

MESURE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES ANTIBIOTIQUES

I/ Etude de la sensibilité aux antibiotiques

1°) La concentration minimale inhibitrice (CMI)

a) Expérience :

On prépare une série d'une dizaine de tubes dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé (ce qui ne se traduit par aucune opacité appréciable à l'œil).

On distribue ensuite dans chaque tube, à l'exception du premier qui servira de témoin, des quantités croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2.

Les tubes sont observés macroscopiquement après 18 à 24 h d'incubation à 37 °C.

Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée : un trouble nettement visible en est la traduction.

A partir d'une certaine concentration il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a pas de culture visible indique la CMI.

b) Définition :

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h.

c) Interprétation :

La CMI permet de classer une souche bactérienne dans les catégories « sensible », « résistant » ou « intermédiaire » à l'action d'un agent antimicrobien.

Une souche est dite « sensible » à un antibiotique lorsque la CMI de celui-ci est nettement inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.

A l'inverse, elle est dite « résistante » lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte in vivo sans utiliser des doses toxiques.

Si la CMI se situe entre ces deux extrêmes, la sensibilité de la souche bactérienne est dite « intermédiaire » : les bactéries ne pourront pas être atteintes avec une antibiothérapie « standard », mais elles pourront l'être par un traitement administré par voie générale à fortes doses ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

2°) L'antibiogramme : Technique de diffusion en gélose (méthode des disques)

On ensemence une gélose en boîte de Pétri avec une suspension bactérienne.

Des disques de papier buvard imprégnés des différents antibiotiques testés sont déposés à la surface de la gélose ensemencée. Chaque antibiotique diffuse dans la gélose et y détermine des concentrations décroissantes proportionnellement à la distance du disque. Après incubation, on obtient des zones d'inhibition autour de chaque disque d'antibiotique ; la culture s'arrête en effet lorsqu'elle rencontre dans la gélose une concentration égale à la CMI. La mesure du diamètre des zones d'inhibition est interprétée en sensible, intermédiaire ou résistant.

II/ Etude de la bactériostase et de la bactéricidie

En fonction de leur concentration, les antibiotiques peuvent agir selon deux modalités différentes : la bactériostase et la bactéricidie.

1°) Mise en évidence – Définitions

Reprenons la série des tubes de l'expérience précédente (CMI), et observons les tubes d'heure en heure.

Il est possible d'apprécier à intervalles de temps réguliers le nombre de bactéries présentes dans chaque tube.

Les résultats sont les suivants :

- Dans le tube T (témoin sans antibiotique) on observe la courbe de croissance habituelle de toute croissance bactérienne.

- Aux faibles concentrations l'action de l'antibiotique paraît nulle (0,25 mg/l).

Pour les plus basses concentrations (0,50 à 2 mg/l) il y a un ralentissement de la croissance bactérienne, mais à tout moment le nombre de bactéries est égal ou supérieur au nombre initial de bactéries : l'antibiotique exerce un effet bactériostatique.

Ainsi la bactériostase est une atteinte de la croissance bactérienne telle que le nombre de bactéries formées est inférieur à celui de la croissance sans antibiotique mais supérieur ou à la limite égal au nombre de bactéries ensemencées.

- Pour les concentrations plus élevées d'antibiotiques (4, 8 et 16 mg/l) on constate une réduction du nombre de bactéries d'autant plus marquée que la concentration d'antibiotique est grande : on dit que l'antibiotique exerce un effet bactéricide.

La bactéricidie est une destruction, une mort accélérée, des bactéries sous l'effet de l'antibiotique.

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration d'antibiotique ne laissant subsister qu'un nombre de survivants inférieur ou égal à 0,01 % de l'inoculum (soit 1 survivant sur 10.000).

Parfois l'action antimicrobienne est partielle et après une diminution précoce du nombre de bactéries on observe une reprise de la croissance bactérienne : c'est le phénomène de rebond. Il peut être dû à une instabilité de l'antibiotique in vitro, à une hétérogénéité de la population bactérienne qui peut comporter un nombre de bactéries génotypiquement plus résistantes que l'ensemble de la population ou à une induction d'enzymes conférant une résistance des bactéries à l'antibiotique.

Ainsi l'action d'un antibiotique sur une souche bactérienne est caractérisée par deux paramètres : sa CMI et sa CMB.

2°) Intérêt pratique

En clinique cette différence d'intensité d'action a, dans certains cas, une très grande importance. Le plus souvent l'effet bactériostatique suffit dans les infections aiguës : l'antibiotique aide les défenses naturelles de l'organisme à circonscrire le foyer infectieux et à détruire les bactéries infectantes. Un traitement antibiotique exerçant un effet bactéricide puissant est important dans les septicémies, les endocardites, certaines infections chroniques.

3°) Classification des antibiotiques selon leur activité in vitro

Bactéricides	Bactériostatiques
β -lactamines, Vancomycine, Fosfomycine, Aminosides, Streptogramines Sulfamides +Triméthoprime, Quinolones, Rifamycines, 5-nitro-imidazolés, Polymyxines.	Phénicolés, Tétracyclines, Macrolides, Lincosamides, Acide fusidique, Sulfamides, Nitrofuranes.

III/ Etude de l'activité d'une association d'antibiotiques in vitro

1°) Indications d'une association d'antibiotiques

1. Traitement en urgence d'une infection grave non diagnostiquée
2. Infections à germes multiples où un seul antibiotique ne peut être actif sur l'ensemble de la population bactérienne.
3. Risque de sélection de mutants résistants.
4. Obtention d'un effet synergique ou d'une action bactéricide rapide.

2°) Définition des interactions

Les effets antibactériens des associations d'antibiotiques sont généralement définis par les 4 possibilités d'interactions suivantes :

- a) **Indifférence** : L'activité de l'un des antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre.
- b) **Addition** : L'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément et avec la même concentration que dans l'association.
- c) **Synergie** : L'effet est significativement supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément et avec la même concentration.
- d) **Antagonisme** : L'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des antibiotiques. Son activité est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique pris indépendamment.

3°) Associations synergiques :

Les interactions synergiques des antibiotiques s'expliquent par divers mécanismes :

- Synergie des associations β -lactamines et aminosides, vancomycine et aminosides : liée à une augmentation de la perméabilité de la paroi bactérienne aux aminosides
- Synergie des β -lactamines possédant des sites différents de fixation aux PLP : ampicilline et pivmécillinam.
- Synergie par compétition d'affinité pour une enzyme de type β -lactamase : amoxicilline + acide clavulanique.
- Synergie par inhibition séquentielle d'une même voie métabolique : sulfaméthoxazole + triméthoprime.

4°) Associations antagonistes :

Les effets antagonistes peuvent résulter des interactions suivantes :

- L'association d'antibiotiques bactériostatiques comme les tétracyclines ou le chloramphénicol avec une β -lactamine diminue l'activité bactéricide de cette dernière.
- L'association chloramphénicol et macrolide, qui entraîne une compétition de ces molécules pour le même site de fixation sur la sous-unité 50 S du ribosome.
- L'association aminoside et tétracycline ou chloramphénicol entraîne une inhibition du transfert actif de l'aminoside dans la bactérie.
- Certaines associations de β -lactamines sont antagonistes lorsque l'une des molécules est inductrice d'une β -lactamase.

5°) Choix des associations :

Une combinaison limitée à deux antibiotiques suffit dans la plupart des cas. Le choix de l'association est fait en fonction des germes :

a) Entérocoques et streptocoques α -hémolytiques :

- Pénicilline G + streptomycine ou gentamicine
- Ampicilline + gentamicine

b) Staphylocoques :

- Isoxazolympénicillines + aminosides ou fosfomycine

- Céfalotine + aminoside en cas d'allergie aux pénicillines
- Céfotaxime + fosfomycine (sur les souches résistantes à la méticilline)
- Lincosamides + aminosides
- Vancomycine + aminosides ou rifampicine ou fosfomycine
- Fluoroquinolones + aminosides ou rifampicine ou fosfomycine
- Rifampicine + streptogramines

c) Entérobactéries :

En fonction des résistances naturelles ou acquises de la souche étudiée on choisira des associations de type :

- β -lactamines (amino, acyluréido, carboxypénicillines, céphalosporines) + aminosides
- Quinolones (fluoroquinolones) + aminosides
- Sulfamides-Triméthoprimine + aminosides

d) *Pseudomonas aeruginosa*

- Carboxypénicillines + aminosides
- Acyluréidopénicillines + aminosides
- Carbapénèmes + aminosides
- Céphalosporines (cefsulodine, ceftazidime, céfopérazone)
- Aztréonam + aminosides
- Fluoroquinolones + aminosides

6°) Mise en évidence de l'effet d'une association d'antibiotiques : méthode par diffusion

On dépose perpendiculairement à la surface d'une gélose deux bandelettes de papier buvard imprégnées d'une concentration donnée d'un antibiotique A et d'un antibiotique B.

Lorsque les produits ont diffusé dans le milieu, on applique sur la gélose une feuille de cellophane stérile perméable aux antibiotiques et aux nutriments du milieu de culture.

Cette membrane est ensuiteensemencée avec une suspension de la souche bactérienne à étudier.

Après 18 h d'incubation à 37 °C on observe une zone d'inhibition de croissance bactérienne linéaire et parallèle à chaque bandelette. Selon l'aspect de l'intersection des deux zones d'inhibition on déduit l'effet de l'association : indifférent, additif, synergique, antagoniste.