mg /l. nous remarquons une activité bactéricide à la concentration maximale surtout sur les bactéries Gram positif, mais pour les autres activités nous remarquons un effet fongistatique et un faible effet sporostatique.

Dans l'étude HUGO W.B. et RUSSEL (34), les *Candida albicans* et les spores de *Bacillus subtilis* résistent au bromure de céthexonium.

II - OXYDE DE ZINC

L'oxyde de zinc est un bon antiseptique car d'après nos résultats il possède à la fois une activité bactéricide, fongicide et sporicide. L'activité sporicide est plus marquée.

Ces résultats comparés à ceux des autres auteurs qui affirment que le zinc n'est qu'un conservateur car ne présentant aucun risque d'irritation et d'allergie. Ces même auteurs nous confortent dans notre idée que des produits contenant du zinc associé avec du cuivre présentent des propriétés antimicrobiennes. (49)

Le DERMOCUIVRE® que nous avons utilisé, qui est une association de sulfate de cuivre et d'oxyde de zinc à 10%.

III - L'ACIDE PARAHYDROXY BENZOÏQUE

Selon HARVEY et HANDBOOK (31, 32) le benzyl paraben (NISAPULVOL®) possède une activité bactéricide plus marquée sur les Gram positif que sur les Gram négatif mais aussi une activité fongicide et pas d'activité sporicide.

MAROUCHOC (35) montre que l'acide parahydroxybenzoïque apparaît comme le meilleur antifongique. Dans une autre étude réalisée sur 10 centres en 1973 et portant sur 1200 personnes le "North American Contact Dermatis Group" a montré une hypersensibilité de l'ordre de 3% au paraben. (39)

Dans notre étude nos résultats sont conformes à ceux de ces deux auteurs du fait que nous avons remarqué une activité bactéricide, fongicide et ne possède pas une activité sur les spores.

IV - CHLORURE DE BENZALKONIUM

Le chlorure de Benzalkonium (DERMOBACTER®) fait partie de la famille des ammoniums quaternaires. C'est un bon antiseptique de par son activité bactéricide prédominant. Le DERMOBACTER® est une association de chlorure de Benzalkonium avec du chlorhexidine qui possède à la fois une activité bactéricide et une activité sporicide mais néanmoins nous remarquons un effet sporostatique du produit.

Car la chlorhexidine se combine fortement avec les enveloppes sporales mais ne peut pas pénétrer dans la spore. Elle agit cependant sur la spore en cours de formation et en se montrant active jusqu'au stade 4 de la sporulation (début de la formation du cortex. Elle inhibe aussi la reconnaissance bactérienne après la germination (11, 25, 27, 43). Il ne sont pas sporicide sauf à une température supérieure à 70°C après un contact prolongé ou à contact alcalin avec des concentrations de l'ordre de 500 mg/l.

Pour HIOM et al (33) il faut des concentrations de 100 à 1000 mg/l pour obtenir une activité fongicide sur *Candida* et *Saccharomyces*.

HALEY et al (28) ont montré que le produit est bactéricide sur les staphylocoques sensibles à la méticilline.

Pour d'autres auteurs les concentrations minimales bactéricide de la chlorhexidine ne sont pas modifiées que sur les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles ou non à la méticilline. (7, 8, 9)

NAKAHARA et KOZUKUE (40) estiment à 5 mg/l la limite de sensibilité de *Escherichia coli* à la chlorhexidine et considèrent comme résistantes 12,8% des souches étudiées avec des concentrations comprises entre 5 -12,5 mg/l.

Pour SURGOT et al, le CMB du chlorure de benzalkonium est de 6,25 mg/l sur les souches de *Staphylococcus aureus*. Il est sporostatique à la concentration de 0,0005 % à température ambiante (34, 43).

Une étude de RUSSELS (42) montre que les ammoniums quaternaires sont fongistatique mais peu fongicides.

Ces résultats sont affirmés par des travaux réalisés à Montpellier le 24-01-95 par une équipe du laboratoire de Innotech International. Aucune résistance n'a été retrouvée pour *Staphylococcus aureus*. (14)

V - CHLORAMINE

La chloramine (HYDROCLONAZONE®) possède une activité bactéricide à la double concentration de même qu'une activité sporicide. Mais nous remarquons un effet fongistatique.

MATINDALE (36), montre que la chloramine possède une activité bactéricide, sporicide, alors que l'effet fongistatique n'est pas vérifié. Il montre une activité fongicide aussi du produit.

DAKIN et al (10) ont démontré ces mêmes activités antimicrobiennes de la chloramine. Elle possède une activité bactéricide lente (19)

En conclusion nous remarquons que la chloramine est un bon antiseptique même s'il existe une nette différence avec les résultats de ces auteurs et les nôtres.

CONCLUSION

Dans ce travail nous avons standardisé une méthode fiable pour le contrôle de qualité des antiseptiques. Ainsi nous avons déterminé l'activité bactéricide (spectre 3), fongicide et sporicide in vitro des formes d'antiseptiques. Par contre l'activité virucide n'a pas été recherchée du fait de l'absence de souches de virus. Nous avons mis au point une méthode de standardisation selon les normes de recommandation de l'AFNOR en utilisant différentes souches de références. Les méthodes de dilution-neutralisation sont :

⇒ NF T 72.150 pour l'activité bactéricide, (2)

⇒ NF T 72.200 pour l'activité fongicide, (3)

⇒ NF T 72.230 pour l'activité sporicide (4)

L'activité de ces différentes formes d'antiseptiques (le collyre du bromure de cethexonium BIOCIDAN®, la poudre du benzylparaben NISAPULVOL®, les comprimés de la chloramine HYDRO-CLONAZONE®, la pommade de l'oxyde de zinc DERMOCUIVRE®, la solution du chlorure de benzalkonium DERMOBACTER®) a été étudiée sur des souches de références au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM).

Les résultats obtenus montrent un comportement différent des antiseptiques étudiés vis à vis des souches utilisées.

C'est ainsi que nous avons observé que l'oxyde de zinc (DERMOCUIVRE®) possède une activité bactéricide, fongicide et sporicide. Notre étude confirme cependant l'existence d'un phénomène de résistances à certains antiseptiques. Le bromure de cethexonium (BIOCIDAN®) qui, bien que présentant une activité bactéricide, ne réussit pas aux champignons et aux

spores. Le chlorure de benzalkonium (DERMOBACTER®) en association avec la chlorhexidine possède une activité bactéricide et fongicide, ne réussit pas aussi aux spores. La chloramine (HYDROCLONAZOLE®) est un bon antiseptique car elle possède à la fois une activité bactéricide et sporicide. L'activité de la chloramine ne confirme pas celle des dérivés halogénés qui, selon la littérature sont bactéricide, fongicide, sporicide voire virucide (15, 48).

Ces procédures permettent au Laboratoire de Contrôle des Médicaments une mise au point pour le contrôle de ces formes de produits. Les antiseptiques revêtent un double caractère dans le domaine de la santé publique :

- une bonne alternative pour la prévention des infections nosocomiales
- la prévention des contaminations dans les sites de travail.

Du point de vue thérapeutique, les antiseptiques sont faiblement toxiques et ont prouvé leurs activités.

Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur les activités bactéricide, fongicide et sporicide. Pour une meilleure appréciation de la standardisation il faut, dans un avenir proche rechercher l'activité virucide, les méthodes de dilution-neutralisation en présence de substances interférentes et les autres méthodes pour tester le maximum d'antiseptiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. **AFNOR.** Antiseptiques et Désinfectants : Vocabulaire
Recueil des normes françaises Paris 1989 ; 2^e éd. pp. 3-5
2. **AFNOR.** Antiseptiques et Désinfectants utilisés à l'état liquide miscibles à l'eau. Détermination de l'activité bactéricide (Méthode dilution neutralisation)
Recueil de NF T : 72 150 Paris 1989 2^e éd. pp. 32-52
3. **AFNOR.** Antiseptiques et Désinfectants utilisés à l'état liquide miscibles à l'eau et neutralisables. Détermination de l'activité fongicide (Méthode par dilution Neutralisation). Recueil NFT. 72 200 Paris 1989 2^e éd. pp. 172-190.
4. **AFNOR.** Antiseptiques et Désinfectants utilisés à l'état liquide miscibles à l'eau et Neutralisables. Détermination de l'activité sporicide (Méthode par dilution Neutralisation). Recueil NFT. 72 230 Paris 1989 2^e éd. pp. 210-228.
5. **BERKEMAN (R.L), Lewings (S), Alen (J.R)**
Pseudobacteremia attributed to contamination of providure rodine with *Pseumonas cepaciae*.
Ann. Int. Ned. 1981, 95 : 32-36
6. **BOURLIOUX.P.** L'apport de microbiologie pour une évolution normalisées des antiseptiques.
Techniques hospitalières 1978, pp. 137-143.
7. **CREMIEUX A.** Actualité sur les antiseptiques. La lettre de l'infectiologue
1995 ; 10 : 20-23
8. **COOKSON BD, BOLTON MC, PLATT J.H.**
Chlorhexidine résistance in methicilline resistant *S. aureus* or just and elevated MIC? An in vitro and in vivo assesement

Antimicrob- Agents Chemother 1991 ; 35 : 1997-2002.

9. COOKSON BD.

Antiseptic resistance in Methicilline resistant *S. aureus* an emerging problem? Zbl BAKT : 1992 ; Supp.26 : 227-234

10.DAKIN HD, COHEN JB, KENYONS.

Studies in antiseptics (II) : on chloramine : its preparation, properties and use
Br. Med. J 1916 ;1 : 160-162.

11. DENTON GW.

Chlorexidine in disinfection sterilization and preservation
(Block SS eds.) Lea and Febiger, Philadelphia, (1981) : 274-289

12. DESBORDES J., JOURDAN R.

Recherche des meilleurs tests de bactériostase dans la sélection ou la
contrôle des substances antiseptiques pures et des préparations
commerciales. Path Biol, 1973 ; 21, n° 28 pp. 837-844.

13. DIENG (C. T.)

Chimio prophylaxie et Prévention des infections nosocomiales
Thèse. Pharm. Dakar 1998 n° 27.

14.DIOP (A.)

Caractères phénotypiques de différentes souches bactériennes nosocomiales
isolées au Services Gynécologique Obstétrique de HALD.(Dakar). Thèse
Pharm. Dakar, 1994 n°82.

15.DORVAULT. F.

L'officine, 23^e édition Vigot (ed), Paris 1995

16.DRUILLES J.A., CHANTEFORT (M.), HUET (R)

Activité bactéricide de quelques antiseptiques

Revue de l'institut Pasteur de Lyon, 1986 ; 19 : 217-231

17.DUPAS H. ; NOUGAYREDE PH, PERRIN G.

Contrôle de l'activité bactéricide des désinfectants

Présentation d'une microméthode destinée à déterminer la CMB

Revue Med. Vet, 1981 ; 132 pp 209-213

18.DUVAL J.

Activité bactéricide des principales familles d'antiseptiques

Synthèse de résultats obtenus par le groupe "Antiseptique"

Rev. Inst Pasteur de Lyon 1978 t 11 n°3 pp. 457-468.

19.DYCHDALA GR.

Chlorine and Chlorine compounds.

In : ss Block (ed) Desinfection, Sterilization and Prevention 4th

Ed Lee and Febiger Philadelphia, 1991 ; 131-151

20.EL FALAHA (B.M.A.), RUSSEL (A.D), FURR (J.R)

Effect of Chlorhexidine diacetate and Benzalkonium Chloride on the variability of wild type and envelope mutant *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Letters in applied microbiology ; 1985 ; 1. pp 21-24

**21.FANTON (L), GARIN (D), MOJON M., FEUGLET P., MIRAS A.,
MALICIER J.**

Le guide médical du voyageur

Edition le progrès ESKA, Paris, 1994.

22.FAVERO (SM) and BOND (W.W.)

Chap. 24 Sterilization, Desinfection and antiseptics in the tropical in

(Manual of clinical Microbiology fifth edition Washington 1991 pp. 183-
200.

23.FLEURETTE (J). FRENEY (J), REVERDY (ME)

Antiseptie et Désinfection ed. ESKA 1995 pp. 19-21.

**24.FLEURETTE (J). TRANNS (M.J.), FLANDROU (J.P.), BRUN (Y).
LAURAS (E.)**

Evaluation de l'activité bactéricide du chlorure de benzalkonium au moyen
d'un ensemencement à sites multiples

Path. Biol. 21 ; n°28 : 845-850

25.GARDNER (J.F.), GRAY (K.G)

Chlorhexidine, In Desinfection, Sterilization and Preservation (Block SS
eds)

Lee and Fabiger Philadelphia 1983 ; 251-270.

26.GREBUS (C.) CREMIEUX (A.) Jacquet Francillon (M.L)

Détermination de l'activité bactéricide de chlorure de Benzalkonium par
numération des survivants après neutralisation de l'antiseptiques

Path. Biol 21 ; 1971 n°28 : 851-859

27.GORMAM (S.P) Jones (D.S), LOFTINS (A.M)

The sporicidal activity and inactivation of Chlorhexidine digluconate in aqueous and alcoholic solution J. App. Bacteriol. 1987 ; 63 : 183-188

28.Guideline on sterilization and disinfection methods effective against human immunodeficiency virus (HIV).

WHO AIDS series 3, 1989

**29.HALEY.CE, MARLING. Cason M. Smith (JW), LUBY (J.P),
MACKOWICK (P.A.)**

Bactericidal activity of antiseptic agents methicillin resistant *S. aureus* J. microbiol : 1985 ; 21 : 991-992

30.HALLEY. (R.W) et AL.

The nation wide nosocomial infection rate increased recognition deasese in us hospital. The efficacy of infection surveillance and control programs. Identifying high risk surgical patients in LEMINOR B. VERON M. FLAMMARION MED. SC. Paris 1989 : 107-117

31.HALLEY. (R.W) et AL.

The nation wide nosocomial infection rate increased recognition deasese in us hospital.

Pub. Med. Af. 1989 ; 9 : 31-41

32.HANDBROK of pharmaceutical excipient

Handbrok of pharmaceutical excipients (ed). The pharmaceutical society of Great Britain, London, 1986

33.HARVEY (S.C)

Antimicrobiol drugs in : Gennaro AR (eds)
Remingtons pharmaceutical sciences 18th edition
Easton Mark Publishing company 1990 : 1163-1174.

34.HIOM (SJ), FURR (JR), RUSSEL (AD), DICKINSON (JR)

Effects of Chlorhexidine diacetate on *C. albicans*, *C. glabrata* and
saccharaeomyceo cervisiae J. appl. Bacteriol 1992 ; 72 : 335-340

35.HUGO (W.B), RUSSEL (AD)

Types of antimicrobiol agents In : Russel AD Hugo WB Ayliff. GAJ (eds)
Desinfection, preservation and Sterilization
Oxford, Blackwell. Scientific Publications 1992 : 7-88

36.MAROUHOC SR.

Classical phenol derivatives and their uses. Developpements Industrial
Microbiology. 1979 ; 20 : 15-24

37.MARTINDALE

The extrapharmacopeae 30th ed. JEF Reynolds (ed) Pharmaceutical Press,
London 1993 ; 181-805

38.MAURER (I.M)

Hospital hygiene, London, Edward Arnold 1974, in Revue du Praticien.
1980 ; 30-54

39.MEYER A. et Coll.

Les agents antimicrobiens. In : Cours de Microbiologie Médicale. 1991 ;
199-217

40.MEYLER.

Meyler's side effect of drugs.

Dukes M N G. Elsevier, Amsterdam 1992

41.NAKAHARA H., KOSUKUE H.

Chlorhexidine resistance in *E. coli* isolated from clinical lesions.

J. Clin. Microbiol. 1982 ; 15 : 166-168

42.PUICE C., DESCOTES J., EVREUX

Effets indésirables et toxicologie cliniques des antiseptiques.

In : Antisepsie et désinfectant

ESKA, 1995 ; 418-469

43.REBER H.

Colloque sur les antiseptiques.

Paris 1972 ; 3-5

44.RUSSEL A.D.

Bacterial spores and chemical sporicidal agents.

Clin. Microbiol. Rev. 1990 ; 3 : 99-119

45.RUSSEL A.D.

Antifongical activity of biocide.

In : Russel A.D., Hugo W.B., Ayliff, GAJ eds

Desinfection, preservation and sterilization.

Oxford Blackwell Scientific Publication 1992 : 134-149

46.SAINT YRIEX P.

Les antiseptiques à l'Hôpital Pellegrin.

Thèse Pharmacie. Bordeaux II, 1990 ; n°7

47.SURGOT M., FLEURETTE J. et REVERDY M.E.

Utilisation d'une microméthode pour l'étude de l'activité bactéricide des antiseptiques et désinfectants.

Revue de l'Inst. Pasteur de Lyon. 1982 ; t 15 n°2 : 241-252

48.TRAORE B.

Détermination de la CMB de quatre antiseptiques et un désinfectant sur des souches bactériennes d'origine hospitalière.

Thèse Pharm., Dakar, 1996 ; n°43

49.YEAGER C.J.

Copper and zinc preservatives

In : Desinfection Sterilization and Preservation (Block SS eds) LEE and Febiger, London 1991 : 358-361.

